

**Isolierung und  
Charakterisierung  
von cysteinhaltigen Peptiden aus  
humanen Körperflüssigkeiten  
mittels chromatographischer und  
massenspektrometrischer  
Methoden**

**Vom  
Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -**

genehmigte

**Dissertation**

von

Diplom-Biologin Susanne Neitz  
Geboren am 17.08.1968 in Rehren

**2001**

---

Referent:	Prof. Dr. Walter Müller
Korreferent:	PD Dr. Peter Schulz-Knappe
Prüfer im Hauptfach Biochemie:	Prof. Dr. Walter Müller
Prüferin im Nebenfach Zellbiologie:	PD Dr. Irene Marten
Tag der mündlichen Promotionsprüfung:	18.12.2001

**An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben, ganz besonders gilt mein Dank:**

Herrn Prof. Dr. Walter Müller, dass er die vorliegende Arbeit als Referent vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover vertritt.

Herrn PD Dr. med. Peter Schulz-Knappe gilt mein ganz besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas und die Übernahme des Koreferates, die sehr guten Arbeitsbedingungen in der Firma BioVisioN AG und für die zahlreichen gute Ideen und Anregungen, von denen ich seit vielen Jahren profitieren darf.

Den Mitarbeitern des Teams „Inventories“ Michael Jürgens, Markus Kellmann, Peer Köster, Petra Seiler und Thomas Möhring danke ich ganz herzlich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die außerordentlich nette und angenehme Arbeitsatmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Allen weiteren Mitarbeitern der Firma BioVisioN AG möchte ich ganz besonders für die Unterstützung in allen Belangen des praktischen Laboralltags, in organisatorischen Fragen, in der EDV und vor allem für das sehr gute Betriebsklima danken.

Zuletzt, aber ganz besonders und herzlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium der Biologie ermöglicht haben und immer für mich da waren.

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
II. Summary.....	III
III. Zusammenfassung.....	VI
IV. Keywords/Schlagwörter.....	IX
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Peptide .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Körperflüssigkeiten als Ausgangsquelle für die Identifizierung von Peptiden und Proteinfragmenten .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Peptidomics: die systematische Charakterisierung von Peptiden in komplexen, biologischen Quellen .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Die Bedeutung der Aminosäure Cystein als Baustein in Peptiden und Proteinen ..</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Grundlagen der Massenspektrometrie.....</b>	<b>15</b>
1.5.1 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie: MALDI-TOF-MS .....	16
1.5.2 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie: ESI-MS.....	18
1.5.2.1 <i>Verwendete Massenanalytoren in der ESI-Technik .....</i>	<i>20</i>
1.5.3 Sequenz- und Strukturanalysen von Peptiden mit massenspektrometrischen Methoden .....	22
1.5.3.1 <i>Fragmentationenanalyse mit dem MALDI-TOF-MS .....</i>	<i>23</i>
1.5.3.2 <i>Tandem-Massenspektrometrie mit Elektrospray-Geräten.....</i>	<i>24</i>
<b>2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>27</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Peptidbank aus humanem Blutfiltrat .....	28
3.1.2 Humane Cerebrospinalflüssigkeit .....	29
3.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien für massenspektrometrische Methoden und <i>Reversed Phase</i> Chromatographie .....	30
3.1.4 Chemikalien und Medien für die kovalente Chromatographie.....	30
3.1.5 Chemikalien für die Reduktion, Oxidation und Modifikation von Cysteinen .....	30
3.1.6 Chemikalien und Material für die Probenentsalzung .....	31
3.1.7 Chemikalien für die Kapillarzonenoelektrophorese.....	31
3.1.8 Chemikalien für den Bradford-Test.....	31
3.1.9 Peptidstandards.....	32
3.1.9.1 <i>Standards für massenspektrometrische Methoden.....</i>	<i>32</i>
3.1.9.2 <i>Cysteinhaltige Peptide zum Testen der verwendeten Modifizierungsreagenzien.....</i>	<i>32</i>
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Chromatographische Methoden .....	33
3.2.1.1 <i>Reversed Phase Chromatographie.....</i>	<i>33</i>
3.2.1.2 <i>Kovalente Chromatographie mit Thiopropyl Sepharose .....</i>	<i>34</i>
3.2.2 Massenspektrometrische Methoden .....	35
3.2.2.1 <i>MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....</i>	<i>35</i>
3.2.2.2 <i>Elektrospray-Quadrupol Ion Trap Tandem-Massenspektrometrie (ESI-QIT-MS/MS) .....</i>	<i>36</i>
3.2.2.3 <i>Elektrospray-Quadrupol Time-of-Flight Tandem-Massenspektrometrie (ESI-QTOF-MS/MS) .....</i>	<i>37</i>
3.2.3 Darstellung von MALDI-TOF-Spektren mit dem Programm <i>Spectromania</i> .....	38
3.2.4 Kapillarzonenoelektrophorese .....	39
3.2.5 Aminosäure-Sequenzanalyse nach Edman .....	40
3.2.6 Protein-Bestimmung nach Bradford .....	40
3.2.7 Modifizierungen am Cysteinrest .....	41

3.2.7.1	<i>Reduktion der Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (DTT)</i> .....	41
3.2.7.2	<i>Modifizierung mit Iodacetamid</i> .....	41
3.2.7.3	<i>Reduktion der Disulfidbrücken mit Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)</i> .....	41
3.2.7.4	<i>Modifizierung mit 4-Vinylpyridin</i> .....	42
3.2.7.5	<i>Modifizierung mit N-(4-Dimethylaminoazobenzol-4-)iodacetamid (DABIA)</i> .....	42
3.2.7.6	<i>Modifizierung mit „Isotope-Coded Affinity Tags“ (ICAT)</i> .....	42
3.2.7.7	<i>Oxidation von reduzierten Thiolen mit Ammoniumhydrogencarbonat</i> .....	44
3.2.8	Entsalzung der Proben .....	44
3.2.9	Datenbankrecherchen .....	44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Strategien zur Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Reduktion der Disulfidbrücken</b> .....	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Bestimmung cysteinhaltiger Peptide durch Kombination von S-Carboxyamidomethylierung und differentieller massenspektrometrischer Analyse</b> .....	<b>49</b>
4.3.1	Entwicklung der Methode .....	49
4.3.2	Die Auswahl des Modifizierungsreagenzes Iodacetamid.....	50
4.3.3	Die Auswertung der Massenspektren nach S-Carboxyamidomethylierung .....	52
4.3.4	Validierung der Methode .....	54
4.3.5	Isolierung des cysteinreichen Peptids „Liver-expressed antimicrobial peptide“ (LEAP-1) .....	58
4.3.6	Das Verhalten von mehrkettigen Peptiden nach S-Carboxyamidomethylierung .....	59
4.3.7	Die S-Carboxyamidomethylierung von Proben aus humanem CSF .....	61
4.3.8	Vor- und Nachteile der Kombination aus S-Carboxyamidomethylierung und massenspektrometrischer Differenzanalyse .....	63
<b>4.4</b>	<b>Der Einsatz weiterer Modifizierungsreagenzien zum Nachweis von cysteinhaltigen Peptiden</b> .....	<b>65</b>
4.4.1	Modifizierung mit ICAT .....	65
4.4.2	Modifizierung mit 4-Vinylpyridin .....	66
4.4.3	Modifizierung mit DABIA.....	67
4.4.4	Modifizierung mit TCEP .....	68
<b>4.5</b>	<b>Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden durch die Anwendung von kovalenter Chromatographie</b> .....	<b>70</b>
4.5.1	Automatisierung der Sequenzanalyse nach kovalenter Chromatographie.....	73
4.5.2	Der automatisierte Weg vom MALDI-TOF-MS bis zur Analyse der cysteinhaltigen Peptide.....	74
4.5.3	Die Anwendung der automatisierten Sequenzanalyse mittels ESI-QIT-MS .....	74
4.5.4	Die weitere Identifizierung von cysteinhaltigen Peptiden nach kovalenter Chromatographie mittels ESI-QTOF-MS .....	79
4.5.5	Die Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden aus Cerebrospinalflüssigkeit mittels kovalenter Chromatographie .....	83
<b>4.6</b>	<b>Ausgewählte Beispiele von cysteinhaltigen Peptiden aus humanem Blutfiltrat</b> .....	<b>84</b>
4.6.1	Cystein-rich Protein 1 (CRIP) .....	84
4.6.2	Somatomedin B .....	86
<b>4.7</b>	<b>Die Verteilung von cysteinhaltigen Peptiden und Proteinen in humanem Blutfiltrat</b> .....	<b>87</b>
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Liste der eigenen Publikationen</b> .....	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b> .....	<b>95</b>

## II. Summary

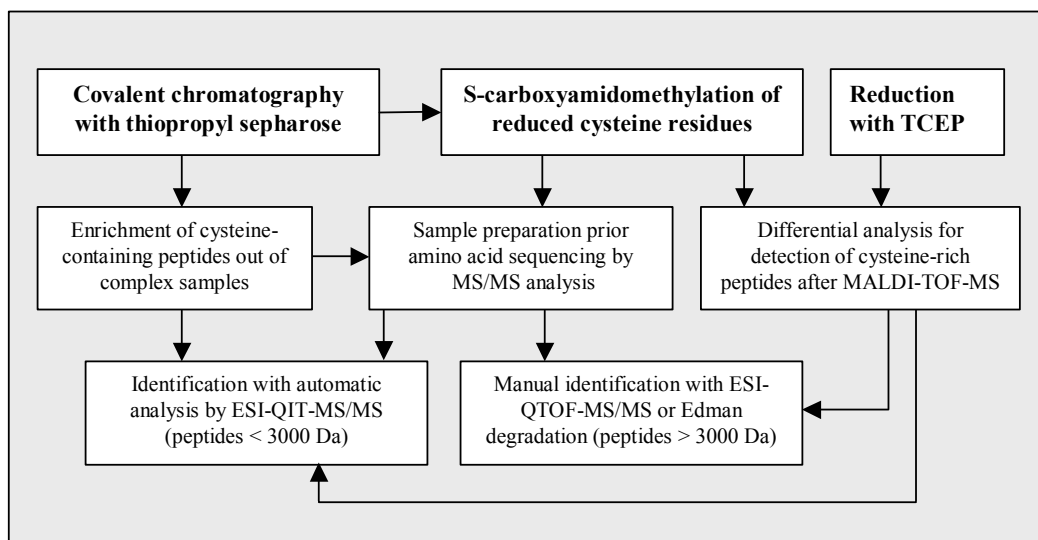
Within this thesis, it has been established strategies to isolate cysteine-containing peptides out of human body fluids. The development of such methods are important because of the frequency of disulfide bridges peptides with biological activity, for example chemokines and antimicrobial peptides. A peptide bank of human blood filtrate and additionally, cerebrospinal fluid were the main sources to isolating the relevant peptides. Different techniques of mass spectrometry and chromatography are used to separate and analyse cysteine-containing peptides. Beyond it, several modification reagents with specification for cysteine residues were applied. The requirement resulted in several reasons.

In the foreground, there was the development of methods to detect selectively cysteine-rich peptides with biological and medical relevance from complex samples. For this starting point, the combination of S-carboxyamidomethylation and differential MALDI-TOF mass spectrometric analysis was developed. After chemical modification of the reduced cysteine residues and mass spectrometric analysis, it has been searched for characteristic mass shifts. A number of cysteine-rich peptides have been identified by this method. In contrast to proteins fragments which are circulated in high amounts in used sources, low-concentrated and cysteine-rich peptides are preferably isolated. In addition, the developed method is suitable for the analysis of purified substances with unknown cysteine content.

As an alternative approach, it has been established a further combination based on reduction with TCEP and differential display by MALDI-TOF mass spectrometry. The handling with the reduction reagent is the advantage of this method because utilized solvents are compatible with MALDI measurement. Furthermore, the use of TCEP requires no desalting steps. But due to the small mass shift resulting of the reduction of disulfide bridges, the exact cysteine content cannot be determined. For this reason, this approach only used for samples existed in low amounts.

On the other hand, within the scope of *Peptide Trapping*, it has been established a sample preparation proper for cysteine-containing peptides. In this project, peptide maps are produced out of biological body fluids and further materials like cell cultures and tissues in order to obtain a complete description of the peptide content in a given source. Used mass spectrometric techniques like ESI-QTOF-MS and ESI-QIT-MS are not really suitable for the special structural properties of disulfide-bridged peptides without adequate sample preparation. For this reason cysteine-containing peptides were clearly underrepresented in the in-house database. The moreover the samples are very complex, so that many of the peptides

could not be identified before methods are established. In this case, combination of specific enrichment of cysteine-containing peptides by means of covalent chromatography, modification with iodoacetamide and automatic MS analysis worked satisfactorily. Thereby two advantages could be united. Because of the significant reduction of sample complexity, proof and analysis of lower-concentrated peptides could be achieved. By the modification with iodoacetamide, cysteine-containing peptides could be made accessible for different mass spectrometric analyses. The won knowledge over the cysteine content improved substantially the results in protein databases, because of creation of an important search criterion. Beyond that, the sequencing of peptides could be automated to a large extent by application of the electrospray quadrupole ion trap mass spectrometer.



**Figure 2:** Established methods for specific enrichment, isolating and identification of cysteine-containing peptides. Single components of the developed methods can be combined freely.

All developed methods could be transferred into the routine. Identified peptides were stored in a database which represents an important basis for development of diagnostic markers, therapeutic structures and other substances with medical relevance. Besides a set of new fragments which could give an explanation about the turnover of a protein concerned, a number of native peptides with biological activity could be identified. The characterized native peptides might possess apart from their physiological relevance also a potential therapeutic significance.

All characterized and known substances were extracellular peptides and protein fragments. Therefore established methods are suitably very well for production and processing of samples to isolate peptides out of human body fluids.

The following table shows the overview about all 206 peptides which could be identified out of human blood filtrate in context of this work.

PEPTIDE OR PROTEIN PRECURSOR	NUMBER OF ISOLATED PEPTIDES
92 KD Type IV Collagenase	1
Accession-No. AI 048700 in <i>Genbank</i> (unknown)	9
Alpha-2-HS-Glycoprotein (Fetuin)	1
Angiogenin	2
Antimicrobial Peptide Hecpudin	3
Basement Membrane-Specific Heparan Sulfate Proteoglycan	1
Beta-2-Microglobulin	30
Beta-Defensin	5
Clara Cell Phospholipid-Binding Protein	2
Cathepsin	1
Complementfactors	26
Cystatin C	15
Cysteine-rich Heart Protein	1
Desmocollin 1A/1B	2
Fibrinogen Alpha and Alpha-E Chain	9
Fibrinogen Beta Chain	1
F-Spondin	2
Guanylin	2
IG Lambda Chain C Regions	2
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2	2
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4	1
Insulin-like Growth Factor IA	1
Insulin-like Growth Factor II	1
Integral Membrane Protein 2B	1
Kininogen	3
Latent Transforming Growth Factor Binding Protein 1	1
Matrix GLA-Protein	3
Mepripin A Alpha-Subunit	1
Neutrophil Defensins	4
Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor	4
Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	1
Plasminogen	3
Platelet Basic Protein	1
Prostaglandin-H2 D-Isomerase	3
Ras-Related Protein	1
Ribonuclease Pancreatic Precursor	2
Secreted LY-6/UPAR Related Protein 1	1
Serine Protease Kazal-Type 4	1
Serum Albumin	49
Small Inducible Cytokine A14	1
Somatomedin	1
Transthyretin	2
Vitronectin	3

**Table 2:** List of all cysteine-containing peptides and fragments of proteins which has been characterized during this work. All of the 206 identified peptides are derived from human blood filtrate.



### III. Zusammenfassung

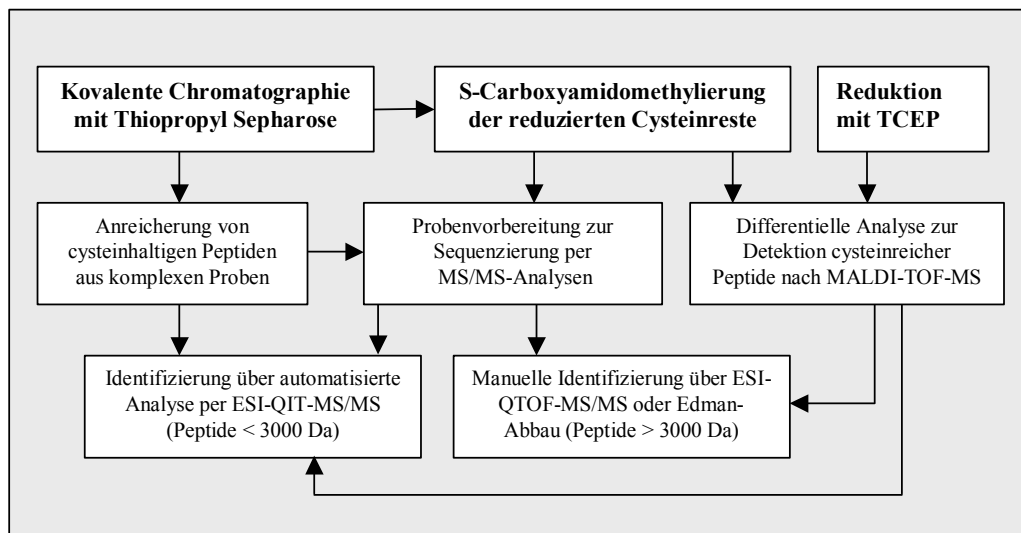
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strategien zur Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden aus humanen Körperflüssigkeiten entworfen und etabliert. Die Entwicklung solcher Methoden ist wichtig, da viele biologisch aktive Peptide wie beispielsweise Chemokine oder antimikrobielle Peptide disulfidverbrückt vorliegen. Hauptquelle stellte dabei eine Peptidbank aus humanem Blutfiltrat sowie Cerebrospinalflüssigkeit dar. Als zentrale Techniken wurden chromatographische und massenspektrometrische Trenn- und Analyseverfahren sowie cysteinspezifische Modifizierungsreagenzien eingesetzt. Der Bedarf ergab sich bei der Firma BioVisioN AG aus verschiedenen Gründen.

Im Vordergrund stand einerseits die Entwicklung von Methoden, welche selektiv cysteinreiche Peptide mit biologischer und medizinischer Relevanz in komplexen biologischen Proben detektieren. Für diesen Ansatz wurde die Kombination aus S-Carboxyamidomethylierung und differentieller, massenspektrometrischer Analyse entwickelt, bei welcher nach chemischer Modifizierung der Probe und massenspektrometrischer Analyse nach spezifischen Massenverschiebungen (Shifts) gesucht wird. Eine Reihe von relevanten Peptiden wurden mit dieser Methode identifiziert. Es wurde dabei eine bevorzugte Isolierung von Peptiden erzielt, die im Vergleich zu Proteinfragmenten einen höheren Cysteingehalt haben, und zudem in niedrigerer Konzentration in den bearbeiteten Quellen vorliegen. Die entwickelte Methode eignet sich darüber hinaus für die Analyse von aufgereinigten Einzelsubstanzen mit unbekanntem Cysteingehalt.

Als Alternative zur S-Carboxyamidomethylierung wurde die Reduktion mit TCEP etabliert, die bei der Analyse ebenfalls auf den differentiellen Vergleich per MALDI-TOF-MS setzt. Die Vorteile liegen hier in der Handhabbarkeit des Reduktionsmittels, welches in MALDI-kompatiblen Lösungsmitteln aufgenommen werden kann und keine Entsalzung vor der Analyse erfordert. Da aufgrund des geringen Massenshift die exakte Anzahl der Cysteinreste nur bedingt festgestellt werden kann, wurde die Methode nur bei Proben angewendet, von denen wenig Probenmaterial vorhanden war.

Zum anderen wurde im Rahmen des *Peptide Trappings* eine geeignete Probenvorbereitung für cysteinhaltige Peptide etabliert. In Anlehnung an die weltweit durchgeführten Proteom-Projekte werden innerhalb dieses Projektes Peptidkartierungen aus biologischen Flüssigkeiten und weiteren Proben wie Zellkulturen und Geweben durchgeführt, um eine weitgehende Beschreibung der Peptide in einer gegebenen Quelle zu erzielen. Die angewendeten, massenspektrometrischen Analyseverfahren wie ESI-QTOF-MS und ESI-QIT-MS sind je-

doch für die speziellen strukturellen Eigenschaften disulfidverbrückter Peptide ohne geeignete Vorbehandlung nur bedingt einsetzbar. Cysteinhaltige Peptide waren daher auch in der haus-eigenen Datenbank deutlich unterrepräsentiert. Des weiteren sind die Peptidproben sehr komplex, so dass eine große Zahl cysteinhaltiger Peptide vor der Etablierung der Methoden nicht erfasst werden konnte. Hier hat sich die Kombination aus spezifischer Anreicherung der Cysteinylopeptide mittels kovalenter Chromatographie, Modifizierung mit Iodacetamid und automatischer MS-Analyse bewährt, mit der zwei Vorteile vereint werden konnten. Es wurde eine signifikante Reduktion der Probenkomplexität erreicht, so dass auch niedriger konzentrierte Peptide erfasst und analysiert werden konnten. Durch die durchgeführte Modifizierung mit Iodacetamid konnten cysteinhaltige Peptide der Analyse mit den verschiedenen Massenspektrometern zugänglich gemacht werden. Die bei der entwickelten Methode gewonnene Kenntnis über das Vorhandensein von Cysteinresten in allen Peptiden verbesserte die Ergebnisse in den Protein-Datenbanken wesentlich, da damit ein wichtiges Suchkriterium geschaffen werden konnte. Darüber hinaus konnte die Sequenzierung der Peptide bei dieser Methode durch den Einsatz des ESI-QIT-MS weitgehend automatisiert werden.



**Abbildung 39:** Etablierte und in der Routine eingesetzte Methoden zur spezifischen Anreicherung, Isolierung und Identifizierung cysteinhaltiger Peptide. Die einzelnen Komponenten der entwickelten Methoden können miteinander kombiniert werden.

Alle entwickelten Methoden konnten in Routineprozesse überführt werden. Die identifizierten Peptide wurden in der Peptid-Datenbank abgelegt, welche eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von diagnostischen Markern, therapeutischen Leitstrukturen und anderen, medizinisch relevanten Substanzen darstellt. Neben einer Reihe von neuen Proteinfragmenten, die Aufschluss über die Prozessierung bezüglich des Auf- und Abbaus eines Proteins geben,

konnten native Peptide mit biologischer Aktivität identifiziert werden, die neben ihrer physiologischen Bedeutung auch eine potentielle medizinische Relevanz besitzen dürften.

Eine Übersicht aller 206 Peptide, die im Rahmen dieser Arbeit aus humanem Blutfiltrat charakterisiert werden konnten, ist in Tabelle 9 dargestellt.

PEPTID/PROTEIN PRECURSOR	ANZAHL DER ISOLIERTEN PEPTIDE
92 KD Type IV Collagenase	1
Accession-Nr. AI 048700 in <i>Genbank</i> (unbekannt)	9
Alpha-2-HS-Glycoprotein (Fetuin)	1
Angiogenin	2
Antimicrobial Peptide Hecpeidin	3
Basement Membrane-Specific Heparan Sulfate Proteoglycan	1
Beta-2-Microglobulin	30
Beta-Defensine	5
Clara Cell Phospholipid-Binding Protein	2
Cathepsin	1
Complementfaktoren	26
Cystatin C	15
Cysteine-rich Heart Protein	1
Desmocollin 1A/1B	2
Fibrinogen Alpha and Alpha-E Chain	9
Finrinogen Beta Chain	1
F-Spondin	2
Guanylin	2
IG Lambda Chain C Regions	2
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2	2
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4	1
Insulin-like Growth Factor IA	1
Insulin-like Growth Factor II	1
Integral Membrane Protein 2B	1
Kininogen	3
Latent Transforming Growth Factor Binding Protein 1	1
Matrix GLA-Protein	3
Meprin A Alpha-Subunit	1
Neutrophile Defensine	4
Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor	4
Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	1
Plasminogen	3
Platelet Basic Protein	1
Prostaglandin-H2 D-Isomerase	3
Ras-Related Protein	1
Ribonuclease Pancreatic Precursor	2
Secreted LY-6/UPAR Related Protein 1	1
Serine Protease Kazal-Type 4	1
Serum Albumin	49
Small Inducible Cytokin A14	1
Somatomedin	1
Transthyretin	2
Vitronectin	3

**Tabelle 9:** Übersicht der 206 cysteinhaltigen Peptide und Proteinfragmente, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus humanem Blutfiltrat identifiziert wurden.

Alle charakterisierten und bekannten Eiweißstoffe stellen extrazelluläre Peptide und Proteinfragmente dar. Somit sind die Methoden zur Gewinnung und Aufarbeitung der verarbeiteten Proben sehr gut geeignet zur Isolierung von Peptiden aus humanen Körperflüssigkeiten.

**Keywords:**

cysteine-containing peptides

mass spectrometry

modification of cysteine residues

**Schlagwörter:**

Cysteinhaltige Peptide

Massenspektrometrie

Modifizierung von Cysteinresten

# 1. Einleitung

## 1.1 Peptide

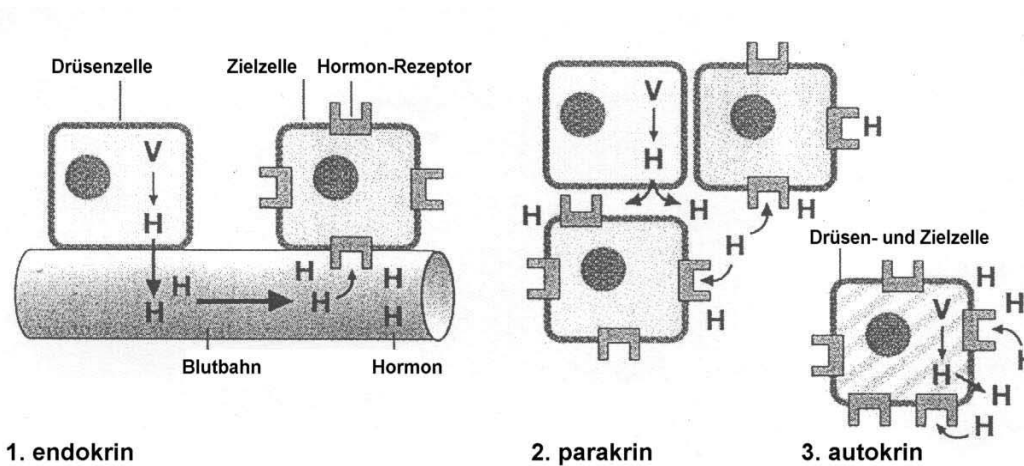
Peptide beeinflussen eine große Anzahl von physiologischen und biochemischen Prozessen im menschlichen Organismus. Als Neurotransmitter und -modulatoren übernehmen sie wichtige Funktionen im peripheren und zentralen Nervensystem, bei immunologischen Prozessen fungieren sie als immunsuppressive und -stimulierende Substanzen. Eine wichtige Rolle spielen sie bei der Regulation biochemischer Prozesse im Herz-Kreislauf-System, bei der Kontrolle des Stoffwechsels, bei der Reproduktion und dem Schmerzgeschehen. Sie sind außerdem beteiligt an der rezeptorvermittelten Signaltransduktion und der Homöostase, bei der sie für die Konstanzhaltung physiologischer Regelgrößen wie etwa Körpertemperatur, Flüssigkeitsvolumen und Blutdruck sorgen. Neben Steroiden und Aminen besitzen viele der Peptide eine Hormonfunktion, sie werden daher auch als Peptidhormone definiert. Ihrer Funktionalität zufolge kann man sie als extrazelluläre Signalstoffe bezeichnen. Im folgenden soll allgemein von Peptiden gesprochen werden.

Strukturell handelt es sich bei den Peptiden um Polymere aus  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren, die durch Verknüpfung von Aminosäuren durch Säureamidbindungen entstehen. Dabei kondensiert die Aminofunktion einer Aminosäure mit der Carboxylfunktion der benachbarten Aminosäure unter Wasserabspaltung. Die Peptide wie auch die Proteine setzen sich aus 20 proteinogenen Aminosäuren zusammen, deren individuelle Abfolge im Peptid bzw. Protein entscheidend für die Funktion ist. Jede der Aminosäuren besitzt ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit vier verschiedenen Substituenten. Daher handelt es sich bei ihnen um chirale, also optisch aktive Substanzen. In Peptiden und Proteinen von Säugern kommen nur linksdrehende L-Aminosäuren vor. Rechtsdrehende D-Aminosäuren findet man in kleineren Peptiden in den Zellwänden von Bakterien.

Der Unterschied zwischen Peptiden und Proteinen besteht in ihrer Größe, wobei die Grenzen zwischen beiden fließend sind. Bei einer Kettenlänge von bis zu 100 Aminosäuren und einem Molekulargewicht bis etwa 10 kDa wird allgemein von einem Peptid gesprochen, größere Moleküle dagegen werden als Proteine bezeichnet. Die Trennung beider Stoffklassen beruhte ursprünglich auf dem Kriterium der Dialysierbarkeit durch natürliche Membranen; eine scharfe Grenze zwischen ihnen ist aber schwer zu definieren [Jakubke, H.-D. 1996].

Gebildet werden Peptide in speziellen Drüsen oder Organen von unterschiedlicher morphologischer Beschaffenheit, wobei sich mehrere Sekretionstypen differenzieren lassen. Beim *autokrinen* Mechanismus werden von den entsprechenden Zellen Substanzen sezerniert, die

dann direkt regulatorisch auf sich selbst oder auf Zellen des gleichen Typus zurückwirken. Die Zelle kann also gleichzeitig Donator und Akzeptor eines bestimmten Moleküls sein. Die Selbststimulierung des Tumorwachstums durch von Krebszellen gebildete Wachstumsfaktoren etwa ist ein autokriner Prozess.



**Abbildung 1:** Spezialisierte Drüsenzellen synthetisieren das Hormon (H) aus Vorstufen (V) und schütten es bei Bedarf in den Extrazellulärraum aus. Nach Diffusion und Transport erfolgt die Wirkung auf eine Zielzelle. Gezeigt sind hier endokrine, parakrine und autokrine Hormonwirkung [Koolman, J. et al. 1994].

Bei der *parakrinen* Signalübertragung wirken Moleküle nur auf Zellen, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Sie diffundieren nicht weit und wirken zügig auf die Zielzelle. Viele Peptide des Gastrointestinaltraktes beispielsweise wirken direkt auf benachbarte Zielzellen. Außerdem gibt es Peptide, die als Gewebshormone bezeichnet werden und die nicht von einer speziellen Drüse sezerniert werden. Sie werden in bestimmten Gewebearealen gebildet, deren primäre Funktion nicht direkt durch eine Hormonproduktion gekennzeichnet ist. Diese *aglandulären* Peptide kommen etwa im Magen-Darm-Trakt oder auch im Blutplasma vor und wirken häufig auf parakrine Weise. Als Vertreter dieser Gruppe sind die Peptide Gastrin oder Cholecystokinin zu nennen, die an der Regulation von Verdauungsvorgängen im Magen-Darm-Trakt beteiligt sind.

Beim *endokrinen* Mechanismus fungiert das Blut als Transportweg zu weiter entfernten Zielorten. Endokrine Organe wie die *Langerhansschen* Inseln des Pankreas, Schilddrüse oder Nebenniere besitzen keinen Ausführungsgang und geben ihre Inkrete direkt in das Blut ab. Viele der Peptidhormone der Hypothalamus-Hypophysenachse werden über das Blut zu ihren Zielorten transportiert.

Die Übertragung von Peptiden, die als Neurotransmitter fungieren, wird als *synaptisch* be-

zeichnet, weil sie durch den synaptischen Spalt von einer Nervenzelle zur nächsten übertragen werden. Verläuft die Informationsübertragung des Mediators über die Blutbahn auf Nervenzellen, handelt es sich um einen *neurohumoralen* Mechanismus.

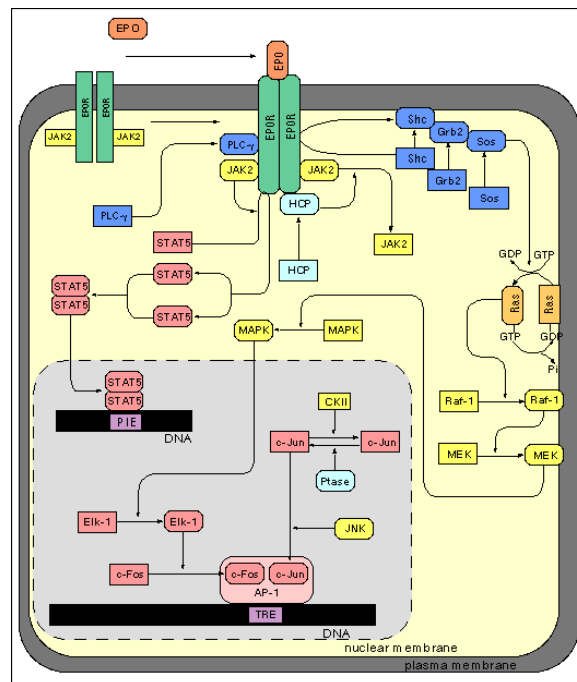
Bei der Einteilung der Peptidhormone nach ihren Syntheseorten bzw. nach der Art ihrer Bildungszellen muss berücksichtigt werden, dass eine Klassifizierung auf diese Weise nur bedingt möglich ist. Ein nicht geringer Anteil der Stoffe wird außer in den entsprechenden endokrinen Organen auch im zentralen und vegetativen Nervensystem oder im Immunsystem gebildet.

Die Bildung von Peptiden erfolgt nach den Mechanismen der ribosomalen Proteinbiosynthese oder in Ausnahmefällen direkt aus den Aminosäurebausteinen. Die gebildete mRNA codiert für ein Präpropeptid, das meistens wesentlich größer als die biologisch aktive Form des Peptids ist. Eine N-terminale, hydrophobe Signalsequenz sorgt dafür, dass sich die Ribosomen am rauhen, endoplasmatischen Retikulum (rER) anlagern und das wachsende, sekretorische Peptid in das Innere des rER lenken. Nach enzymatischer Abspaltung dieser etwa 20-30 Aminosäuren langen Signalsequenz durch eine Signalpeptidase wird das Propeptid einer weiteren Prozessierung unterworfen, aus der schließlich das biologisch aktive Peptid hervorgeht. Bei diesem Prozessing erfolgt die proteolytische Spaltung der Peptide durch Prohormonkonvertasen.

Häufig erfolgen darauf *posttranslationale* Modifizierungen im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat, von denen bisher mehr als 200 verschiedene beschrieben wurden [Krishna, R.G. *et al.* 1993]. Diese lassen sich grob in drei Gruppen unterteilen. Erstens kann es dabei beispielsweise zur weiteren Abspaltung von Teilsequenzen oder einer Umformierung wie etwa der Ausbildung von Disulfidbrücken kommen. Zweitens findet man terminale Modifizierungen wie die Amidierung der endständigen Carboxylfunktion am C-Terminus oder die Zyklisierung von Glutamin zu Pyroglutaminsäure am N-Terminus. Diese Art posttranslationaler Veränderungen kommen sehr häufig bei Neuropeptiden vor und schützen vor enzymatischem Abbau. Drittens gibt es noch die große Gruppe der Modifizierungen der Seitenketten, die bei fast allen Aminosäuren auftreten und von sehr unterschiedlicher Struktur sein können. Glykosylierungen mit verschiedenen Zuckerresten wie Mannose oder Galactose findet man etwa bei Asparaginsäure, seltener bei Serin und Threonin. Der Kohlenhydratanteil kann einen großen Anteil im Molekül ausmachen. Beim Peptidhormon Erythropoietin, das in der Niere gebildet wird und in der Milz und im Knochenmark die Produktion der roten Blutkörperchen anregt, liegt er zum Beispiel bei einem Anteil von 40 % [Jacobs, K. *et al.* 1985]. Weitere,

häufig vorkommende Modifizierungen sind Sulfatierungen am Tyrosin, Hydroxylierungen am Prolin und Lysin oder Methylierungen am Lysin und der Glutaminsäure.

Die posttranslationalen Modifizierungen haben unterschiedliche Funktionen. Sie dienen unter anderem der Stabilisierung der Struktur und dem Schutz vor Abbau durch Proteasen, leiten aber auch Degradationsprozesse ein. Sie können außerdem Erkennungsmotiv für einen bestimmten Zielort sein. Bei der Regulierung von Enzymaktivitäten und der Signaltransduktion spielen sie eine entscheidende Rolle, indem sie durch Bildung oder Entfernung der jeweiligen Modifizierung bestimmte Schritte im Gesamtprozess einleiten. Hier sei besonders die Phosphorylierung bzw. die Dephosphorylierung von Serin, Tyrosin oder Histidin hervor zu heben, die durch die Ladungsänderung im Molekül zu einer Umstrukturierung und damit zu einer Änderung der enzymatischen Aktivität führen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges des Peptidhormons Erythropoietin (nach: <http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/pathway/epo.html>).

Nach diesem Reifungsprozess erfolgt die Speicherung der gebildeten Peptide in sekretorischen Vesikeln. Aus diesen werden sie bei Bedarf durch Exocytose aus der Zelle ausgeschüttet und zum Zielort transportiert, wo sie durch spezifische, aus Proteinen bestehende membran-durchspannende Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzelle erkannt werden. Die Anheftung verursacht eine Strukturveränderung des Rezeptors und löst somit die Weiterleitung des Signals ins Innere der Zelle aus. In Folge wird in der Zelle eine dem Peptid entsprechende Reak-



tion ausgelöst. Die als Signaltransduktion bezeichnete Übertragung und Umwandlung wird über einen zweiten Botenstoff - den *second messenger* - vermittelt und beinhaltet ein komplexes Geflecht von kaskadenartig hintereinander geschalteten Reaktionen, an dessen Ende durch eine Veränderung der Genexpression schließlich die zelluläre Antwort steht. In der Abbildung 2 ist der schematische Signaltransduktionsweg des Proteins Erythropoietin dargestellt und vermittelt eine Vorstellung über die Komplexität der dargestellten Mechanismen.

Wie die Proteine unterliegen auch die Peptide einem ständigen Auf- und Abbau (*turnover*) im Organismus. Der Abbau durch Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität wird von Inhibitoren reguliert und kann sehr schnell erfolgen, so dass biologisch aktive Peptide im Regelfall nur Halbwertszeiten von wenigen Minuten besitzen.

In den letzten Jahren stieg die Neuentdeckung von Peptiden vor allem durch die rasante Weiterentwicklung von präparativen und analytischen Techniken, die immer sensitiver wurden, stark an. Waren es bis zum Jahre 1988 knapp sechzig veröffentlichte Sequenzen von biologisch aktiven Peptiden, sind heute in Swiss-Prot (*Release 39*) unter den fast 6500 humanen Sequenzen knapp über 500 Einträge von Peptiden annotiert, die bis zu 120 Aminosäuren enthalten (unter Berücksichtigung des Signalpeptides von ca. 20 Aminosäuren) und damit im definierten Molekulargewichtsbereich der Peptide liegen [Bairoch, A. *et al.* 2000; Sundler, F. *et al.* 1988].

Mittlerweile gibt es eine ganze Anzahl von Protein-Datenbanken, in denen neben den Sequenzdaten häufig auch umfassende Beschreibungen zur Funktion, posttranslationalen Modifizierungen und vorkommende Mutationen und Varianten der jeweiligen Peptide und Proteine annotiert sind [Apweiler, R. 2000]. Viele dieser Peptide lassen sich medizinisch als diagnostische Marker oder Therapeutika nutzen und stellen damit ein großes Potential bei der Neuentwicklung von pharmazeutischen Substanzen dar.

## 1.2 Körperflüssigkeiten als Ausgangsquelle für die Identifizierung von Peptiden und Proteinfragmenten

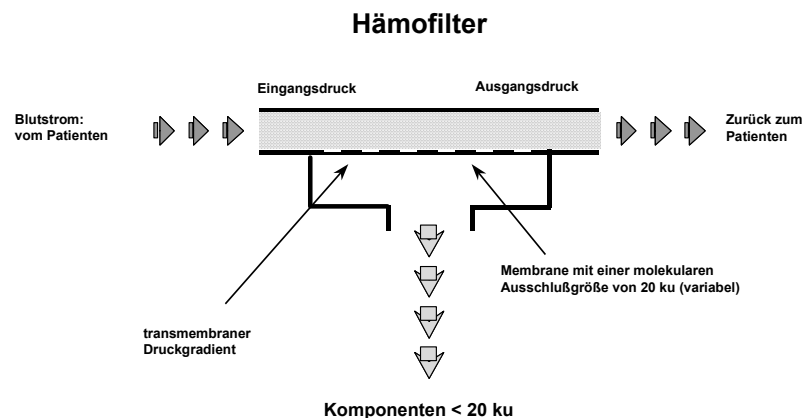
Ein Problem auf der Suche nach Peptiden mit potenzieller medizinischer Relevanz stellt die ausreichende Verfügbarkeit der Ausgangsmaterialien dar. Menschliche Organe, Gewebe oder Körperflüssigkeiten müssen in größeren Mengen präpariert werden, um aus ihnen eine ausreichende Menge zu isolieren, damit eine komplette Struktur- und Funktionsaufklärung des Peptids durchgeführt werden kann. Ende der sechziger Jahre wurde beispielsweise aus 200000 Hypothalami von Schweinen weniger als 1 mg Thyreotropin Releasing-Hormon (TRH) isoliert [Schally, A. *et al.* 1969]. Dieses Peptid stimuliert die Ausschüttung von Thyreotropin (TSH), welches das Wachstum und die Funktion der Schilddrüse reguliert.

Die Probleme bei der Beschaffung von humanem Gewebe in solch großen Mengen für die Isolierung von Peptiden kann man sich also unschwer vorstellen, auch wenn heute mit weit weniger Material eine komplette Strukturaufklärung möglich ist. Für weitere biologische Funktionsanalysen lassen sich nach Identifizierung die entsprechenden Moleküle in großen Mengen durch chemische Peptidsynthese oder rekombinante Herstellung in geeigneten Bakterienkulturen herstellen. Als Quelle für eine umfassende Kartierung der menschlichen Peptide bietet sich besonders das Blut an, da viele der biologisch aktiven Substanzen über die Blutbahn vom Entstehungsort zum Wirkort oder zum Abbau- bzw. Ausscheidungsort transportiert werden. Um Peptide aus Blut in größeren Mengen verfügbar zu machen, kommt Hämofiltrat in Frage, welches bei der Therapie von chronisch niereninsuffizienten Patienten in großen Mengen anfällt [Henderson, L.W. *et al.* 1986; Quellhorst, E. *et al.* 1977]. Dieses Verfahren wird anstelle der Hämodialyse bei Patienten angewendet, um harnpflichtige Stoffe und Stoffwechselprodukte zu entfernen. Bei dieser Methode werden die genannten Stoffe durch Filter mit einer definierten Porengröße (20 kDa) aktiv abgepreßt. Automatische Steuerung von Filtratentzug und Flüssigkeitsersatz sorgen dabei für einen kontrollierten Prozess.

Hämofiltrat ist aus verschiedenen Gründen besonders als Ausgangsmaterial geeignet. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass darin viele Peptide in ähnlichen Konzentrationen wie im Blutplasma enthalten sind [Schepky, A. *et al.* 1994]. Zum anderen ist ein großer Teil der nicht interessierenden Plasmaproteine wie das Albumin und verschiedene Immunglobuline schon weitgehend abgetrennt, da ihr Molekulargewicht oberhalb der Ausschlussgrenze der verwendeten Membranen bei der Hämofiltration liegt und sie daher nicht filtrierte werden.

Als weitere Quellen zur Detektion und Isolierung von Peptiden eignen sich praktisch sämtliche Körperflüssigkeiten wie Urin, Cerebrospinalflüssigkeit und Speicheldrüsensekrete, aber

auch Zellüberstände aus den verschiedensten Zellkulturen oder Gewebe von verschiedenen Organen.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der kontinuierlichen arterio-venösen Hämofiltration.

In dieser Arbeit wird neben Hämofiltrat auch Cerebrospinalflüssigkeit zur spezifischen Detektion von cysteinhaltigen Peptiden verarbeitet. Die Cerebrospinal- oder Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit (CSF), die von dem *Plexus choroidei* gebildet wird, dient hauptsächlich dem Schutz des zentralen Nervensystems (ZNS) vor mechanischer Verformung. Das Volumen von etwa 130-150 mL füllt den gesamten Subarachnoidalraum aus und wirkt wie ein schützender Puffer um das Gehirn und das Rückenmark. Der Hauptanteil der hier vorkommenden Proteine und Peptide sind Serumproteine; nur ein geringerer Anteil wird im zentralen Nervensystem gebildet [Stark, M. *et al.* 2001]. So ähnelt auch die Zusammensetzung von Peptiden im CSF der des Blutplasmas, jedoch ist der relative Gehalt an Peptiden höher, da die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-CSF-Schranke impermeabel für größere Moleküle sind [Aldred, A.R. *et al.* 1995]. Der Gesamtproteingehalt von CSF ist dagegen niedriger als im Plasma. Aufgrund dessen bietet sich dieses Material zur Charakterisierung von Peptiden an, da neben der medizinischen Bedeutung für Erkrankungen des ZNS auch der, für eine präparative und analytische Aufarbeitung hinderliche Proteinanteil geringer ist. CSF stellt eine wertvolle, diagnostische Quelle dar, da es Aufschluß über das Geschehen innerhalb des Schädels und des Gehirns sowie des ZNS geben kann. Vor allem bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS wie etwa der Meningitis oder bei neurodegenerativen Erkrankungen kommt der Untersuchung des CSF eine besondere Bedeutung zu. Ansätze zur systematischen Charakterisierung der dort enthaltenen Peptide und Proteine haben daher in der Medizin in den letzten Jahren immer mehr an Interesse gewonnen [Davidsson, P. *et al.* 2001; Westman, A. *et al.* 1998].

### 1.3 Peptidomics: die systematische Charakterisierung von Peptiden in komplexen, biologischen Quellen

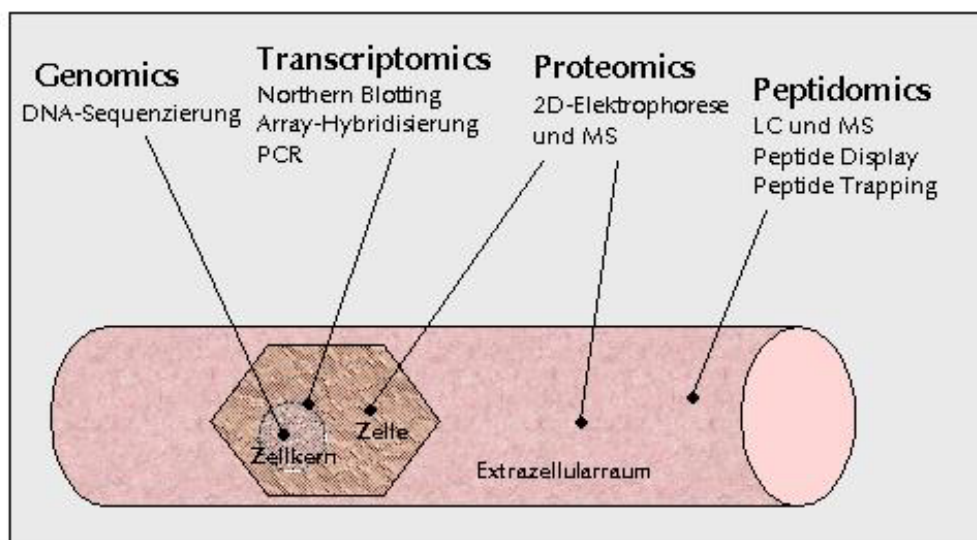
Neben der Sequenzierung des humanen Genoms, die seit 1987 mit hohem finanziellem Aufwand betrieben wird, stieg in den letzten Jahren die systematische, quantitative Identifizierung der Proteine aus unterschiedlichen Spezies und Zelltypen ebenfalls stark an. Die Notwendigkeit dafür ergibt sich aus der Tatsache, dass nicht alle struktur- und funktionsrelevanten Kenntnisse über ein Peptid bzw. Protein aus der Gensequenz entnommen werden können. Durch das nachgeschaltete, posttranslationale Prozessing werden Substanzen oft auf eine nicht aus dem Gen ableitbare Art und Weise modifiziert, so dass zwangsläufig nur durch die Kombination von molekularbiologischen und biochemischen Strategien auf Gen- und Proteinebene eine vollständige Analyse hinsichtlich Struktur und Funktion eines Stoffes möglich ist.

Für diese zahlreichen - im Zuge der immer weiter fortschreitenden Automatisierung - im hohen Durchsatz durchgeführten Arbeiten wurde der Begriff *Proteom* bzw. *Proteomics* entworfen [James, P. 1997; Wilkins, M.R. *et al.* 1996a; Wilkins, M.R. *et al.* 1996b]. Der Begriff *Proteom* bezeichnet das vollständige Protein-Expressionsmuster einer Zelle, eines Organismus oder einer Körperflüssigkeit unter definierten Bedingungen. Die typische Vorgehensweise bei Proteom-Projekten wird durch die Kombination von gelelektrophoretischen Methoden und massenspektrometrischer Analyse geprägt. Die Proteine einer ausgewählten Probe werden nach geeigneter Vorbehandlung zuerst in einem zweidimensionalen (2D-) Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und nach anschließender Isolierung aus dem Gel enzymatisch verdaut. Mittels massenspektrometrischer Analyse erfolgt danach die Identifizierung. Dabei werden die Proteine anhand von sogenannten *Peptide Maps* über die charakteristischen, enzymatisch gebildeten Fragmente direkt identifiziert oder diese Fragmente werden durch weitere massenspektrometrische Fragmentierung zerlegt und über die entstehenden, spezifischen Peptidbruchstücke analysiert. Bei den gängigen Verfahren werden überwiegend Moleküle über 10 kDa untersucht und erfaßt. Da die Auflösung der verwendeten Gele im Molekulargewichtsbereich unter 10 kDa, also im relevanten Bereich für Peptide, nicht mehr ausreichend ist, kommt diese Anwendung für die systematische Identifizierung des Peptidspektrums einer ausgewählten Quelle nicht oder nur bedingt in Frage. Ein zusätzliches Problem ergibt sich aus den schon erwähnten Konzentrationsunterschieden zwischen Peptiden und Proteinen, da letztere im großen Überschuss vorhanden sind.

Im Projekt *Peptidomics* wird aufgrund der oben beschriebenen Problematik bei der Analyse schwerpunktmäßig auf die Kombination chromatographischer Verfahren gesetzt, um eine

effektive Auftrennung der Peptide zu erreichen [Jürgens, M. *et al.* 1998; Schulz-Knappe, P. *et al.* 1996; Schulz-Knappe, P. *et al.* 2001]. Die Kartierung und Identifizierung im Anschluss wird mit verschiedenen massenspektrometrischen Techniken und der Aminosäuresequenzanalyse nach Edman vorgenommen. *Peptidomics* vereinigt zwei generelle Ansätze: zum einen die möglichst weitgehende, systematische Identifizierung der Peptide einer Quelle (*Peptide Trapping*) und die differentielle Peptidanalyse (*Differential Display*), bei welcher zwei Stadien, etwa ein pathologischer Zustand und eine gesunde Kontrollgruppe, quantitativ und qualitativ hinsichtlich ihres Peptidspektrums miteinander verglichen werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden insbesondere extrazelluläre Körperflüssigkeiten bearbeitet, doch eine Erweiterung des Projektes auf intrazelluläre Quellen wie etwa Gewebe oder Zelllinien ist in Planung.

Beide Ansätze – *Peptidomics* wie auch *Proteomics* - eröffnen ein großes Potential im medizinischen Bereich. Neben der Erforschung der Grundlagen zur Entstehung von verschiedensten Krankheiten ergibt sich gerade durch die Durchführung der differentiellen Analysen die Möglichkeit, diagnostische Marker oder therapeutisch einsetzbare Substanzen zu identifizieren und dem pharmazeutischen Markt zugänglich zu machen [Banks, R.E. *et al.* 2000; Chambers, G. *et al.* 2000; Jungblut, P.R. *et al.* 1999].



**Abbildung 4:** Verschiedene Strategien zur Aufklärung der komplexen, biologischen Vorgänge in zellulären Systemen der unterschiedlichsten Spezies [modifiziert nach Schulz-Knappe, P. *et al.* 2001].

Besonders interessant auf der Suche nach medizinisch relevanten Substanzen könnten dabei Peptide bzw. Proteine sein, die posttranslational modifiziert wurden [Parekh, R.B. *et al.* 1997]. Diese Modifizierungen haben, wie oben beschrieben, sehr unterschiedliche Strukturen

und treten äußerst zahlreich auf. Die spezifische Suche nach Peptiden mit posttranslationalen Modifizierungen würde daher sicherlich die Chance erhöhen, Substanzen mit biologischer Bedeutung zu detektieren, da gerade die modifizierten Stoffe wichtige regulatorische Eigenschaften besitzen [Rucker, R. *et al.* 1993]. Zahlreiche Methoden sind bisher beschrieben worden, mit denen sich modifizierte Peptide und Proteine besonders aus komplexen Gemischen isolieren lassen [Akiyama, T. *et al.* 1994; Burlingame, A.L. 1996; Carr, S.A. *et al.* 1996].

#### 1.4 Die Bedeutung der Aminosäure Cystein als Baustein in Peptiden und Proteinen

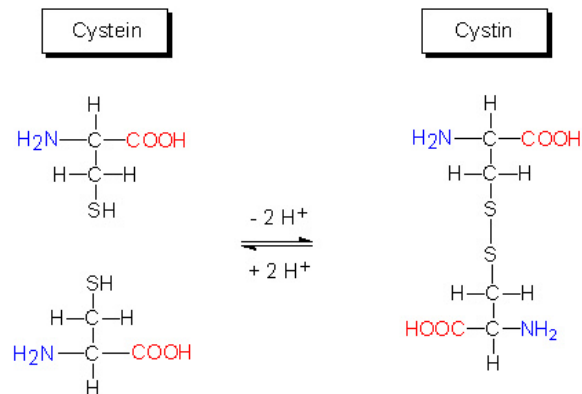
Unter den 20 proteinogenen Aminosäuren, die man in Peptiden und Proteinen des Menschen findet, nimmt das Cystein eine Sonderstellung ein. Es stellt neben Methionin die einzige schwefelhaltige Aminosäure dar. Aufgrund seiner einzigartigen Fähigkeit, Disulfidbrücken auszubilden, trägt es ganz wesentlich zur Ausbildung und zur Stabilisierung der räumlichen Molekülstruktur in Peptiden und Proteinen bei.

Cystein gehört zu den bedingt essentiellen Aminosäuren. Es kann zwar im Körper aus Methionin synthetisiert werden, diese Aminosäure aber muss über die Nahrung zugeführt werden, da sie vom Körper nicht selbst gebildet werden kann. Cystein stellt eine der wichtigsten Schwefelquellen im tierischen Organismus dar.

Durch die Oxidation der Sulfhydrylgruppen (-SH) zweier Cysteine bildet sich das sogenannte Cystin. In einem Molekül mit mehr als einer Disulfidbrücke werden die Cystine in der Regel so ausgebildet, dass die thermodynamisch stabilste Struktur entsteht. Durch die gebildeten Quervernetzungen wird die native Konformation des Peptids bzw. Proteins in einer extrazellulären Umgebung vor Denaturierung geschützt. Die Disulfidbrücken sind im Regelfall essentiell für die biologische Funktion bzw. die Aktivität des jeweiligen Moleküls. Die Bildung der Disulfidbrücken im biologischem System findet nach der Entfernung der Signalsequenz im Innenraum des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Katalysiert wird diese reversible Reaktion durch das Enzym *Protein-Disulfid-Isomerase*, welches im Lumen des rauhen ER lokalisiert ist. Gewöhnlich bilden nur extrazelluläre Proteine Disulfidbrücken aus. Cysteinreste in intrazellulären Proteinen liegen aufgrund des dort herrschenden Redoxpotentials meist frei vor.

Die Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen und Peptiden kann sowohl intramolekular

als auch intermolekular erfolgen. In der Regel findet die Verbrückung innerhalb einer Peptid- oder Proteinkette statt. Bei der biologisch aktiven Form von Insulin, welche aus zwei Ketten aufgebaut ist, findet man neben einer intramolekularen Disulfidbrücke in der A-Kette zwei weitere, intermolekulare Verbrückungen, welche die A-Kette und B-Kette miteinander verknüpfen.



**Abbildung 5:** Strukturformel der Aminosäure Cystein in ihrer freien (links) und ihrer disulfidverbrückten Form (links).

Freie Cysteine spielen weiter eine wichtige Rolle in Transportproteinen, weil sie durch ihr hohes reaktives Potential in der Lage sind, verschiedene Substrate zu binden. Das Plasmaprotein Albumin etwa dient neben seiner Hauptaufgabe - der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes - als rasch verfügbares Eiweißreservoir und als Transporter und Binder verschiedener Moleküle. Das aktive Molekül besitzt neben 17 Disulfidbrücken in Position 34 einen freien Cysteinrest, welcher in der Lage ist, Metallionen und andere Stoffe wie etwa Fettsäuren, aber auch pharmakologische Substanzen reversibel zu binden. Dieser einzige freie Cysteinrest im Albumin liegt in vielen Spezies stark konserviert vor und spielt dort eine wichtige funktionelle Rolle [Narazaki, R. *et al.* 1997].

In einer der vier Hauptfamilien der proteolytischen Enzyme, den weit verbreiteten Thiolproteasen, spielt das Cystein eine wichtige Rolle für die katalytische Aktivität. Das aus der Frucht der Papaya gewonnene Enzym Papain besitzt in seinem aktiven Zentrum einen Cysteinrest, dessen nukleophiler Charakter bei der Bindung von Substraten eine entscheidende Rolle spielt.

Das Tripeptid Glutathion, aufgebaut aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamin, übernimmt im Organismus beispielsweise überaus wichtige und vielschichtige Aufgaben, für die hauptsächlich der Cysteinrest in der Sequenz verantwortlich ist. In Erythrozyten etwa hält

die reduzierte Form des Glutathions (GSH) mit seiner freien Sulfhydrylgruppe die freien Cysteinreste im Hämoglobin im reduzierten Zustand und hält so die normale Erythrozytenstruktur aufrecht. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei Entgiftungsreaktionen, indem es mit Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden reagiert und so als Antioxidans die Zelle vor oxidativem Stress schützt. Eine neuroprotektive Wirkung des Glutathions und ein Einfluß auf die Apoptose wird ausserdem diskutiert [Hall, A. 1999; Monks, T. *et al.* 1999]. Es ist in sehr hohen Konzentrationen und in einem bestimmten Gleichgewicht mit seiner dimerisierten, oxidierten Form (GSSG) in praktisch allen Zellen vorhanden und dient dort ausserdem als Redoxpuffer.

Neben der freien und der disulfidverbrückten Form findet man vor allem in größeren Proteinen modifizierte Cysteine. In Membranproteinen etwa kommt es häufig zu einer posttranslationalen Lipidierung, die essentiell für die Membraninsertion ist. Dabei werden Cysteine am freien Schwefelatom palmitoyliert oder mit einem Farnesyl- oder Geranylgeranylrest prenyliert.

In vielen Peptiden findet man spezifische, konservierte Cysteinmuster. In  $\beta$ -Defensinen etwa, einer Familie von kationischen Peptiden mit antibiotischen, antiviralen und cytotoxischen Eigenschaften, kommen sechs Cysteine vor, die zu drei Disulfidbrücken verknüpft sind. Die Positionen der Cysteine in der Sequenz und die Art der Verknüpfung sind identisch [Bensch, K.W. *et al.* 1995; Lehrer, R.I. *et al.* 1996]. Auch in Chemokinen, einer Familie der Cytokine, die an der Immunantwort beteiligt sind, findet man spezielle Cysteinmuster. Die beiden Subfamilien dieser Peptide, die als CC- und CXC-Chemokine bezeichnet werden, unterscheiden sich neben ihrer unterschiedlichen chemotaktischen Wirkung auf neutrophile Granulozyten und Monozyten auch in der Cysteinabfolge in ihrer Primärstruktur [Baggiolini, M. *et al.* 1994].

Von den natürlich vorkommenden Aminosäuren gehört das Cystein zu den weniger häufig auftretenden in Proteinen und Peptiden. Die in der Literatur und in verschiedenen Proteindatenbanken veröffentlichten Zahlen variieren dabei zwischen 1,44 und 2,8 Prozent, wobei dort nicht zwischen Proteinen und Peptiden unterschieden wird [Nagano, N. *et al.* 1999; Sillard, R. *et al.* 1993]. Doch in vielen biologisch aktiven Peptiden wie zum Beispiel bei den hier vorgestellten Defensinen oder den Endothelinen [Levin, E.R. 1995], einer Gruppe von vaso-konstriktorisch wirkenden Substanzen, ist der Gehalt an Cysteinen wesentlich höher und liegt häufig über 15 %.

Nagano *et al.* zeigten 1999, dass die in der Brookhaven Proteindatenbank (PDB, Release 83)



annotierten, nicht-redundanten Proteine einen Cysteingehalt von 1,44 % besitzen. Berücksichtigt wurden dabei aber lediglich 378 Proteine. Von den dort untersuchten 1471 Cysteinresten lagen nur 42,42 % disulfid-gebunden vor, wobei diese zu 97,76 % innerhalb einer Proteinkette ausgebildet wurden. Nur 2,24 % dieser gebundenen Cysteinreste bilden Ketten zwischen verschiedenen Aminosäureketten aus, wie das etwa beim blutzuckersenkenden Hormon Insulin oder bei dem für den Sauerstofftransport zuständigen Blutfarbstoff Hämoglobin der Fall ist. Die nicht disulfid-gebundenen Cysteinreste liegen entweder frei vor oder binden Metallionen und andere Stoffklassen wie oben beschrieben.

Eigene statistische Untersuchungen in *Swiss-Prot* [Bairoch, A. und Apweiler, R. 2000], eine der gängigsten frei zugänglichen Proteinsequenzdatenbanken mit mittlerweile knapp 6500 humanen Einträgen (*Release 39*) haben gezeigt, dass der relative Gehalt an Cysteinresten im Verhältnis zu den übrigen proteinogenen Aminosäuren 2,24 % beträgt. Legt man die komplette Datenbank zu Grunde, die heute über 99000 Sequenzeinträge (*Release 39.29*) inclusive aller annotierten Spezies beinhaltet, findet sich in der dort dargestellten Statistik ein prozentualer Anteil an Cysteinresten von 1,63 %.

Ein Problem stellt der Nachweis von Cysteinen in Proteinen und Peptiden dar. Gängige Standard-Methoden zur Bestimmung der Aminosäuren wie der Edman-Abbau oder die Aminosäureanalyse führen dazu, dass der Cysteinrest während der Analysenvorbereitung zerstört wird und nicht mehr nachweisbar ist. Für den Edman-Abbau kann das entsprechende Peptid beispielsweise mit 4-Vinylpyridin oder Iodessigsäure modifiziert werden. Die Aminosäure Cystein bleibt dabei erhalten und kann über die spezifische Retentionszeit im Chromatogramm identifiziert werden.

Ansätze zum Screening von cysteinhaltigen Peptiden aus komplexen Gemischen befassen sich in der Literatur vor allem mit tryptischen Peptiden oder synthetisch hergestellten Gemischen [Fullmer, C.S. 1984; Swiderek, K. *et al.* 1998]. Für die Identifizierung von Proteinen in Proteom-Ansätzen werden diese nach elektrophoretischer Trennung aus dem Polyacrylamidgel heraus meistens mit Trypsin verdaut. Da dabei vorwiegend Einzelproteine verdaut werden, liegen die entstehenden Fragmente später in ähnlichen Konzentrationen in der Probe vor. Bei komplexen, biologischen Proben mit nativen Peptiden ist die Konzentrationsverteilung der vorliegenden Komponenten dagegen sehr heterogen. Tryptische Peptide scheinen sich gerade bei der Analyse durch massenspektrometrische Methoden durch besondere Moleküleigenschaften besser identifizieren zu lassen. Die durch den enzymatischen Abbau gebildeten Fragmente besitzen am C-Terminus eine der basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin, an

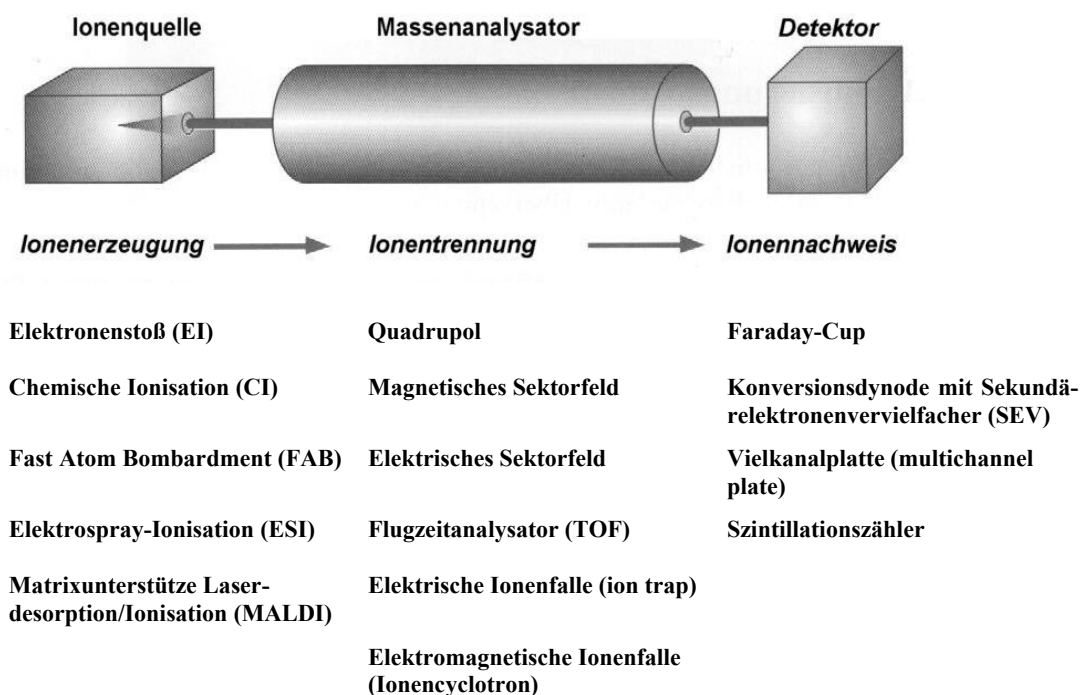
denen häufig die positiven Ladungen der Fragmentationen lokalisiert sind. Dadurch entstehen im Massenspektrum bevorzugt durchgehende y-Serien, also vom C-Terminus ausgehende Fragmente. Desweiteren sind diese beiden Aminosäuren in humanen Peptiden mit einer relativen Häufigkeit von 5,5 % für Arginin bzw. 5,8 % für Lysin (Statistik aus Swiss-Prot, *Release 39*) relativ häufig vertreten, so dass in einem Protein meist zahlreiche enzymatische Spaltstellen vorliegen. Das daraus resultierende, relativ geringe Molekulargewicht der gebildeten Fragmente führt hauptsächlich zu der Bildung von einfach geladenen Fragmentationen im Massenspektrometer. Diese sind in der Regel einfacher interpretierbar als Fragmente mit mehrfachen Ladungszuständen, vor allem aufgrund der geringeren Komplexität des Spektrums. Ein weiterer Vorteil bei der Identifizierung dieser tryptischen Peptide ist die Möglichkeit, in den meisten verfügbaren Suchmaschinen für Protein-Datenbanken, Eingrenzungen bei der Recherche anzugeben, in diesem Fall also die Tatsache, dass es sich um tryptische Proteinfragmente handelt. Die Suchkriterien lassen sich daher gut präzisieren und eingrenzen und die Erfolgsquote dadurch signifikant erhöhen. Bei nativen Peptiden ist diese Möglichkeit selten gegeben, weil häufig keine weiteren Kenntnisse über die Eigenschaften eines Peptids ausser sein spezifisches Molekulgewicht vorliegen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Methoden, mit denen Einzelpeptide auf ihren Cystein Gehalt und ihre genaue Struktur hin untersucht werden, also auch auf die spezifische Art der Disulfid-Verbrückungen und die Anzahl der Cysteinreste [Jones, M.D. *et al.* 1998; Solouki, T. *et al.* 1997; Svoboda, M. *et al.* 1995]. Die Anwendbarkeit dieser Methoden auf komplexe, biologische Proben erscheint allerdings fraglich, weil die Auswertung dabei manuell und mit großem zeitlichen Aufwand betrieben werden muss.

Eine Vielzahl von verschiedenen Reagenzien und Methoden ist heute verfügbar, mit denen sich die Cysteinreste sehr spezifisch modifizieren und nachweisen lassen [Aitken, A. 1994; Henschen, A. 1986; Ming, D. *et al.* 1995; Sliwkowski, M.X. *et al.* 1985]. Die Möglichkeiten reichen dabei von Farb- und Fluoreszenzlabeln bis hin zu Reagenzien, die radioaktiv markiert sind oder eine spezifische Veränderung in der Molekülmasse auslösen.

## 1.5 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die ersten Massenspektrometer fanden in den 60er Jahren Einzug in die Labors der Naturwissenschaftler. Zu dieser Zeit wurden sie zur Bestimmung der molekularen Masse und zur Strukturaufklärung von flüchtigen Molekülen und Molekülbruchstücken verwendet. Die in die Gasphase überführte Probe wurde mit Elektronen aus einem Heizdraht beschossen, wodurch die Probenmoleküle ionisiert und die Bindungen gespalten wurden. Die entstandenen Fragmente wurden dann in einem magnetischem Feld abgelenkt, wobei die Stärke der Ablenkung von der Masse und der Ladung des jeweiligen Iones abhängt und so auf das Molekulargewicht geschlossen werden kann. Bei Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden oder Nukleinsäuren versagen allerdings diese Methoden, da solch große und in der Regel hoch geladene Moleküle schwer flüchtig sind und darüber hinaus unter dem hochenergetischen Elektronenbombardement zerfallen würden [Rehm, H. 2000].



**Abbildung 6:** Komponenten eines Massenspektrometers. Die dargestellten Komponenten zur Erzeugung, Trennung und zum Nachweis der Ionen sind teilweise frei miteinander kombinierbar [Eckerskorn, C. 1998].

Die Massenspektrometrie fand erst spät, gegen Ende der 80er Jahre, Zugang zu den Biowissenschaften und ermöglichte erst durch die Entwicklung von neuen, schonenden Ionisierungstechniken die Untersuchung von größeren Biomolekülen. In der Peptidanalytik, bei der Moleküle bis etwa 10 kDa aufgetrennt und analysiert werden, gibt es seither die Möglichkeit, die Molekulargewichte von Peptiden sehr exakt und empfindlich, auch in komplexen Mi-

schungen, zu bestimmen.

Die Massenspektrometrie ist eine Untersuchungstechnik, bei der freie, gasförmige Ionen im Hochvakuum hinsichtlich ihres „Masse zu Ladungs“-Quotienten ( $m/z$ ) aufgetrennt und analysiert werden. Aufgebaut ist ein heutiges Massenspektrometer grundsätzlich aus den Einheiten Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor, die - wie die Abbildung 6 zeigt - in ihrem Aufbau variieren und unterschiedlich miteinander kombiniert werden können.

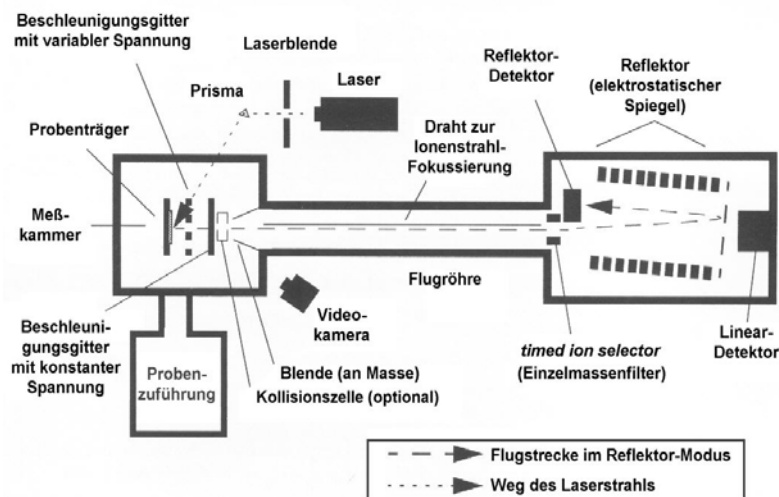
In der Protein- bzw. Peptidanalytik haben sich in den letzten Jahren vor allem die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) durchgesetzt und stellen heute weit verbreitete Analysemethoden in diesem Bereich dar [Covey, T.R. *et al.* 1988; Fenn, J.B. *et al.* 1989; Hillenkamp, F. *et al.* 1991; Karas, M. *et al.* 1988; Stults, J. 1995]. Die beiden genannten Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit als zentrale Untersuchungstechniken eingesetzt und werden daher im folgenden genauer dargestellt.

### 1.5.1 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Massenspektrometrie: MALDI-TOF-MS

Bei dieser Technik werden die Proben zusammen mit einer geeigneten Matrixsubstanz in einer dünnen Schicht auf eine Metallplatte aufgebracht und dort zur Ionisierung mit einem gepulsten UV-Laser beschossen. Die Matrix, die im  $10^3 - 10^4$  fachen molaren Überschuss zur Probe aufgetragen wird, hat dabei verschiedene Funktionen. Die Matrixsubstanz absorbiert bei der eingestrahelten Wellenlänge Energie aus dem Laserpuls und überträgt diese zur Desorption der Probenmoleküle notwendige Energie. Sie schützt desweiteren die Probe vor photolytischer Zersetzung und stellt die für den Ionisierungsprozess notwendigen Protonen bereit. Weiterhin bietet sie einerseits einen Schutz vor Wechselwirkungen der Analytmoleküle untereinander, und andererseits vor Interaktionen der Moleküle zur Metalloberfläche des Probenträgers [Lehmann, W.D. 1996]. Die Wahl der Matrix hängt dabei ganz entschieden von der Art und den Molekulargewichten der in den Proben enthaltenen Komponenten ab und besitzt einen großen Einfluß auf die Qualität der Messungen [Jürgens, M. 1999]. In der Peptidanalytik haben sich vor allem Sinapinsäure und *alpha*-Cyano-4-hydroxycinnamssäure bewährt. Daneben spielt auch die Zusammensetzung des benutzten Lösungsmittels zur Aufnahme der Matrixsubstanz eine wichtige Rolle [Cohen, S.L. *et al.* 1996].

Im Hochvakuum der Ionenquelle wird die kristalline Probe auf dem Träger einem intensiven

Impuls einer kurzwelligigen Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden ausgesetzt. Durch die elektronische Anregungsenergie erfolgt ein Phasenübergang, bei welchem neben Matrixmolekülen auch Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt werden. Wenige Millimeter von der Probenplatte entfernt befindet sich eine Elektrode, durch die ein elektrostatisches Feld erzeugt wird. Dies führt dazu, dass geladene Analytmoleküle in Richtung des Analysators beschleunigt werden.



**Abbildung 7:** Schematischer Aufbau des in der Arbeit verwendeten MALDI-TOF-Massenspektrometers der Firma Applied Biosystems (nach Applied Biosystems, 1997)

Die Massenanalyse im Hochvakuum erfolgt bei diesen Massenspektrometern über eine sehr empfindliche elektronische Zeitaufnahme, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Auftreffen auf den Detektor gemessen wird. Die Ionen durchlaufen auf ihrem Weg eine feldfreie Driftstrecke, auf der sie entsprechend ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis, aus dem unterschiedliche Geschwindigkeiten bei gleicher kinetischer Energie resultieren, aufgetrennt werden. Diese Driftstrecke ist üblicherweise zwischen einem und vier Meter lang. Da das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung dem Quadrat der Flugzeit proportional ist, läßt sich aus dieser Beziehung die Molekülmasse aus der gemessenen Flugzeit sehr genau ermitteln. Die Massengenauigkeit bei den Geräten der neueren Generation liegt mittlerweile bei unter 10 ppm. Zudem werden heute Auflösungsvermögen von 10000 und mehr erreicht; es lassen sich also per Definition zwei Stoffe mit einem Molekülgewicht von 10 kDa und einem Unterschied von einem Dalton auf Halbwertsbreite der Peaks voneinander trennen.

Die Detektion der Ionen geschieht in der Regel mit einem sogenannten Sekundärelektronen-vervielfacher, welchem eine Konversionsdynode mit einer den Ionen entgegengesetzten

Polarität vorgeschaltet ist. Der Ionenstrom verursacht beim Auftreffen auf diese Dynode einen Sekundärelektronenstrom, der beim Auftreffen auf weitere Dynoden mit höheren Potentialen eine Elektronenkaskade verursacht. Am Ende wird das analoge Signal mit einem Transientenrecorder, der aus Analog-Digital-Konvertern besteht, digitalisiert. Mit den entsprechenden datenverarbeitenden Programmen lassen sich nun die Massenspektren kalibrieren und analysieren.

Im MALDI-TOF-MS lassen sich neben Peptiden und Proteinen auch weitere Substanzklassen wie etwa Oligonukleotide oder andere Biopolymere mit der geeigneten Matrixsubstanz vermessen.

### 1.5.2 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie: ESI-MS

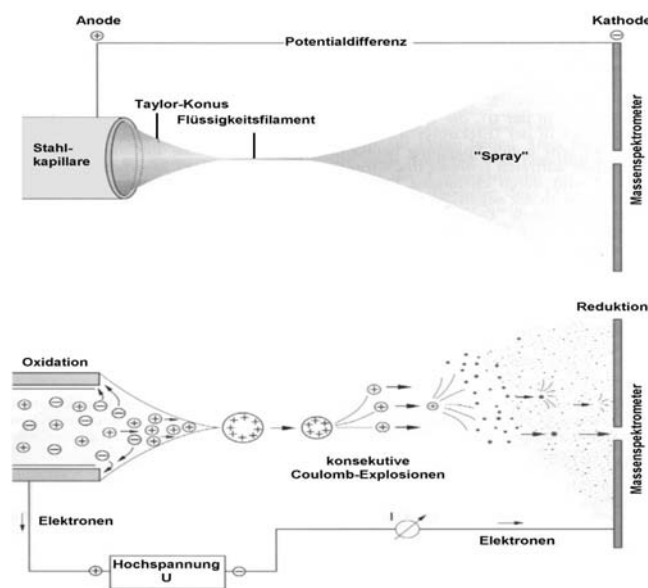
Im Gegensatz zur MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird bei diesem Verfahren die Probe in flüssiger Form mit einem kontinuierlichen Fluß in die Ionenquelle des Gerätes eingebracht. Der Begriff *Elektrospray* beschreibt dabei die Dispersion einer Flüssigkeit in viele kleine Tröpfchen in einem elektrischen Feld, wobei die Tröpfchen in die Gasphase überführt werden.

Die Flußerzeugung kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Über herkömmliche Spritzen- oder HPLC-Pumpen läßt sich die flüssige Probe mit unterschiedlichen Flussraten über eine Kapillare der entsprechenden Ionenquelle zuführen. Durch die Kopplung mit einer Chromatographie-Anlage läßt sich zusätzlich eine Vortrennung einer komplexen Probe erreichen, die dann kontinuierlich in das Massenspektrometer überführt wird. Werden beim Elektrospray-Verfahren (ESI) noch relativ hohe Flüsse zwischen 5-200  $\mu\text{L}/\text{min}$  gefahren, läßt sich mit einer Mikrospray-Quelle ( $\mu\text{ESI}$ ) durch Flussraten von 0,2-1  $\mu\text{L}/\text{min}$  der Probenverbrauch schon drastisch senken. Neben des niedrigeren Probenverbrauchs steigt zudem die Nachweisempfindlichkeit.

Als weitere, empfindlichere Methode zur Erzeugung des Elektrosprays werden beim Nanospray-Verfahren (nanoESI) wenige Mikroliter der Probe in eine ausgezogene, leitfähig beschichtete Glaskapillare eingebracht [Wilm, M. *et al.* 1996]. Der Fluss entsteht bei dieser Variante durch elektroosmotische Effekte, durch zusätzliche Druckluft wird ein stabilerer Fluss und damit auch ein stabileres Spray erzeugt. Mit einem Volumen von nur 1-2  $\mu\text{L}$  Probe lassen sich auf diese Weise lange Messzeiten erreichen, was gerade bei gering konzentrierten Proben von Vorteil ist, da so die Möglichkeit zur langen Aufsummierung von Einzelspektren

gegeben ist.

Die flüssige Probe wird beim Elektrospray-Verfahren unter atmosphärischem Druck in einem starken elektrostatischen Feld versprüht, das zwischen dem Kapillarauslass (Nadelspannung) und einer wenige Millimeter entfernten Gegenelektrode (*interface plate*) angelegt wird. Je nach Polarisation bilden sich Tröpfchen mit positiver oder negativer Überschussladung, die dann einen fortwährenden Lösungsmittelverlust durch Verdampfung erfahren. In Abhängigkeit von den Spraybedingungen und dem verwendeten Lösungsmittel besitzen die im Elektrospray erzeugten Tröpfchen einen Durchmesser von 2-3  $\mu\text{m}$ . Durch das weitere Schrumpfen ihres Volumens auf dem Weg in den Massenanalysator erhöht sich folglich ihre Oberflächenladungsdichte. Es folgt - durch die Abstossung gleichnamiger Ladungen - ein beständiger spontaner Zerfall in Mikrotröpfchen. Ist die Ladungsdichte so hoch, dass die Coulomb-Abstossung gleicher Ladungen die Oberflächenspannung überwindet, kommt es zu sogenannten Coulomb-Explosionen, wobei die Mikrotröpfchen in viele kleine Tröpfchen von nur noch wenigen Nanometern Durchmesser zerfallen.



**Abbildung 8:** Schema des makroskopischen (oben) bzw. mikroskopischen (unten) Elektrospray-Ionisations-Prozess [Eckerskorn, 1998]

Für das Entstehen von freien Ionen in der Gasphase aus geladenen Flüssigkeits-Tröpfchen werden verschiedene Modelle diskutiert. Die Theorie von Dole (*Single Ion in Droplet Theory, SIDT*) geht davon aus, dass die durch die Coulomb-Explosionen erzeugten Tröpfchen so klein sind, dass sie schließlich nur noch ein Analyt-Molekül enthalten [Dole, M. *et al.* 1969]. Aus

diesen entstehen letztendlich, durch komplette Desolvatisierung in Folge von Kollisionen mit den Stickstoffmolekülen im Interface des Massenspektrometers, lösungsmittelfreie, gasförmige Ionen. Anschliessend erfolgt der Transfer der desolvatisierten Ionen über eine winzige Öffnung in der Mitte der Gegenelektrode (*Orifice*) in den unter Hochvakuum stehenden Massenanalysator. In der Peptidanalytik wird überwiegend im positiven Messmodus gearbeitet. Für die Analyse werden daher kationische Peptidmoleküle mit positiver Überschussladung erzeugt.

### 1.5.2.1 *Verwendete Massenanalysatoren in der ESI-Technik*

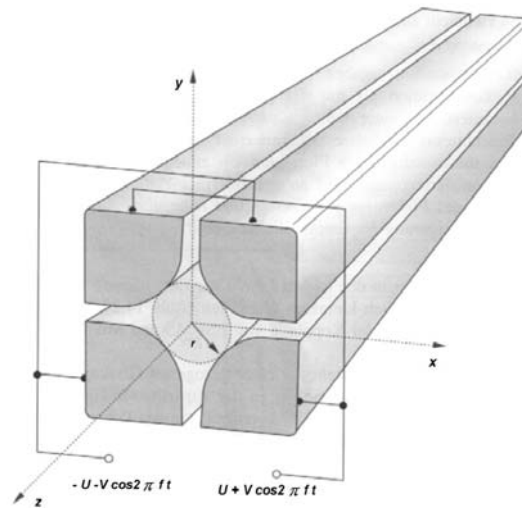
Die ESI-Technik läßt sich mit unterschiedlichen Massenanalysatoren koppeln. Am weitesten verbreitet sind momentan die Quadrupolsysteme, die erstmals schon im Jahre 1953 von Paul und Steinwedel beschrieben wurden [Paul, W. 1990; Paul, W. *et al.* 1953].

Ein Quadrupol besteht aus vier oder - je nach technischer Ausführung auch mehr - parallelen Metallelektroden in Form von hyperbolischen Stäben, an denen elektrische Spannung angelegt wird. Es liegt eine Wechselspannung und eine Gleichspannung mit einer bestimmten Frequenz an, wobei zwei sich gegenüberliegende Stäbe die gleiche Polarität der Gleichspannung oder die gleiche Phase der Wechselspannung besitzen. Dadurch haben nebeneinanderliegende Stäbe eine entgegengesetzte Polarität und eine um  $180^\circ$  versetzte Phase [Lottspeich, F. *et al.* 1997]. Bei der Analyse werden die Gleichspannung und die Amplitude der Wechselspannung im Radiofrequenzbereich erhöht, wobei ihr Verhältnis zueinander konstant bleibt. In der Nähe der z-Achse entsteht so ein elektrisches Potential. Durch eine geringe Beschleunigungsspannung erhalten die Ionen eine Translationsenergie und beschreiben beim Durchtreten des elektrischen Feldes in der Stabanordnung oszillierende Bahnen in Richtung der z-Achse.

Bei einem bestimmten Potential- und Frequenzzustand werden nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis auf einer stabilen Flugbahn durch das Stabsystem transferiert, Ionen mit anderen Werten entladen sich durch instabile Flugbahnen an den Elektroden. Durch Scannen über die Gleich- und Wechselspannung werden nun die Ionen nacheinander, abhängig von ihrem  $m/z$ -Verhältnis in den stabilen Bereich des Quadrupolfeldes gebracht. Die aus dem Quadrupol austretenden Ionen werden über einen Deflektor zum *channel electron multiplier* (CEM) abgelenkt. Die Ionen lösen eine Elektronenkaskade im Detektor aus, dessen Signal nach Verstärkung und Filterung aufgenommen wird. Die heute erhältlichen Systeme verfügen



über eine hohe Ionentransmission von der Ionenquelle bis zum Detektor und sind im Regelfall leicht zu fokussieren und zu kalibrieren. Desweiteren verfügen sie über eine große Stabilität im Dauerbetrieb.



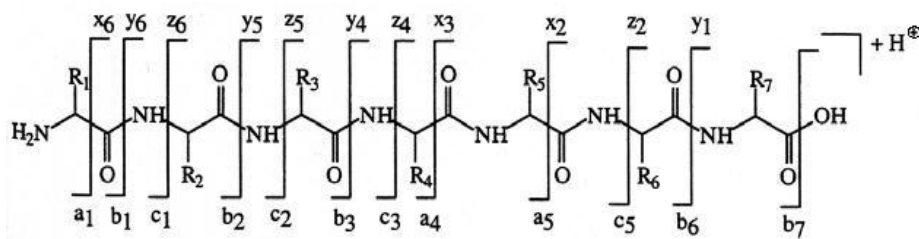
**Abbildung 9:** Elektrodenform und -anordnung in einem Quadrupol-Massenfilter [Eckerskorn, C. 1998].

Eine weitere Alternative für die Massenanalyse von durch ESI-Technik erzeugten Ionen stellt die ebenfalls von Paul entwickelte elektrische Ionenfalle (*ion trap*) dar. Das Prinzip ähnelt dem der Quadrupoltechnik. Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen, an denen Wechselspannung angelegt wird. In den Endkappen befinden sich außerdem kleine Öffnungen, durch die der Ein- bzw. Austritt der Ionen erfolgen kann. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld eingefangen und für variable Zeiten (Mikrosekunden bis Sekunden) auf stabilen Bahnen gehalten. Durch Variation der Amplitude der angelegten Hochfrequenz verlieren die Ionen nach und nach ihren Stabilitätszustand innerhalb der Falle, werden durch die Öffnungen herausgeschleudert und können dann durch Auftreffen auf dem Detektor nachgewiesen werden.

### 1.5.3 Sequenz- und Strukturanalysen von Peptiden mit massenspektrometrischen Methoden

Ein wesentlicher Vorteil der hier dargestellten hochauflösenden massenspektrometrischen Techniken ist die Möglichkeit, bei entsprechender Ausstattung des Massenspektrometers auch Analysen der Sequenz und der Struktur eines Peptids oder von anderen biologischen Makromolekülen durchführen zu können [Carr, S.A. *et al.* 1991; Fenyó, D. *et al.* 1998; Pitt, A. 1998]. Zu diesem Zwecke ist keine völlige Aufreinigung des Peptids wie etwa beim Edman-Abbau notwendig; selbst aus komplexen Peptidgemischen lassen sich gezielt und schnell Massen herausfiltern und fragmentieren. Mit geringen Probenmengen bis hinunter in den femtomol-Bereich lassen sich spezifische Spaltprodukte erzeugen, über die eine schnelle Analyse des gesuchten Peptids möglich ist [Blackburn, R.K. *et al.* 1997]. Die einzelnen Methoden bzw. Techniken werden in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert.

Bei den unterschiedlichen Fragmentierungstechniken treten bevorzugt Bindungsbrüche am sogenannten *backbone* des Peptids auf, also an den Bindungen entlang der Peptidkette. Diese lassen sich in drei Arten einteilen. Die vom Carbonyl-Kohlenstoff ausgehende C-C- und die C-N-Bindungen (die eigentliche Peptidbindung) und die weitere vom Amidstickstoff ausgehende N-C-Bindung. Diese Bindungsbrüche können vom N- und C-terminalen Ende des Peptids auftreten. Sie heißen, je nach Verbleib der Ladung, nach der allgemein verwendeten Nomenklatur von Roepstorff und Fohlman, die später von Biemann modifiziert wurde, entsprechend *a*-, *b*- und *c*- für N-terminale bzw. *x*-, *y*- und *z*-Serien für C-terminale Fragmente [Biemann, K. 1988; Roepstorff, P. *et al.* 1984].



**Abbildung 10:** Mögliche Fragmente eines protonierten, linearen Peptids nach der oben beschriebenen Biemann-Nomenklatur.

Des Weiteren können, vor allem bei komplexeren Molekülstrukturen, *interne Fragmente* auftreten, die durch zwei Bindungsbrüche entstehen. Diese Fragmente enthalten also weder das C- noch das N-terminale Ende des Peptids. Fragmentierungen der Seitenketten werden unter den angewandten Niedrigenergie-Stoßbedingungen praktisch nicht beobachtet. Frag-

mente können sowohl unter Ladungserhalt als auch unter Ladungsverlust entstehen. Vermutlich sind die Ladungen häufig auf basischen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin lokalisiert, sie können aber auch delokalisiert über die gesamte Peptidkette vorliegen.

Bei der massenspektrometrischen Bestimmung von disulfidverbrückten Peptiden kommt es aufgrund der hohen Stabilität der Brücken zu erschwerten Analysebedingungen. Es entstehen durch die kollisions-induzierte Fragmentierung im Massenspektrometer interne Molekülfragmente, die keine durchgehenden Sequenzabfolgen enthalten. Zudem ist durch die stabile Struktur die Zugänglichkeit der Peptidbindungen im Molekül eingeschränkt, was die Fragmentierung zusätzlich erschwert. Die entstehenden Fragmente sind demzufolge häufig aus disulfid-verbrückten Bruchstücken aufgebaut, welche die Auswertung der Daten sehr erschweren können [Papayannopoulos, I.A. 1995]. Ein weiteres Problem stellen die zur Identifizierung der Peptide notwendigen Recherchen in Protein-Datenbanken dar. Für die Berechnung der internen Fragmente stehen zur Zeit noch keine geeigneten Suchalgorithmen zur Verfügung. Zudem kommt es aufgrund der nicht bekannten Anzahl der Cysteinreste und des Verbrückungsgrades der gesuchten Peptide zu ungenauen Massenangaben, die die Suche zusätzlich beeinträchtigen. Aus den genannten Gründen ist es erforderlich, cysteinhaltige Peptide bzw. Proteine vor der Bestimmung zu reduzieren und die freien Sulfhydrylgruppen chemisch so zu verändern, dass eine Charakterisierung möglich wird. Es müssen also im Rahmen des *Peptide Trappings*, bei dem es um eine systematische Charakterisierung aller Peptide in einer ausgewählten biologischen Quelle geht, geeignete Methoden zur Probenvorbereitung von cysteinhaltigen Peptiden in komplexen Gemischen etabliert werden.

Für die Auswertung und Interpretation der Fragmentspektren gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Literatur, Programmen und Datenbanken, welche die manuelle und automatische Auswertung der erzeugten Fragmentspektren ermöglichen [Murray, K.K. 1999; Papayannopoulos, I.A. 1995].

### ***1.5.3.1 Fragmentationenanalyse mit dem MALDI-TOF-MS***

Sequenzanalysen an kleineren Peptiden mit einem Molekulargewicht bis etwa 3000 Da kann man mit entsprechend ausgestatteten MALDI-TOF-Geräten durchführen, bei denen die Flugstrecke über einen sogenannten Reflektor (elektrischer Spiegel) verfügt. Durch diesen speziellen Aufbau der Flugröhre lassen sich Fragmentationen analysieren, welche durch metastabilen Zerfall nach dem Passieren der Beschleunigungselektrode gebildet werden. Diese in

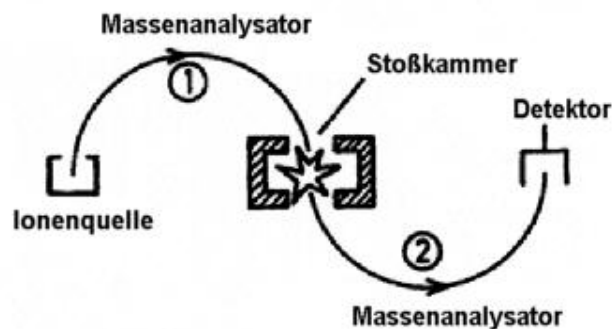
der freien Driftstrecke erzeugten Ionen können durch stufenweises Absenken der Reflektorspannung nachgewiesen werden. Der als PSD (*post source decay*) bezeichnete Prozess wird durch die Aufnahme hoher Energien durch Stossaktivierungsprozesse innerhalb der Matrixwolke induziert, welche sich unmittelbar nach dem Auftreffen des Laserimpulses über der Probe bildet [Chaurand, P. *et al.* 1998; Kaufmann, R. *et al.* 1996]. Zusätzlich kann ein Stoss-gas zugefügt werden. Das Ausmass der Fragmentierung läßt sich durch die Auswahl der Matrix, durch die verwendete Beschleunigungsspannung sowie durch die Veränderung des Zeitabstandes zwischen Laserpuls und Ionenextraktion variieren. Diese Technik ist in der vorliegenden Arbeit nicht eingesetzt worden und wird daher an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt. Sie soll aber bezüglich massenspektrometrischer Sequenzierungsverfahren der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

### 1.5.3.2 Tandem-Massenspektrometrie mit Elektrospray-Geräten

Aus den während des Ionisierungsprozesses im ESI-MS entstehenden geladenen Peptidmolekülen lassen sich durch Kollisions-Aktivierung Fragmentionen erzeugen (CID: *collision-induced dissociation* oder CAD: *collisional activated dissociation*) [Gaskell, S. *et al.* 1988; Hayes, R.N. *et al.* 1990]. Die Aktivierung bzw. erforderliche Energieaufnahme erfolgt über Stöße mit inerten Gasmolekülen. Der Prozess kann als ein Zwei-Stufen-Mechanismus aufgefasst werden, bei welchem die zu fragmentierenden Ionen zuerst durch die Kollisionen infolge der dadurch zugeführten Translationsenergie in einen schwingungsangeregten Zustand versetzt werden [Mc Luckey, S. 1992; Shukla, A. *et al.* 1993]. Durch die verursachten, intramolekularen Schwingungen finden schließlich struktursignifikante Fragmentierungsreaktionen statt. Je nach Ladungszustand der Vorläuferions und der Lokalisation der Ladung im Molekül entstehen dabei geladene und neutrale Fragmente, welche in Folgestößen weiter zerfallen können.

Voraussetzung für diese auch als MS/MS-Methoden bezeichneten Verfahren sind Geräte mit einer Anordnung von zwei hintereinander geschalteten Massenanalysatoren, zwischen denen eine Kollisionszelle (Stosskammer) geschaltet ist. In Abbildung 11 ist das Schema vereinfacht dargestellt. Bei der gängigen Methode, der sogenannten Produkt-Ionen-Analyse (*Product Ion Scan*) wird im ersten Massenanalysator das Ion mit einem bekannten  $m/z$ -Verhältnis gescannt bzw. gefiltert und danach in eine gasdurchlässige Kollisionszelle überführt und fragmentiert. Als Kollisionsgase kommen Stickstoff sowie die Edelgase Helium oder Argon zum Einsatz. Im zweiten Massenanalysator findet im Anschluss die Analyse der gebildeten Fragmentionen

statt. Die verwendeten Massenanalysatoren sind entweder gleicher Natur, sie können sich aber auch in ihrem technischen Aufbau voneinander unterscheiden.

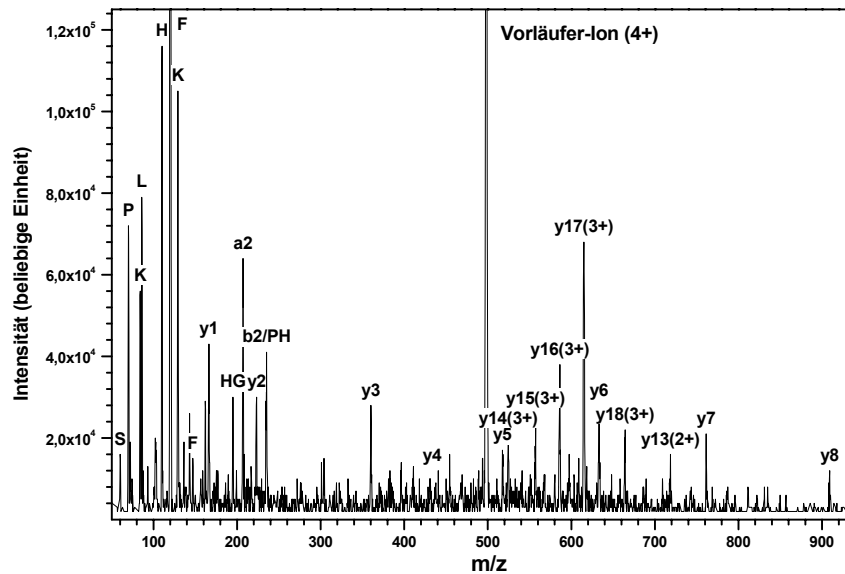


**Abbildung 11:** Allgemeines, vereinfachtes Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie [Lehmann, W.D. 1996].

Bei den Triple-Quadrupol-Massenspektrometern sind drei Quadrupole hintereinander geschaltet. Im ersten Quadrupol findet das Scannen oder Selektieren der Ionen durch variable Einstellung der Parameter statt. Der zweite, gasdurchlässige Quadrupol fungiert als Kollisionskammer und führt durch den variierbaren Einlass des Stossgases zu den Fragmentionen. Im dritten Quadrupol findet schließlich die Massenanalyse statt. Da die Ionen in einem Quadrupol-Analysator nur über eine geringe kinetische Energie von wenigen Elektronenvolt verfügen, werden sie vor der Stoßaktivierung zusätzlich beschleunigt, um die Fragmentierungseffizienz zu erhöhen. In den letzten Jahren wurden außerdem sogenannte Quadrupol-TOF-Geräte entwickelt, die statt einem letzten Quadrupol einen Flugzeitanalysator (*time-of-flight*) zur Bestimmung der Fragmentionen besitzen.

Eine weitere Möglichkeit zur Sequenzanalyse bietet die beschriebene elektrische Ionenfalle (*ion trap*), die in der vorliegenden Arbeit neben anderen Sequenzierungstechniken zur Identifizierung von cysteinhaltigen Peptiden eingesetzt wurde. Die Fragmentierung der Ionen findet innerhalb der Ionenfalle mit Hilfe eines inerten Kollisionsgases statt. Als solches wird hier Helium verwendet. Das zu fragmentierende Ion wird in der Falle isoliert, indem durch Variation eines definierten Spannungs- und Frequenzbereiches alle nicht interessierenden Ionen selektiv instabil gemacht werden. Diese verlassen ihre stabilen Bahnen und werden, sortiert nach aufsteigendem  $m/z$ -Wert, aus der Ionenfalle entfernt und lassen nur das zu fragmentierende Ion zurück. Nach der Fragmentierung werden die Tochterionen auf die gleiche Weise wie oben beschrieben aus der Falle entfernt und durch Auftreffen auf einen Detektor nachgewiesen. Die Abbildung 12 zeigt als Beispiel ein typisches Fragmentspektrum eines vierfach geladenen Vorläuferions, welches als Fragment aus dem Protein Serotransferrin aus Blutfiltrat

identifiziert werden konnte.



**Abbildung 12:** Fragmentspektrum eines Peptids aus Serotransferrin mit einer Masse von 1990,6 für  $M+H^+$ . Fragmentiert wurde das vierfach geladene Vorläuferion mit einem  $m/z$ -Wert von 498,4.

Neben der Analyse der Aminosäuresequenz lassen sich strukturelle Besonderheiten wie posttranslationale Modifizierungen mit den genannten Fragmentierungstechniken identifizieren und die entsprechenden Peptide aus komplexen Peptidgemischen detektieren [Annan, R.S. *et al.* 1997; Kuster, B. *et al.* 1998]. Für die Analyse von cysteinhaltigen und disulfidverbrückten Peptiden bieten sich die vorgestellten massenspektrometrischen Fragmentierungstechniken ebenfalls an [Jones, M.D. *et al.* 1998; Svoboda, M. *et al.* 1995; Wu, J. *et al.* 1996]. Sie sind in dieser Arbeit in verschiedenen Variationen eingesetzt worden. Darüberhinaus lassen sich mit entsprechend ausgestatteten Geräten sogenannte Vorläufer-Ionen-Analysen (*Parent* oder *Precursor Ion Scans*) durchführen [Neubauer, G. *et al.* 1997; Wilm, M. *et al.* 1996]. Dabei wird der umgekehrte Weg im Massenspektrometer beschritten: die Ionen des gesamten Massenbereiches werden durch den ersten Massenanalysator transferiert. Die Ionen erreichen sequentiell die Kollisionskammer, in der sie nacheinander fragmentiert werden. Der zweite Massenanalysator ist auf eine bestimmte, ausgewählte Fragmentmasse eingestellt, so daß hier nur Ionen detektiert werden können, wenn der erste Analysator die entsprechenden Vorläufer-Ionen dieser Fragment-Ionen in die Kollisionskammer transferiert hat. Mit der beschriebenen Technik können Peptidmodifizierungen wie zum Beispiel Glycosylierungen, Phosphorylierungen oder Pyroglutamylpeptide über spezifische Produkt-Ionen aus einem Gemisch heraus identifiziert werden [Burlingame, A.L. 1996].

## 2. Aufgabenstellung

Gegenstand dieser Dissertation ist die Erarbeitung und Etablierung von Methoden zur Probenvorbereitung, zum selektiven Nachweis und zur Anreicherung und Isolierung von Peptiden mit besonderen strukturellen Merkmalen aus hochkomplexen, biologischen Flüssigkeiten. Als Musterbeispiel dienen dafür die cysteinhaltigen Peptide, die aufgrund ihrer posttranslationalen Ausbildung von Disulfidbrücken besondere Moleküleigenschaften aufweisen. Diese bedürfen im Rahmen einer systematischen Routine-Identifizierung von Peptiden aus ausgesuchten biologischen Quellen einer besonderen Behandlung, um sie der Analyse zugänglich zu machen.

Zentrales Untersuchungsmedium stellt dabei eine Peptidbank aus humanem Blutfiltrat dar, welche im Rahmen meiner Diplomarbeit am Niedersächsischen Institut für Peptidforschung in Hannover (eingereicht 1998 an der Universität Hannover) präpariert wurde und der Firma BioVisioN AG für Untersuchungszwecke zur Verfügung gestellt wurde. Darüber hinaus werden Proben aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit untersucht.

Als präparative und analytische Basismethoden kommen hauptsächlich chromatographische Trennverfahren (*Reversed Phase* HPLC, Ionenaustauscher-Chromatographie, Kovalente Chromatographie) sowie verschiedene massenspektrometrische Analyse-Techniken wie ESI-MS und MALDI-TOF-MS zum Einsatz. Die Grundlage für die Charakterisierung von cysteinhaltigen Peptiden bilden dabei verschiedene chemische Modifizierungstechniken.

Neben der Darstellung verschiedener Techniken zur Detektion cysteinhaltiger Peptide in komplexen Gemischen soll eine Kartierung der Cysteinylpeptide aus der Peptidbank aus humanem Blutfiltrat erfolgen. Darüber hinaus soll an ausgewählten Beispielen der isolierten Peptide die Effizienz der verschiedenen entwickelten Methoden aufgezeigt und diskutiert werden.

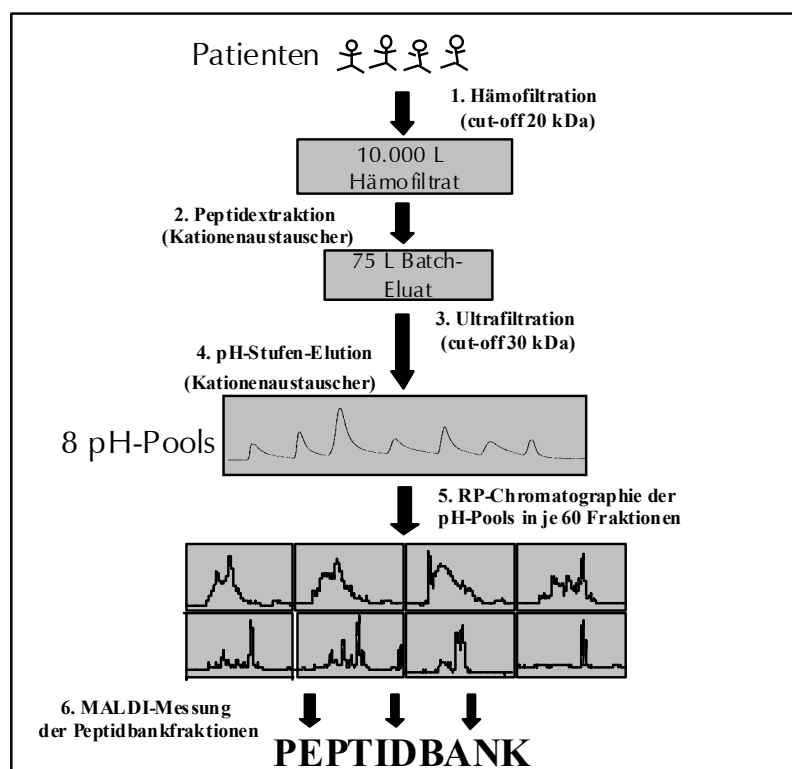
### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Peptidbank aus humanem Blutfiltrat

Da Blut für die Isolierung und Charakterisierung von Peptiden nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt werden kann, musste für die Herstellung der Peptidbank eine alternative Quelle in Anspruch genommen werden. Die Präparation dieser Peptidbank erfolgte aus Hämofiltrat, welches bei der Blutentgiftung von chronisch niereninsuffizienten Patienten entsteht. Sie ist im Rahmen meiner Diplomarbeit am Niedersächsischem Institut für Peptid-Forschung (IPF) in Hannover entstanden und dokumentiert worden, und dient seither der Firma BioVisioN AG als eine der Hauptquellen zur Identifizierung und Kartierung von Blut-peptiden [Neitz 1998].

Das IPF erhält das Hämofiltrat aus dem Nephrologischen Zentrum Niedersachsen (NZN) in Hannoversch-Münden, wo es in großen Mengen von etwa 2000 L/Woche anfällt. Dort wird es in Tanks gesammelt, sofort auf 4 °C heruntergekühlt und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 2.6 eingestellt, um enzymatische Abbauprozesse durch Proteasen zu verhindern.



**Abbildung 13:** Schematischer Überblick über die Vorgehensweise bei der Herstellung der Peptidbank 970303 aus 10.000 L humanem Blutfiltrat. Nach Gefriertrocknung stehen die RP-Fraktionen als Peptidbank für weitere Anwendungen zur Verfügung.



Das in Abbildung 13 dargestellte Schema der Peptidbank-Präparation erfolgte aus 10.000 L Hämofiltrat und enthält nach Ultrafiltration und verschiedenen chromatographischen Trennschritten über 500 gefriergetrocknete Fraktionen mit Peptiden, die bei -20 °C gelagert werden. Aus den einzelnen Fraktionen werden nach Bedarf die geeigneten Mengen entnommen und zur weiteren Verarbeitung im entsprechenden Lösungsmittel aufgenommen. Diese Peptidbank wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit der Bezeichnung 970303 gekennzeichnet.

Neben den Proben aus der Peptidbank sind zudem Aliquots aus den kompletten pH-Pools eingesetzt worden, die bei der Präparation der Peptidbank für Testzwecke zurückbehalten wurden.

### 3.1.2 Humane Cerebrospinalflüssigkeit

Humane Cerebrospinalflüssigkeit (CSF, Liquor cerebrospinalis) wird durch Lumbalpunktion am Patienten gewonnen, indem man mit einer langen Nadel zwischen die Dornfortsätze des 3. und 4. Lendenwirbels sticht und zwischen den benachbarten Wirbelbögen durch den mit Fettgewebe gefüllten Epiduralraum, die harte Rückenmarkshaut und die Spinnwebhaut in den Subarachnoidalraum (Liquorraum) gelangt. Die hier verwendeten Proben wurden von der Abteilung Neurologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Nach Entnahme werden die Proben bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die Peptid- und Proteinextraktion wurde ein 100 mL Äquivalent mit 1 molarer Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt und soweit verdünnt, bis eine Leitfähigkeit von 3,5 mS erreicht war. Das Material wurde auf eine Kationenaustauscher-Säule (TSK SP 650 (S), 20 x 100 mm; TosoHaas, Stuttgart) aufgetragen und im Batch-Verfahren zuerst mit 2 M Natriumchlorid/20 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 2,6 und danach mit 1 M Ammoniumacetat eluiert. Beide Eluate wurden vereinigt, angesäuert und über eine *Reversed Phase*-Säule (Source RPC 15; 20 x 100 mm, 15 µm, Amersham Pharmacia, Freiburg) in einem Kurzgradienten (0-100 % B in 1 Minute) entsalzt. Vor der weiteren Verwendung wird das Material gefriergetrocknet und bei - 80 °C gelagert.

### 3.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien für massenspektrometrische Methoden und *Reversed Phase* Chromatographie

Alle Chemikalien besitzen die Reinheitsqualität *pro analysi*. Abweichungen davon werden in den jeweiligen Listen angegeben. Alle Prozentangaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf Volumenprozent.

- Acetonitril, *gradient grade* (Merck, Darmstadt)
- Trifluoressigsäure, *sequencing grade* (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- *alpha*-Cyano-4-hydroxymethylsäure ( $\alpha$ CHC), Reinheitsgrad 97 % (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen)
- Sinapinsäure, *purum* (Fluka, Neu-Ulm)
- L-Fucose, Reinheitsgrad 99 % (Sigma-Aldrich Chemie)
- Ameisensäure, 98-100% (Merck)
- Methanol, *gradient grade* (Merck)

### 3.1.4 Chemikalien und Medien für die kovalente Chromatographie

- Thiopropyl Sepharose 6B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- Mobicol-Leersäulen in den Größen 1 mL, 5 mL, 1,5 mL und 10 mL (MoBiTec; Göttingen)
- Natriumchlorid (Fluka)
- Tris-HCl (Fluka)
- EDTA (Fluka)
- Salzsäure, 33 % (Merck)
- 1, 4-Dithiothreitol (DTT, Cleland's Reagenz), *for biochemistry* (Sigma-Aldrich Chemie)

### 3.1.5 Chemikalien für die Reduktion, Oxidation und Modifizierung von Cysteinen

- 1,4-Dithiothreitol (Merck)
- Tris-(2-carboxyethyl)phosphin, TCEP (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
- 4-Methylmorpholin (Merck)
- 2-Iodacetamid (Merck)
- Essigsäure, 96 % (Merck)

- Ammoniumhydrogencarbonat (Fluka)
- Guanidinium-HCl (Fluka)
- Tris-HCL (Fluka)
- Aceton (Merck)
- Hexan (Merck)
- Ethylacetat (Applied Biosystems)
- 4-Vinylpyridin (Sigma-Aldrich Chemie)
- N-(4-Dimethylamino-azobenzol-4-)iodacetamid (DABIA) (Fluka)
- ICAT™ (Isotope-coded affinity tags) Kit for Protein Labeling, Monoplex Version (Applied Biosystems)

### 3.1.6 Chemikalien und Materialien für die Entsalzungen der Proben

- Poros 50 R2 (Applied Biosystems)
- MultiGuard Filtertips (Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA)
- Kartuschen zur Festphasenextraktion: Bond Elut und Mega-Bond Elut C18-Kartuschen in den Größen 200 mg, 500 mg und 5 g (Varian, Darmstadt)
- Methanol, Acetonitril, TFA

### 3.1.7 Chemikalien für die Kapillarzonenerelektrophorese

- *ortho*-Phosphorsäure, 85 % (Fluka)
- Hydroxypropylmethylcellulose (Fluka)
- Natriumhydroxid (Fluka)

### 3.1.8 Chemikalien für den Bradford-Test

- Roti-Nanoquant (Roth, Karlsruhe)
- Roti-Quant (Roth)
- Bovines Serumalbumin (Roth)

### 3.1.9 Peptidstandards

#### 3.1.9.1 Standards für massenspektrometrische Methoden

Die Peptidstandards werden für externe Kalibrierungen für Analysen im MALDI-TOF-MS eingesetzt. Dafür werden die Peptide aus Tabelle 1 zu den entsprechenden Konzentrationen in 0.1 % TFA in 50 % Acetonitril gelöst.

Der gleiche Standardmix, ausgenommen des Insulins, wurde für die Kalibrierung des ESI-Quadrupol-TOF-Massenspektrometers verwendet, wobei hier alle Peptide in einer Konzentration von 1 pmol/ $\mu$ L eingesetzt wurden.

Peptid	Konzentration [pmol/ $\mu$ L]	Mittleres MW als [M+H] <sup>+</sup>	Monoisotopisches MW als [M+H] <sup>+</sup>
Insulin (bovin)	10	5734,59	5730,61
ACTH 7-38 (human)	2	3660,16	3657,93
Neurotensin (human)	1	1673,97	1672,92
Angiotensin I (human)	1	1297,44	1296,69
Bradykinin (human)	1	1061,22	1060,58

**Tabelle 1:** Standardpeptide für die Kalibrierung der massenspektrometrischen Messungen. Alle Peptide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

#### 3.1.9.2 Cysteininhaltige Standards zum Testen der verwendeten Modifizierungsreagenzien

Als Standardproben wurden hauptsächlich Fraktionen der Peptidbank 970303 benutzt, die bekannte cysteininhaltige Peptide enthalten oder Einzelpeptide, die daraus aufgereinigt wurden. Daneben wurden für einige Anwendungen die in der Tabelle 2 aufgeführten Peptide eingesetzt.

Peptid	Mittleres MW als [M+H] <sup>+</sup>	Hersteller
Insulin (bovin)	5734,59	Sigma-Aldrich
Brain Natriuretic Peptide (human)	3464,08	Bachem Biochemica, (Heidelberg)
Urodilatin (human)	3506,90	Bachem Biochemica

**Tabelle 2:** Verwendete, cysteininhaltige Peptidstandards für die Anwendung von verschiedenen Modifizierungsreagenzien.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Chromatographische Methoden

#### 3.2.1.1 Reversed Phase Chromatographie

Die *Reversed Phase* Chromatographie wird zur Auftrennung von komplexen Peptidgemischen bzw. zur Reindarstellung einzelner Peptide eingesetzt. Alle präparativen, chromatographischen Trennungen werden – wenn nicht anders erwähnt - auf einer Chemstation HP1100 (Agilent Technologies, Waldbronn) durchgeführt, die wahlweise mit einem als Mehrkanal-UV-Detektor verwendeten Dioden-Array-Detektor (DAD) oder einem variablen Wellenlängen-Detektor (VWD) ausgestattet ist. Die UV-Absorption wird beim DAD bei den Wellenlängen 214 und 280 nm, beim VWD bei 214 nm aufgenommen. Die Anlage ist ausserdem mit einem Säulenofen ausgestattet, der die Säulen während der Trennungen auf einer konstanten Temperatur von 33 °C hält.

Die Proben werden im Laufmittel A gelöst oder verdünnt und manuell über ein Rheodyne-Ventil (Abimed, Langenfeld) injiziert. Als wässriges Laufmittel A dient, wenn nicht anders erwähnt, bei allen Trennungen 0,06 % TFA. Als organische Phase (Laufmittel B) für die Gradientenelution wird 0,05 % TFA in 80 % Acetonitril eingesetzt. Die verwendeten Flussraten werden je nach Säulengröße variiert und können der Tabelle 3 entnommen werden. Die chromatographischen Trennungen werden mit einem Gradienten durchgeführt, bei welchem der Anstieg 0,5-1 % des Laufmittels B pro Minute beträgt. Nach einer kurzen Äquilibrierungsphase von 5-10 Minuten, bei der die Säule mit 100 % Laufmittel A gespült wird, wird der Gradient gestartet.

Nr.	Hersteller (Ort)/Säulentyp	Phase	Größe [mm]	Korn-/Porengröße	Flußrate [mL/min]
1	Dr. A. Maisch (Ammerbusch)/ Reprosil pur - AQ	RP C18	4,0 x 250	5 µm	1,0
2	Phenomenex (Hösbach)/Jupiter	RP C4	4,6 x 250	5 µm/300 Å	1,0
3	Phenomenex (Hösbach)/Jupiter	RP C5	4,6 x 250	5 µm/300 Å	1,0
4	Phenomenex (Hösbach)/Jupiter	RP C18	4,6 x 250	5 µm/300 Å	1,0
5	Dr. A. Maisch (Ammerbusch)/Vydac 218TP510	RP C18	4,0 x 250	5 µm/300 Å	1,0
6	Phenomenex (Hösbach)/Nucleosil	RP C18	2,0 x 250	5 µm/100 Å	0,4
7	Dr. A. Maisch (Ammerbusch)/Reprosil pur - AQ	RP C18	10 x 250	5 µm	2,5 – 4,0
8	Phenomenex (Hösbach)/Jupiter	RP C4	10 x 250	5 µm/300 Å	2,5 – 4,0
9	Amersham Pharmacia (Freiburg)/15RPC Source	Styrol-Divinylbenzol	4,0 x 150	15 µm/	0,5

**Tabelle 3:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Trennsäulen für die *Reversed Phase* Chromatographie von humanem Blutfiltrat und Cerebrospinalflüssigkeit.

Bei Peptid-Aufreinigungen bis zur Reindarstellung, bei denen mehr als ein Chromatographie-Schritt notwendig ist, werden RP-Säulen verschiedenen Typs miteinander kombiniert. Die Aufreinigungskontrollen erfolgen mit dem MALDI-TOF-MS, wobei Aliquots aller gesammelten Fraktionen gemessen werden und so die aufzureinigenden Peptide mit ihrer charakteristischen Molekülmasse verfolgt werden können.

Das Sammeln der Proben erfolgt mit einem Fraktionssammler des Typs 2110 (Biorad, München) in Schritten von 0,5-1 min/Fraktion in Eppendorf-Gefäße (1,5 oder 2,0 mL) oder mit einem Fraktionssammler der Firma Gilson (Abimed Analysen-Technik, Langenfeld) in Mikrotiterplatten im *96-well*-Format.

Des Weiteren wurde Cerebrospinalflüssigkeit nach Katex- und RP-Batch (wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben), welche im 1000 mL-Maßstab auf einer RP-Säule (Source 15 RPC; 20 x 250 mm, Amersham Pharmacia) gradienteneluiert wurde, verarbeitet. Die präparative Trennung erfolgte auf einer Chromatographie-Anlage des Typs *Vision Workstation* (Applied Biosystems) mit einem Fluss von 20 mL/min. Als mobile Phasen dienten die Standardlaufmittel A und B. Das Absammeln der Fraktionen 1-96 erfolgte in Schritten von 0,75 Minuten, die UV-Detektion wurde bei 214 und 280 nm aufgenommen. Gradient: 5-50 % B in 62 Minuten, 50-100 % B in 6 Minuten. Von den RP-Fraktionen werden für verschiedene Anwendungen Aliquots abgenommen und lyophilisiert.

### ***3.2.1.2 Kovalente Chromatographie mit Thiopropyl Sepharose***

Zur Abtrennung und Anreicherung der cysteinhaltigen Peptide aus komplexen Peptidgemischen wird eine Affinitätstrennung durchgeführt. Das verwendete Material Thiopropyl Sepharose 6B besitzt als reaktive Gruppe 2-Pyridyldisulfid, an welche die Sulfhydrylgruppen der reduzierten Cysteine unter entsprechenden Bedingungen kovalent gebunden werden. Dabei entstehen am Packungsmaterial unter Freierdung von 2-Thiopyridon Mischdisulfide [Brandt, J. *et al.* 1977]. Die Elution erfolgt mit einem ein Reduktionsmittel enthaltenen Puffer, welcher die gebildeten Disulfidbrücken wieder spaltet.

Das mit Wasser vorgequellte Gel wird zur Entfernung der vorhandenen Additive mit viel Wasser gewaschen. Danach wird mit etwa 2-3 Säulenvolumina gut entgastem Bindungspuffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, pH 7,5) konditioniert. Die Proben müssen vor dem Auftrag reduziert, entsalzt und nach Gefriertrocknung in Bindungspuffer gelöst werden. Generell ist bei der gesamten Durchführung darauf zu achten, dass die Puffer

stets gut entgast sind, um die Reoxidation der Disulfide zu vermeiden. Mit einem Milliliter des gebrauchsfertigen Gelmaterials lassen sich je nach Cysteingehalt der Probe ca. 10-20 mg Peptid oder Protein binden. Die Probenlösung wird etwa in einem Volumenverhältnis 1:3 zum Gel auf die Säule aufgetragen.

Nach einer Inkubation von einer Stunde wird mit Bindungs-Puffer gewaschen, um alle cysteinfreien Peptide zu entfernen. Die Elution erfolgt mit einem reduzierenden Puffer aus 20 mM DTT, 100 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, pH 7,5. Dieser muss stets frisch verwendet und entgast werden. Für die weitere Verarbeitung wird das Eluat je nach Proteinmenge nach den entsprechenden Protokollen entsalzt und S-carboxyamidomethyliert.

### 3.2.2 Massenspektrometrische Methoden

#### 3.2.2.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Messungen werden auf einem *Voyager-DE STR* (Applied Biosystems) im Linear- sowie Reflektron-Modus durchgeführt. Die Länge der Flugstrecke beträgt im linearen Modus 2 m und im Reflektron-Modus 3 m. Das Gerät ist mit einem 337 nm Stickstofflaser ausgestattet, der auf eine Pulslänge von 3 ns bzw. 10 ns eingestellt ist.

Positive Ionen werden je nach ausgewählter Methode mit 20 bzw. 25 kV beschleunigt und mit einer Kombination aus Microchannelplate und Sekundärelektronenvervielfacher detektiert. Das verwendete Massenspektrometer ist mit der *delayed extraction*-Technologie (DE) ausgestattet, mit der eine höhere Massenauflösung erreicht wird. Das elektrische Feld wird dabei über der Probenfläche zeitversetzt zum Desorptionslaserimpuls, d.h. zur Beschleunigungsspannung, eingeschaltet, wodurch die Ionen auf eine annähernd gleiche Startgeschwindigkeit gebracht werden. Durch diese verzögerte Ionenextraktion können inhomogene Verteilungen der Ionen weitgehend ausgeglichen werden, was die Erhöhung der Massenauflösung zur Folge hat. Die Energie des Lasers ist über eine mechanische Blende variierbar und wird so eingestellt, dass sie eine nur leicht über der zur Ionisierung der Probenmoleküle benötigten Intensität besitzt. Das Vakuum in der Probenkammer beträgt etwa  $2,7 \times 10^{-5}$  Pa und in der Flugröhre  $6,7 \times 10^{-7}$  Pa.

Die Proben werden auf eine mit 100 Positionen ausgestattete, spiegelpolierte Edelstahlplatte aufgetragen, auf der nur die inneren 64 Positionen bestückt werden. Der Proben- und Matrixauftrag wird manuell oder mit dem Pipettierroboter *SymBiot I* (Applied Biosystems) im modifizierten *dried droplet*-Verfahren durchgeführt [Beavis, R.C. und Chait, B.T. 1996]: nach

Aufbringen von 0,5 µL Matrixlösung (je 5 oder 10 g/L αCHC plus L-Fucose in 50 % Acetonitril/0,1 % TFA) wird das gleiche Volumen der Probe auf die noch feuchte Matrix pipettiert und durch zweimaliges Aufziehen in die Pipettenspitze vermischt. Das Trocknen der Proben erfolgt in einem beschleunigtem Luftstrom bei Raumtemperatur. Die Kalibrierungsstandards werden jeweils in die Mitte zwischen vier Probenpositionen auf die gleiche Weise pipettiert. Bei späteren Messungen wurden der Matrix zur Kontrolle der automatisierten Probenauftrags- und Messmethoden die beiden Peptide Bradykinin und Angiotensin-I zu je 10 fmol/µL als interne Standards zugesetzt. Wird Sinapinsäure als Matrixsubstanz verwendet, wird der Auftrag nach dem gleichen Protokoll durchgeführt.

Alle Messungen werden in einem automatischen Messmodus durchgeführt, dessen Parameter im Verlauf dieser Arbeit immer wieder leicht abgeändert und angepasst wurden.

Bei den Messungen fährt der Laserstrahl die einzelnen Probenspots ab und nimmt jeweils pro Spot eine bestimmte Zahl von Messungen nach einem definierten Abtastmuster auf. Pro Messung wird eine vorgegebene Anzahl von Scans (zwischen 30 und 50) aufsummiert und anschliessend für die Datenspeicherung akkumuliert. Die Parameter der verwendeten Messmethoden wie etwa die verwendete Laserintensität sind an komplexe Peptidgemische angepasst [Jürgens, M. 1999].

Die primäre Signalverarbeitung und Digitalisierung erfolgt mit einem Digitalspeicher-Oszilloskop TDS 540A (Tektronix, Beaverton, Oregon, USA), welches wie die gesamte Datenaufnahme über die Software *Voyager RP BioSpectrometry Workstation* (Applied Biosystems) gesteuert wird. Die Auswertung von Einzelspektren wurde anfangs mit der Software *GRAMS/386*, Version 3.01 (Galactic Industries, Salem, NH, USA) durchgeführt. Zu späteren Zeitpunkten der Arbeit stand die neue Software *Data Explorer*, Version 3.2 (Applied Biosystems) für die Auswertung zur Verfügung.

### **3.2.2.2 Elektrospray-Quadrupol Ion Trap Tandem-Massenspektrometrie (ESI-QIT-MS)**

Die zu analysierenden Proben werden aus verschiedenen Ansätzen für die Messungen in 1 % Ameisensäure in 50 % Methanol gelöst. Die Messungen werden auf einem Finnigan LCQ Iontrap Massenspektrometer (ThermoFinnigan, San Jose, USA) je nach der Art der vorliegenden Proben automatisch im Elektrospray- oder manuell im Nanospray-Modus durchgeführt.

Im ESI-Mode erfolgt die Probenzuführung mit der entsprechenden Quelle (Protana, Odense,



Dänemark) automatisch über einen Autosampler des Typs *Endurance* (LC Packings, Amsterdam, Niederlande), der über eine *fused silica*-Kapillare (Durchmesser 75  $\mu\text{m}$ ) mit der Ionenquelle verbunden ist. Das variierbare Injektionsvolumen beträgt in der Regel 10  $\mu\text{L}$  und wird mit einer Flussrate von 4-5  $\mu\text{L}/\text{min}$  zur Ionenquelle transportiert. Die eingestellte Nadelspannung beträgt 4,5 kV, die Kapillartemperatur 200  $^{\circ}\text{C}$ . Die Werte der Kollisionsenergie variieren zwischen 28 und 35 % in Abhängigkeit des Ladungszustandes eines Iones. Als Kollisionsgas findet hier hochreines Helium Verwendung. Pro Injektion werden vier Fragmentspektren aufgenommen, in denen jeweils eine Anzahl von 12 Einzelspektren aufsummiert werden. Die verwendeten Precursor-Ionen werden automatisch aus den intensivsten Signalen der Peaklisten aus den vorher durchgeführten Reflektron-Messungen im MALDI-TOF-MS entnommen. Für die Übertragung der Daten in die Steuersoftware *Xcalibur* (Version 1.0, ThermoFinnigan) ist hausintern das Programm *Alcatrap* entwickelt worden, in welches die im MALDI erzeugten Peaklisten als Textfiles importiert und für die nachfolgenden, automatischen Analysen in der Ionenfalle vorbereitet werden. Eine ausführlichere Darstellung der Vorgehensweise ist in Kapitel 4.5 beschrieben.

Bei Messungen mit der Nanospray-Ionenquelle (Protana) wird die Nadelspannung auf 1,0 kV eingestellt. Die Temperatur der Kapillare beträgt 200  $^{\circ}\text{C}$ . Der in der Messung abgedeckte  $m/z$ -Bereich ist bis 2000 eingestellt. Die Kollisionsenergie wird manuell zwischen 28 und 35 % eingestellt. Im Nanospray-Mode werden die Messungen manuell vorgenommen, wobei sich die Anzahl der aufsummierten Scans nach der Intensität der gemessenen Signale richtet. Im Durchschnitt werden hier etwa 100 Scans aufsummiert. Die Nanonadel (Protana) wird mit einem Volumen von etwa 2-5  $\mu\text{L}$  der gelösten Probe gefüllt und in die Quelle eingesetzt. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgt mit dem vom Gerätehersteller mitgeliefertem Programm *Xcalibur*.

### **3.2.2.3 Elektrospray- Quadrupol Time-of-flight Tandem-Massenspektrometrie (ESI-QTOF-MS/MS)**

Die Analysen werden im Nanospray-Modus an einem Gerät des Typs *Q-Star Pulsar* (Applied Biosystems) durchgeführt. Nach Aufnahme eines Gesamtspektrums (*full scan*-Modus) wird das entsprechende Vorläufer-Ion ausgewählt und fragmentiert.

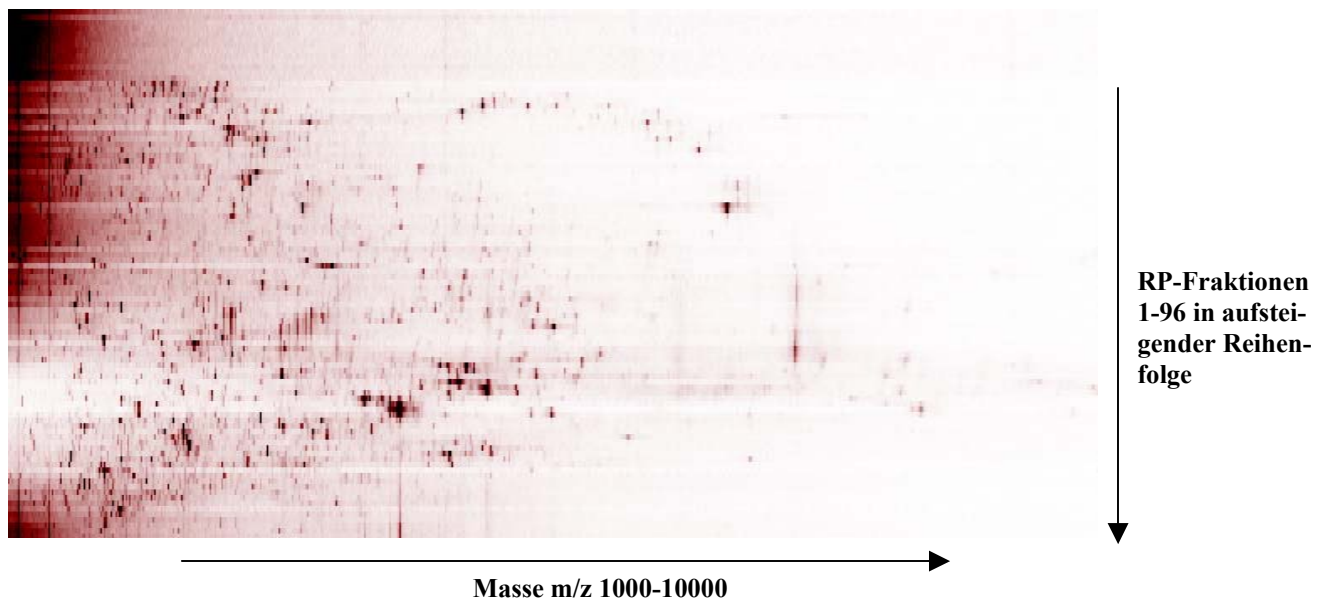
Die mit Probe gefüllte Nadel wird in die Quelle eingesetzt und mit der Spannungsquelle verbunden. Nach Justierung der Nadel vor dem *Orifice* wird die Nadelspannung auf 800-1000 V eingestellt. Der ausgewählte  $m/z$ -Bereich richtet sich nach der Art des Spektrums und wird im

*full scan*-Modus in der Regel auf den Bereich von 400–2000 als  $m/z$  eingestellt; bei der Aufnahme der Fragmentspektren richtet sich der gewählte  $m/z$ -Bereich nach der Größe des Vorläuferions. Das untere Limit wird auf Werte zwischen 50 und 100 eingestellt, das obere beträgt etwa den doppelten Wert des gewählten Vorläufers. Die gewählte Kollisionsenergie richtet sich nach dem Fragmentierungsverhalten des zu analysierenden Peptids und beträgt zwischen 20 und 50 eV. Das Kollisionsgas Stickstoff wird mit Werten von 3-5 in die Kollisionskammer geleitet. Die Anzahl der aufsummierten Scans variiert bei beiden Messmodi je nach Intensität der Signale zwischen 20 und 200.

Die Datenaufnahme- und Auswertung erfolgt mit dem vom Hersteller mitgelieferten Programm *BioAnalyst* (Version 1.1). Die weitere Prozessierung der erhaltenen Spektrendaten wird in Kapitel 4.5 genauer beschrieben.

### 3.2.3 Die Darstellung von MALDI-TOF-Massenspektren mit dem Programm Spectromania

Die Darstellung von kompletten Spektrensätzen, zum Beispiel aus einem Probenset abge-sammelter Fraktionen einer Chromatographie, wird mit der im Haus entwickelten Software *Spectromania* durchgeführt. Dieses Programm erlaubt die schnelle Ansicht und den Vergleich von vielen Spektren auf einem Blick, wobei Molekülmassen, Signalintensitäten und entsprechende Fraktionsnummern berücksichtigt werden.



**Abbildung 14:** Peptidkarte einer RP-Chromatographie aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit.

Die einzelnen Spektren werden in diesem Programm derart verarbeitet, dass jedes Spektrum um 90° gedreht wird und man so eine eindimensionale Ansicht eines Einzelspektrums „von oben“ bekommt. Ein Beispiel aus einer RP-Chromatographie einer Unterfraktion aus Cerebrospinalflüssigkeit ist in Abbildung 14 dargestellt.

Durch die Anordnung der Fraktionen in der zweiten Dimension ergibt sich von einer biologischen Probe ein individueller, zweidimensionaler Fingerprint in Form einer Peptidkarte, die zum einen das spezifische Elutionsverhalten in der Chromatographie, und zum anderen die detektierten Massen in den einzelnen Fraktionen berücksichtigt und optisch einem 2D-Gel ähnelt. Eine weitere Möglichkeit bietet dieses Programm bei der vergleichenden Analyse von mehreren Spektrensätzen. Verschiedene Datensätze lassen sich derart miteinander kombinieren und vergleichen, indem sie übereinandergelegt werden und Unterschiede farblich sichtbar gemacht werden können.

### 3.2.4 Kapillarzonenelektrophorese

Die kapillarzonenelektrophoretische Analyse dient der Quantifizierung und der Reinheitskontrolle der aufgereinigten Proben vor der Edman-Sequenzierung. Die in 0,1 % TFA gelösten Peptide werden in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße und ihrer Ladung aufgetrennt und detektiert. Als besonders geeignet in der Peptid-Analytik haben sich Messungen im Positiv-Modus erwiesen, bei welchem die Peptidionen, unterstützt durch den sich bildenden elektroosmotischen Fluss, nach Anlegen einer positiven Spannung von der Anode in Richtung Kathode wandern. Basische, positiv geladene Peptidionen passieren dabei zuerst das Detektorfenster. Saure, negativ geladene Ionen, dessen Wanderung zwar entgegengesetzt zur Kathode verläuft, werden aufgrund des elektroosmotischen Flusses, der größer als die eigene Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen ist, in Richtung Kathode transportiert und erreichen später den Detektor.

Alle Messungen werden auf einer Anlage des Typs *3D CE* (Agilent Technologies) durchgeführt, welche mit einem Dioden-Array-Detektor ausgestattet ist. Als Kapillare dient eine 47,5 cm lange, polyimidbeschichtete *bubble cell*-Kapillare (Agilent Technologies) aus *fused silica* mit einem Innendurchmesser von 50 µm, die auf eine konstante Temperatur von 25 °C eingestellt wird. Die Kapillare ist am Detektorfenster blasenförmig auf den dreifachen Durchmesser geweitet und ermöglicht dadurch eine höhere Empfindlichkeit und Peakschärfe bei der Analyse. Als Elektrolyt wird ein sterilfiltrierter 100 mM Phosphatpuffer mit 0.02 %

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und einem mit 1 M Natronlauge eingestellten pH-Wert von 2,5 verwendet.

Die Injektion der Proben erfolgt hydrodynamisch über einen geräteinternen Autosampler durch das Anlegen eines Druckes von 50 mbar auf das Probengefäß für 1-30 Sekunden. Für die UV-Detektion werden Wellenlängen von 200 und 280 nm eingestellt. Die elektrophoretische Trennung der Proben wird bei einem konstanten Strom zwischen 60-80  $\mu$ Ampere durchgeführt.

### 3.2.5 Aminosäure-Sequenzanalyse nach Edman

Die Bestimmung der Aminosäuresequenzen von den chromatographisch aufgereinigten und S-carboxyamidomethylierten Peptiden [Edman, P. 1956] wird auf einem Sequenzer (Modell 494-(*Procise*); Applied Biosystems, Weiterstadt) im *fast cycle*-Protokoll nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zwischen 10 und 100 pmol der Probe werden auf eine mit *PolyBrene Plus* (Applied Biosystems) vorbehandelte Glasfasermembran aufgetragen. Die Analyse der abgespaltenen Phenylthiohydantoin-Aminosäuren erfolgt bei einer Wellenlänge von 269 nm über RP-Chromatographie, die an den Sequenzer standardmäßig gekoppelt ist. Die Datenaufnahme und Auswertung wird mit der Software *Model 610A Data Analysis* (Applied Biosystems) durchgeführt.

### 3.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Test dient der Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe. Der Test beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250 an Proteine, wobei dieser vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird und die charakteristische Färbung bedingt. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm. Der Farbstoff ist spezifisch für hydrophobe Aminosäuren wie vor allem Arginin. [Bradford, M.M. 1976; Zor, T. und Selinger, Z. 1996].

Für die Herstellung der Eichreihe wird bovines Serumalbumin eingesetzt, wobei Verdünnungen zwischen 1–5  $\mu$ g/50  $\mu$ L hergestellt werden. Da der Test nur in einem sehr engen Konzentrationsbereich linear ist, sollte vorher eine Grobbestimmung der Proben mit unbekannter Konzentration durchgeführt werden. Danach werden 5-6 Verdünnungen (jeweils

Doppel-Bestimmungen) der Proben mit einem Endvolumen von 50  $\mu\text{L}$  hergestellt. Nach Zugabe des frisch hergestellten Färbereagenzes und nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur werden die Proben im ELISA-Reader (*Typ Sunrise*, Tecan, Crailsheim) gemessen. Die Steuerung und Auswertung wird mit vom Hersteller mitgeliefertem Programm *Magellan* durchgeführt.

### 3.2.7 Modifizierungen am Cysteinrest

#### 3.2.7.1 Reduktion der Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (DTT)

Die Probe wird in 200 mM 4-Methylmorpholin, pH 8,2 oder 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,2 in einer Konzentration zu 0,1–1,0  $\mu\text{g}$  gelöst. Nach Begasung der Probe mit Stickstoff wird die frisch hergestellte, wässrige 400 mM DTT-Lösung dazugegeben. Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur von 45 °C für eine Stunde auf dem Thermomixer. Die Zugabe des Reduktionsmittels erfolgt in ca. 50fachem, molarem Überschuss zur Probe.

#### 3.2.7.2 Modifizierung mit Iodacetamid

Für die S-Carboxyamidomethylierung werden die Proben nach Reduktion der Disulfidbrücken und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur im etwa 100fachen molarem Überschuss mit 500 mM wässrigem Iodacetamid versetzt. Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Proben aus der Peptidbank 970303 aus humanem Blutfiltrat wurden – wenn nicht anders erwähnt - in 10  $\mu\text{g}$ -Aliquots bearbeitet.

#### 3.2.7.3 Reduktion der Disulfidbrücken mit Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)

Als alternatives Reagenz für die Reduktion der Disulfidbrücken wird TCEP eingesetzt, welches ohne die Zugabe von salzhaltigen Puffern reagiert und in einer ganzen Reihe von Lösungsmitteln verwendbar ist [Burns, J.A. *et al.* 1991; Gray, W.R. 1993].

Die lyophilisierten RP-Fractionen aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit werden in 20 mM TCEP in 50 % wässrigem Acetonitril gelöst und für 30 Minuten bei 50 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Proben wurden lyophilisiert und nach Aufnahme in MALDI-Matrixlösung (CHCfu) im MALDI-TOF-Massenspektrometer gemessen.

#### 3.2.7.4 Modifizierung mit 4-Vinylpyridin

300 µg der Peptidbankfraktionen werden in 300 µL 100 mM 4-Methylmorpholin, pH 8,3 gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze DTT wird für eine Stunde bei 45 °C inkubiert. Zur Modifizierung werden 30 µL 4-Vinylpyridin und 35 µL Methanol hinzugegeben und für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

#### 3.2.7.5 Modifizierung mit N-(4-Dimethylaminoazobenzol-4-)iodacetamid (DABIA)

Als weiteres Modifizierungsreagenz wurde N-(4-Dimethylaminoazobenzol-4-)iodacetamid eingesetzt. 10 µg der lyophilisierten Proben werden in 100 µL 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,0 gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 1 h 45 min unter Stickstoffatmosphäre werden die Proben über Filtertips mit Poros 50 R2 entsalzt und danach lyophilisiert.

Zur Modifizierung werden die Proben in 100 µL 6,4 M Guanidinium-HCl/50 mM Tris-HCl, pH 8,8 gelöst, mit 100 µL DABIA (1 mg/mL in Aceton) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

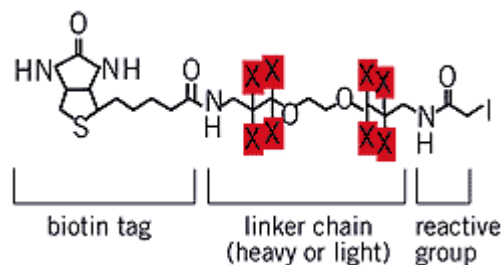
Zur Entfernung des überschüssigen Reagenzes wird 5 x mit Hexan/Ethylacetat extrahiert. Das sich in der wässrigen Phase befindende Peptidgemisch wird abgetrennt und gefriergetrocknet.

#### 3.2.7.6 Modifizierung mit „Isotope-Coded Affinity Tags“ (ICAT)

Diese erstmals im Jahr 1999 von Gygi et al. publizierte Methode verfolgt hauptsächlich zwei unterschiedliche Intentionen. Ursprünglich ist sie zur Reduktion der Probenkomplexität entwickelt worden [Gygi, S.P. et al. 1999]. Sie dient ausserdem der massenspektrometrischen Quantifizierung von komplexen Gemischen im Rahmen von Proteomanalysen. Ein besonderes Augenmerk liegt vor allem auf der differentiellen, quantitativen Analyse von pathologischen oder biologischen Veränderungen im Expressionsmuster einer Zelle. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Bestimmung des Cysteinanteils eines Peptids, so dass über diese zusätzliche Angabe die Korrektheit der Treffer während der Datenbankrecherche erhöht werden können [Goodlett, D. 2001; Goodlett, D.R. et al. 2000].

Beim quantitativen, differentiellen Ansatz werden zwei miteinander zu vergleichende Proben mit TCEP reduziert. Eine Probe wird mit einem achtfach deuteriertem und biotinyliertem

Linker modifiziert, die andere mit dem entsprechendem undeuterierten Linker. Dessen Struktur ist in Abbildung 15 dargestellt. Beide enthalten als funktionellen Bestandteil eine thiol-spezifische Gruppe (Iodacetamid), die mit sämtlichen in der Probe enthaltenen Cysteinresten reagieren soll. Nach der chemischen Modifizierung folgt das Vereinigen beider Proben und eine Chromatographie über einen Kationenaustauscher zur Abtrennung der überschüssigen Reagenzien. Nach tryptischem Verdau der Proteine und quantitativer Abtrennung der cystein-haltigen Fragmente durch Affinitätschromatographie über eine Avidin-Säule wird schließlich die massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteine bzw. der Veränderung der Expression erfolgt über die Ermittlung der Peakflächen-Verhältnisse der D8- und D0-gelabelten Peptide.



**Abbildung 15:** Struktur des ICAT-Reagenzes. Symbol X = bei D0-Reagenz Wasserstoff-Atome, bei D8-Reagenz Deuterium-Atome (abgewandelt aus: Protokoll für *ICAT Kit for Protein Labeling*, Applied Biosystems).

Da bei dieser Methode cystein-haltige Peptide und Proteine gelabelt werden, sollte sie auch zum selektiven, qualitativen Nachweis von diesen eingesetzt werden können. Der von der Firma *Applied Biosystems* zu Testzwecken zur Verfügung gestellte Kit enthält sämtliche Reagenzien und Puffer sowie die benötigten Säulen (Kationenaustauscher- und Avidin-Säule).

Als Testansatz zur Eignung der Methode für komplexe, biologische Peptidgemische wurde die gut charakterisierte Peptidbankfraktion 970303-7-29, die mit dem im Kit enthaltenen Peptid Laminin (monoisotopisches MW: 966,423 Da) gespikt wurde, eingesetzt. Der Versuch erfolgte nach dem vom Hersteller mitgeliefertem Protokoll. Die Probe wurde geteilt und 1:1 mit dem D0- bzw. dem D8-Reagenz umgesetzt. Nach dem Poolen beider Proben wurde mit einem Teil des Ansatzes die klassische Vorgehensweise getestet, wobei nach Kationenaustauscher-Chromatographie der tryptische Verdau und die Affinitätschromatographie mit der Avidinsäule erfolgte. Der zweite Teil der Probe wurde auf die gleiche Weise behandelt, wobei hier der Schritt des tryptischen Verdau ausgelassen wurde, da die getesteten Proben aus der

Hämofiltrat-Peptidbank keine höhermolekularen Proteine enthalten. Die massenspektrometrischen Messungen erfolgten mit einem MALDI-TOF-MS und einem ESI-QTOF-MS.

#### 3.2.7.7 Oxidation von reduzierten Thiolen mit Ammoniumhydrogencarbonat

Die lyophilisierten Proben werden in 10 mmol Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7.5-8.0 gelöst und für 24 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Zur weiteren Verarbeitung werden die Proben lyophilisiert.

#### 3.2.8 Entsalzung der Proben

In Filtertips werden jeweils 100 µL methanolische Poros-Suspension pipettiert. Nach Abzentrifugation des Lösungsmittels wird das Material konditioniert, indem es 2-3 mal mit 100 µL 0,1 % TFA gespült wird. Nach Probenauftrag wird 2-3 mal mit 100 µL 0,1 % TFA gewaschen. Die Elution der Probe erfolgt mit 100 µL Elutionspuffer (70 % Acetonitril/0,1 % TFA). Alternativ wurden bei größeren Probenmengen Festphasen-Kartuschen verwendet. Die Kartuschen werden mit 1-2 Säulenvolumina (CV) Methanol konditioniert, danach mit 2 CV 0,1 % TFA äquilibriert und nach dem Probenauftrag mit 3 CV 0,1 % TFA gewaschen. Die Elution der Probe erfolgt mit 70 % Acetonitril/0,1 % TFA.

#### 3.2.9 Datenbankrecherchen

Je nach Art der durchgeführten Analyse werden für die Identifizierung der cysteinhaltigen Peptide verschiedene Suchmaschinen und Protein- bzw. Nukleotid- und EST-Datenbanken genutzt.

Nach erhaltener Sequenz aus der Aminosäure-Sequenzierung nach Edman wird die Aminosäureabfolge in das Software-Tool *MS-Edman* aus dem Datenbank-Suchprogramm *Protein-Prospector* (Version 3.2.1) eingegeben und gesucht [Clauser, K.R. *et al.* 1999]. Verschiedene Datenbanken lassen sich dort einstellen und abfragen. Die Erstsuche wird standardgemäß in der Datenbank *Swiss-Prot* (ab Release 37) durchgeführt, in der ausführlich annotierte, weitgehend nicht-redundante Proteinsequenzen mit Funktionen, Domänenstrukturen und posttranslationalen Modifizierungen abgelegt sind. Lassen sich dort keine Ergebnisse finden, werden weitere Suchen in den Datenbanken *NCBI* (*National Center of Biotechnology Infor-*



mation; Internetseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und *MSDB* (*Mass Spectrometry Databases*; Internetseite: <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/MassSpecDB>) generiert. Beide umfassen wiederum eine ganze Reihe von Datenbanken, beispielsweise *Swiss-Prot*, *dbEST* [Boguski, M.S. *et al.* 1993], *GenBank* [Benson, D.A. *et al.* 2000] und *PIR* (International Protein Sequence Database; <http://pir.georgetown.edu/pirwww/>).

Massenspektrometrisch erzeugte Fragmentspektren aus dem ESI-Quadrupol-Iontrap Massenspektrometer werden in dem Suchprogramm *Mascot* (Matrix Science, London, England) automatisch nach Import der Spektrendaten im Batch-Verfahren oder einzeln gesucht [Perkins, D.N. *et al.* 1999]. Die Recherchen werden dabei in den Datenbanken *Swiss-Prot*, *NCBI* und *MSDB* [Bleasby, A.J. und Wootton, J.C. 1990] durchgeführt. Weitere manuelle Suchen erfolgten mit dem im *ProteinProspector* integrierten Programm *MS-Tag*.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Strategien zur Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene Methoden zur Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden aus biologisch hochkomplexen Proben entwickelt werden. Die Relevanz dafür ergibt sich aus mehreren Gesichtspunkten. Für den Ansatz des *Peptidomics* muss auf der Suche nach diagnostischen Markern und therapeutisch einsetzbaren Substanzen eine möglichst umfassende Charakterisierung aller Peptide in einer gegebenen Quelle vorgenommen werden.

Die Probenvorbereitung stützt sich dabei in erster Linie auf den Einsatz hochauflösender Flüssigkeitschromatographie, um die Proben für weiterführende Analysen zugänglich zu machen. Als Methode der Wahl für die Charakterisierung der Peptide hat dabei in den letzten Jahren die massenspektrometrische Analyse mit Hilfe von Elektrospray- oder MALDI-TOF-Geräten immer mehr an Bedeutung gewonnen, da sie gegenüber der Aminosäure-Sequenzierung nach Edman oder anderen Methoden eine Reihe Vorteile bietet. Zum einen kann aus komplexen Proben heraus eine Strukturaufklärung vorgenommen werden. Damit entfällt praktisch die sehr kostspielige und zeitintensive Aufreinigung der Peptide über chromatographische Methoden, die auch angesichts der Komplexität der Proben kaum durchführbar wäre. Geräte der neuen Generation lassen sich durch vom Hersteller mitgelieferte oder eigens programmierte Messprotokolle automatisieren und ermöglichen einen höheren Probendurchsatz. Des Weiteren sind bei der massenspektrometrischen Sequenzierung viel kürzere Analysezeiten gegeben. So ist die Analyse eines Peptides mit einer Länge von ca. 30 Aminosäuren statt wie bei der Edman-Sequenzierung in etwa 15 Stunden in wenigen Sekunden bis Minuten möglich. Ein weiterer Vorteil sind die bedeutend geringeren Probenmengen, die für die massenspektrometrische Analyse benötigt werden. Für die Edman-Analyse sind mit den verfügbaren Instrumenten Mengen im unteren pikomol-Bereich notwendig, mit massenspektrometrischen Methoden lassen sich mit wenigen Femtomolen eines Peptides auch aus komplexen Gemischen gute Ergebnisse erzielen.

Die Analyse der bisher isolierten und in einer Peptiddatenbank (HCPD, *Human Circulating Peptide Database*) abgelegten Peptide hat allerdings gezeigt, dass cysteinhaltige Peptide nach Etablierung automatischer Sequenzierungstechniken über Tandem-Massenspektrometrie bei zufälliger Auswahl der Sequenzierungskandidaten deutlich unterrepräsentiert waren. In bezug auf die Sequenzierung mit den genannten Methoden ergeben sich gewisse

Schwierigkeiten bei der Bestimmung disulfidverbrückter Peptide, da sie aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften nur schwer einer massenspektrometrischen Analyse und Interpretation zugänglich gemacht werden können. Es ist daher notwendig, vor der Analyse eine Reduzierung der Disulfidbrücken und eine geeignete Modifizierung der freien Cysteine zur Stabilisierung des Moleküls durchzuführen.

Ein weiterer Gesichtspunkt ergibt sich aus der hohen Komplexität der zu untersuchenden Proben. Die darin enthaltenen Peptide besitzen sehr unterschiedliche Konzentrationen, so dass häufig bei den Screenings nur diejenigen identifiziert werden, die in größeren Mengen vertreten sind. Ein großer Anteil der vorliegenden Peptide sind Fragmente aus größeren Proteinen. Da diese aber in weitaus höheren Konzentrationen als die meisten nativen Peptide im Blut zirkulieren, werden daher auch ihre Abbauprodukte bevorzugt identifiziert. Die meist durch enzymatische Abbauprozesse entstehenden Fragmente aus Proteinen besitzen einen geringeren Gehalt an Cysteinen als native Peptide, bei denen der Gehalt häufig um ein Vielfaches höher liegt [Sillard, R. *et al.* 1993]. Angewandte Methoden zur spezifischen Detektion dieser cysteinhaltigen Peptide könnten daher die Wahrscheinlichkeit erhöhen, auch diejenigen Substanzen zu erfassen, die in niedrigeren Konzentrationen vorliegen. Des Weiteren spielen auch, vor allem bei der Messung im MALDI-TOF-MS, die zum einen als Methode der Wahl zur Kartierung der Peptide und darüber hinaus zur Aufreinigungskontrolle nach jedem chromatographischen Trennschritt eingesetzt wird, Unterdrückungseffekte durch höher konzentrierte Stoffe eine Rolle. Erfahrungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass nur ein Teil der vorliegenden Substanzen tatsächlich im Spektrum dargestellt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden je nach gegebener Fragestellung unterschiedliche Richtungen zur systematischen Detektion, Isolierung und Charakterisierung cysteinhaltiger Peptide verfolgt. Eine Möglichkeit stellt die Modifikation mit thiol-spezifischen Chemikalien dar, wobei der Nachweis der Peptide über massenspektrometrische Methoden erfolgt. Da jede Modifizierung der Aminosäure in der Regel zu einer Veränderung in der Molekülmasse führt, sollten im Massenspektrum diese Unterschiede durch eine vergleichende Analyse nachgewiesen werden können. Zu diesem Zwecke sind verschiedene Modifizierungsstrategien verfolgt und auf ihre mögliche Anwendbarkeit in komplexen, biologischen Proben untersucht worden. Ein weiterer Ansatz beschäftigt sich mit der Möglichkeit des Nachweises cysteinhaltiger Peptide durch die Modifizierung mit geeigneten Reagenzien, wobei hier der Nachweis nicht über massenspektrometrische Methoden erfolgt, sondern über das veränderte, spezifische Absorptionsverhalten in der UV-Spur bei einer charakteristischen Wellenlänge während der Chromatographie. Als dritte Möglichkeit wurde

die spezifische Abtrennung bzw. Anreicherung der cysteinhaltigen Peptide mit einem geeigneten Material in Betracht gezogen, wobei hier besonders die Möglichkeit der kovalenten Chromatographie in Betracht gezogen wurde. Bei den vorgestellten Strategien soll insbesondere die Effizienz, die Spezifität und die Anwendbarkeit der entwickelten Konzepte in komplexen, biologischen Peptidgemischen untersucht werden. Neben einer allgemeinen statistischen Bewertung wird zudem eine Auswahl von verschiedenen Peptiden dargestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit isoliert und identifiziert worden sind.

## 4.2 Reduktion der Disulfidbrücken

Die Aminosäure Cystein verfügt neben ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken über keine weiteren physikalischen und chemischen Eigenschaften, welche sie signifikant von den anderen biogenen, humanen Aminosäuren unterscheidet. Es bestehen daher kaum Möglichkeiten, einen spezifischen Nachweis von cysteinhaltigen Peptiden aus komplexen, biologischen Mischungen heraus zu erreichen, ohne dabei die Struktur des gegebenen Cysteinrestes in einem Peptid über chemische Reaktionen zu verändern. Da die reduzierte, also nicht verbrückte Form des Cysteins ein hohes reaktives Potential aufweist und eine ganze Reihe von kommerziell erhältlichen Substanzen zur Modifizierung der freien Cysteinreste zur Verfügung stehen, spielt bei den verfolgten Ansätzen als erster Schritt die Reduktion der Disulfidbrücken eine zentrale Rolle. Als Mittel der Wahl wurde bei der überwiegenden Zahl der Versuche 1,4-Dithiothreitol (DTT) eingesetzt, da es nur kurze Reaktionszeiten benötigt und günstig verfügbar ist. Dieses chirale Mercaptan bildet bei der Reduktion ein zyklisches Disulfid, welches aus thermodynamischen und kinetischen Gründen sehr begünstigt ist. Demzufolge liegt das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten der Produkte und es gehen relativ stabile Moleküle hervor. Ausserdem werden daher nur geringe Überschüsse des Reduktionsmittels benötigt.

Des weiteren ist es mit den meisten Alkylierungsreagenzien kompatibel und muss daher vor der weiteren Modifizierung der Peptide nicht aus den Reaktionsansätzen entfernt werden. Auf die Verwendung von denaturierenden Agenzien wie Harnstoff oder Guanidinium-Hydrochlorid konnte weitgehend verzichtet werden, da die verarbeiteten Proben hauptsächlich Peptide und Proteinfragmente im niedermolekularen Bereich enthalten, bei denen die Disulfidbrücken leichter zugänglich sind und dadurch die notwendige Reduktion leicht durchführbar ist.

### 4.3 Die Bestimmung cysteinhaltiger Peptide durch Kombination von S-Carboxyamidomethylierung und differentieller massenspektrometrischer Analyse

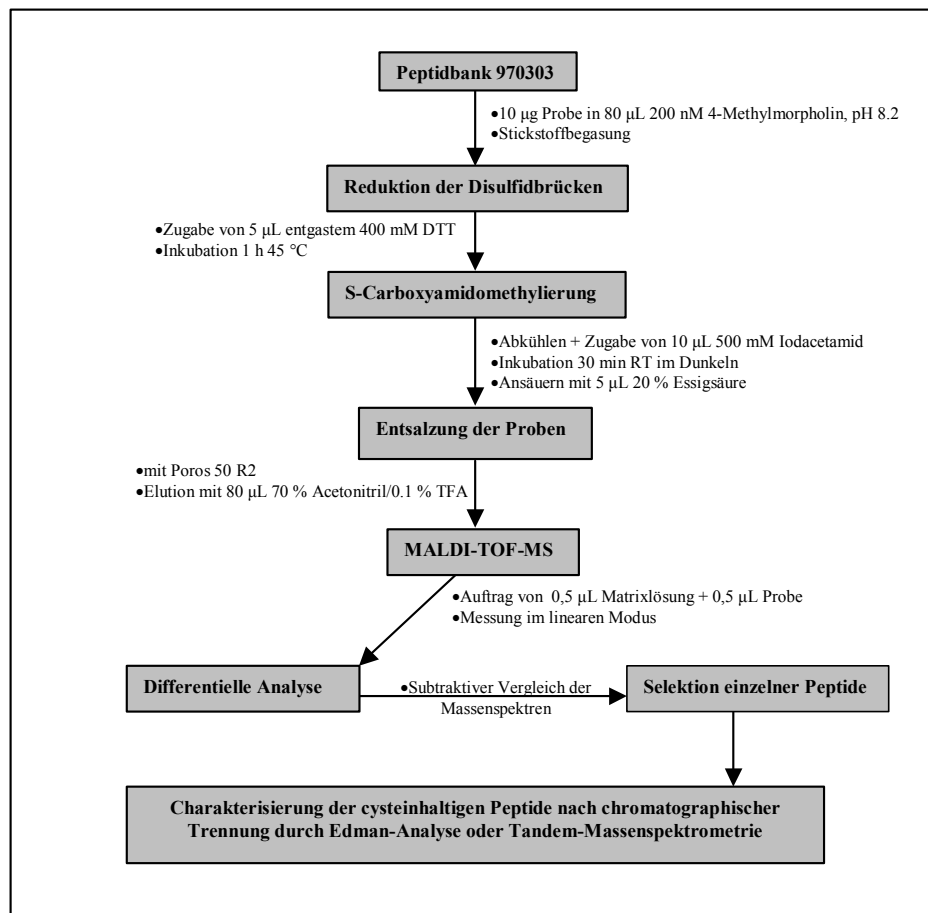
#### 4.3.1 Entwicklung der Methode

Als Untersuchungsmaterial steht die Peptidbank 970303 aus humanem Blutfiltrat zur Verfügung, deren Herstellung in Kapitel 3.1.1 beschrieben wurde. Die Fraktionen in der Peptidbank liegen gefriergetrocknet und salzfrei vor und werden generell für die Identifizierung der im Blut zirkulierenden Peptide und Proteinfragmente herangezogen. Ein weiterer Vorteil dieses Materials ist die schon weitgehende Abtrennung anderer Substanzen, welche die weitere Verarbeitung stören. Ausserdem ist es in großen Mengen verfügbar, so dass es auch für die verschiedensten Methodenentwicklungen herangezogen werden kann. Man ist so bei der Etablierung von neuen Isolierungsstrategien nicht auf den Einsatz synthetisch hergestellter Probengemische angewiesen, welche die Eigenschaften einer komplexen, biologischen Probe nicht immer ausreichend zu simulieren vermögen, sondern kann auf native Proben zurückgreifen.

Nach Behandlung aller 500 Fraktionen der Peptidbank durch Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Proben mit Iodacetamid modifiziert. Nach Entsalzung wurden sie einer Analyse im MALDI-TOF-MS unterzogen. Als Matrixsubstanz wird hier, wie bei fast allen Untersuchungen, *alpha*-Cyano-4-hydroxyzimtsäure ( $\alpha$ CHC) in Kombination mit L-Fucose eingesetzt. Dieses Gemisch hat sich als sehr geeignet für Analysen von komplexen Peptidgemischen in dem relevanten Molekulargewichts-Bereich bis 10 kDa erwiesen und zeigt gerade in Hinblick auf die kleineren Peptide bis etwa 3 kDa die höchste Präferenz, wie weiterführende Untersuchungen an Fraktionen aus der hier verwendeten Peptidbank gezeigt haben [Jürgens, M. 1999].

Im Anschluss der durchgeführten Messungen wurden die erhaltenen Massenspektren ausgewertet und mit den entsprechenden Spektren aus den unbehandelten Peptidbank-Fraktionen verglichen. Jedes ursprünglich verbrückte Cystein in den Peptiden bildet nach Modifikation mit Iodacetamid an der Sulfhydrylgruppe ein S-Carboxymethylderivat, welches mit einem molekularen Massenzuwachs von 58 Da einhergeht. Eine im Peptid vorhandene Disulfidbrücke aus zwei Cysteinresten resultiert daher in einem Shift von 116 Da. Freie Cysteine ergeben aufgrund des im sauren Lösungsmittel an das Schwefelatom gebundene Proton einen Shift von 57 Da. In den vergleichenden Analysen werden also positive Massenverschiebungen in den Spektren gesucht, die den oben genannten Werten oder einem Vielfachen von ihnen entsprechen [Neitz, S. *et al.* 2001]. Die genaue Vorgehensweise der

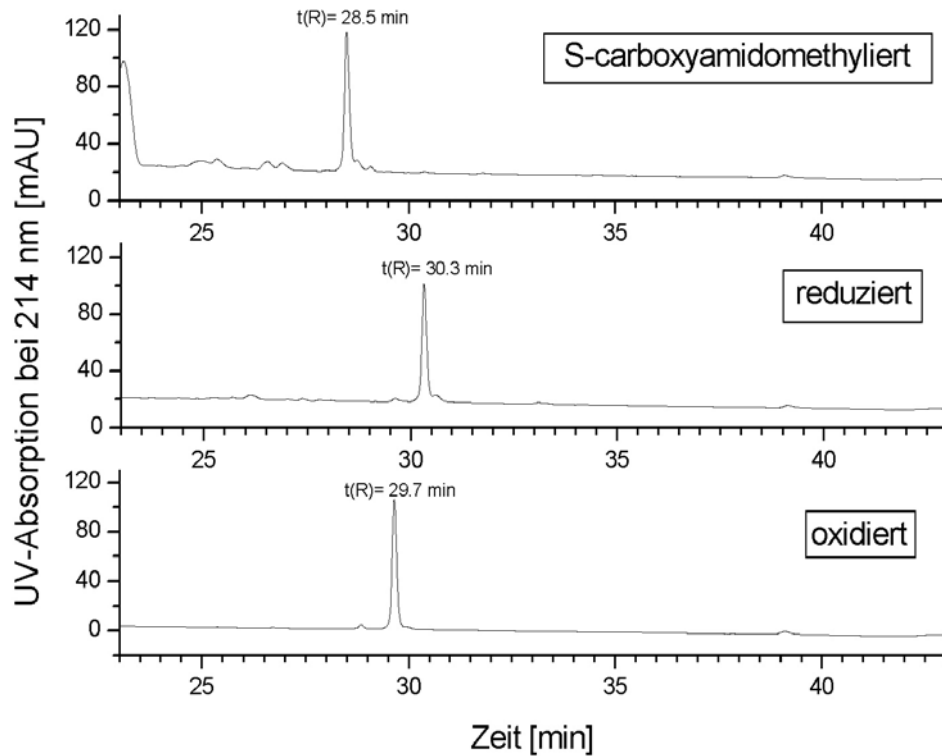
entwickelten Methodik für die Proben aus der Blutfiltrat-Peptidbank ist in der Abbildung 16 schematisch im Überblick dargestellt.



**Abbildung 16:** Entwickelte Standardprozedur zur Bestimmung von cysteinhaltigen Peptiden aus komplexen, biologischen Flüssigkeiten durch die Kombination von S-Carboxyamidomethylierung und MALDI-TOF-MS mit anschließender differentieller Analyse.

#### 4.3.2 Die Auswahl des Modifizierungsreagenzes Iodacetamid

Die Größe des resultierenden Massenshifts hat entscheidend für die Auswahl des hier eingesetzten Alkylierungsreagenzes Iodacetamid beigetragen, da es auch bei einer größeren Anzahl von Cysteinresten in einem Peptid nicht aus dem zu messenden Massenbereich herausfällt und daher die Übersichtlichkeit im Spektrum weiterhin gegeben ist. Des Weiteren sind die Eigenschaften des Reagenzes in bezug auf seine Handhabbarkeit relevant. Die Löslichkeit in den für die Reduktion der Disulfidbrücken verwendeten wässrigen Lösungsmitteln ist ausreichend. Zudem ist Iodacetamid kompatibel mit dem Reduktionsmittel DTT, so dass der Reduktionsschritt und die daran anschließende Modifizierung direkt aufeinanderfolgen können.

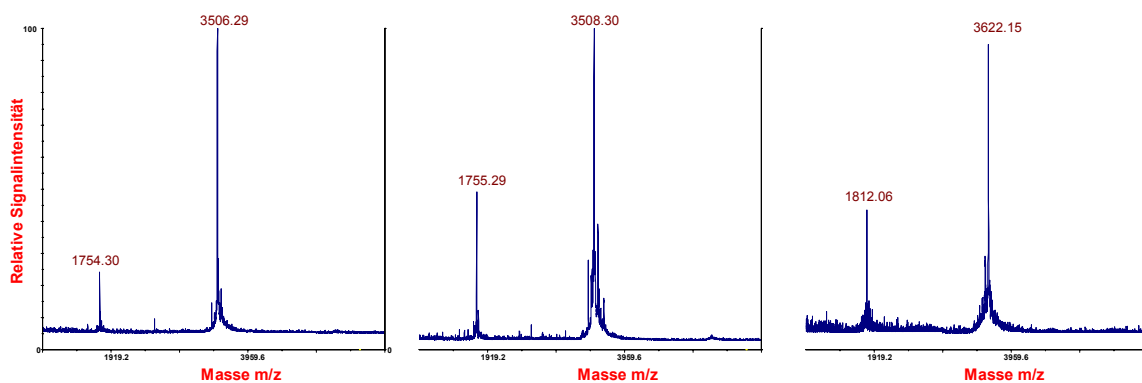


**Abbildung 17:** RP-Chromatogramme des Standardpeptids Urodilatin im verbrückten, reduzierten und S-carboxyamidomethylierten Zustand mit Angabe der Retentionszeiten ( $t(R)$ ). Für die Trennung wurden 2  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Peptids eingesetzt und auf einer RP C4-Säule (Phenomenex Jupiter 4.0 x 250 mm) getrennt. Gradient: ab der 10. Minute 10-60 % Laufmittel B in 25 Minuten, Flussrate: 0,7 mL/min.

Wie die Abbildung 17 zeigt, werden die physiko-chemischen Eigenschaften der cysteinhaltigen Peptide durch die Art der Modifizierung nur wenig verändert, da sich das Absorptions- bzw. Laufverhalten in der RP-Chromatographie unwesentlich von den Messungen der unbehandelten Peptide unterscheidet. Dargestellt sind die Chromatogramme der RP-Trennungen eines Standardpeptids im ursprünglich verbrückten, im reduzierten und im modifizierten Zustand. Die Laufbedingungen wurden so gewählt, wie sie bei den Separationen von Blutfiltrat oder ähnlichen biologischen Körperflüssigkeiten üblicherweise eingestellt werden. Das Peptid Urodilatin wurde hier als Standardsubstanz eingesetzt. Es besitzt ein theoretisches, mittleres Molekulargewicht von 3505,9 g/mol und beinhaltet zwei zu einer Disulfidbrücke oxidierte Cysteinreste. Die Chromatogramme zeigen, dass sich das Elutionsverhalten dieses Peptids nach Reduktion der Disulfidbrücken und Modifizierung zwar leicht verändert, aber die gewählten Chromatographiebedingungen für nachfolgende präparative Trennungen beibehalten werden können. Die eingefügten S-Carboxyamidomethylgruppen beeinflussen die Hydrophobizität des Peptides dementsprechend nur wenig. Gezeigt werden konnte hier ausserdem, dass der Reduktions- und der Modifizierungsschritt an einem einzelnen Stan-

dardpeptid quantitativ abläuft, da keine Nebenprodukte detektiert werden konnten und die Stärke der Absorption bei 214 nm wenig Veränderungen gezeigt hat.

Gleiches gilt für die verwendeten massenspektrometrischen Methoden. Die Testmessungen des oben eingesetzten Urodilatins im MALDI-TOF-MS haben gezeigt, dass auch die eingestellten Messparameter am Gerät in Bezug auf die verwendete Laserenergie und die verschiedenen Spannungen optimale Messbedingungen für die verschiedenen Molekülzustände darstellen. Des Weiteren kann auch die Art des Probenauftrages, also die Wahl und die Konzentration des eingesetzten Matrixgemisches wie auch die Wahl des Lösungsmittels nach der chemischen Umsetzung der Probe beibehalten werden. Die Abbildung 18 zeigt zur weiteren Kontrolle der Reaktion die aufgenommenen Spektren aus dem MALDI-TOF-MS. Die Spektren des reduzierten bzw. S-carboxyamidomethylierten Urodilatins zeigen die zu erwartenden Massenshifts von 2 bzw. 116 Da.



**Abbildung 18:** Massenspektren der MALDI-TOF-Messungen des Peptid-Standards Urodilatins in nativer (oxidierter), reduzierter und S-carboxyamidomethylierter Form. In allen drei Spektren ist der einfach und zweifach geladene Molekülzustand detektierbar.

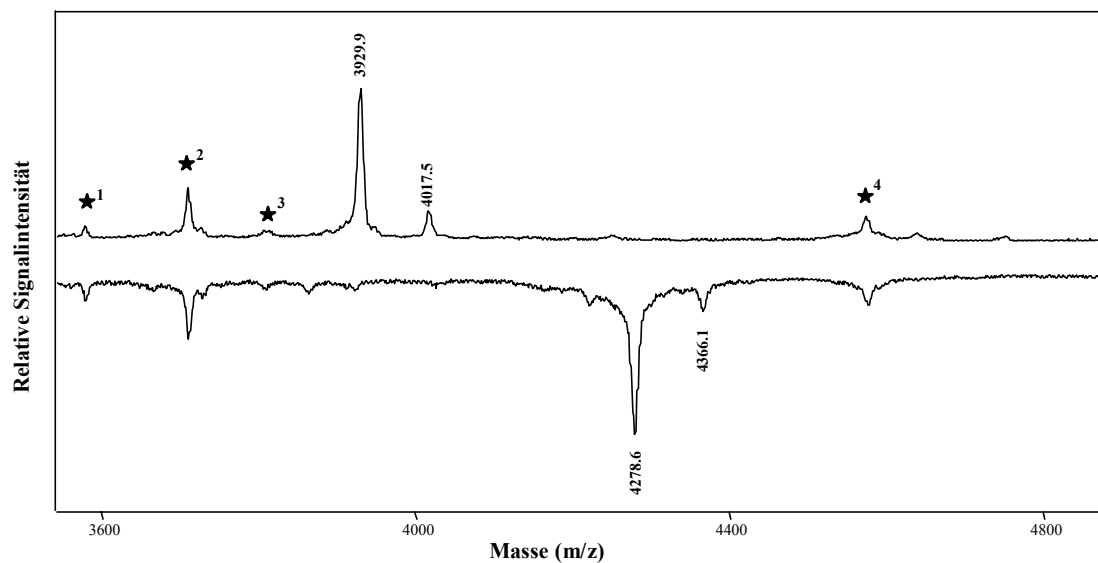
#### 4.3.3 Die Auswertung der MALDI-TOF-Massenspektren nach der S-Carboxyamidomethylierung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde der Vergleich durch die Gegenüberstellung der Einzelspektren durchgeführt, später stand das bei BioVisioN entwickelte Software-Tool *Spectromania* zur Verfügung. Mit diesem Programm lassen sich komplette Spektrensätze als Peptidkarte darstellen und untereinander vergleichen. Das Programm wurde in erster Linie für die Auswertung von Proben im Bereich des *Differential Peptide Display* entwickelt, also für die vergleichende Analyse von Peptiden aus biologischen Flüssigkeiten. Als weitere Einsatzmöglichkeit bietet sich auch die Auswertung von Massenspektren komplexer Pro-



bengemische an, die chemisch modifiziert wurden.

Als Standards wurden zur Optimierung der entwickelten Methode zunächst Proben begutachtet, die bekannte cysteinhaltige Peptide beinhalten. Nach Vergleich der Spektren der chemisch unbehandelten Proben konnten die bekannten Peptide erfolgreich identifiziert werden. Die Abbildung 19 zeigt als exemplarisches Beispiel den entsprechenden Massenbereich des Spektrums der Fraktion 25 aus pH-Pool 7 (7-25) vor (oberes Spektrum) und nach (unteres, invertiertes Spektrum) Modifizierung mit Iodacetamid.



**Abbildung 19:** Ausschnitt der differentiellen Gegenüberstellung der beiden MALDI-TOF-Massenspektren aus Peptidbank-Fraktion 25 aus pH-Pool 7 vor (oberes Spektrum) und nach (unteres, invertiertes Spektrum) S-Carboxyamidomethylierung. Die mit Sternen (1-4) markierten Peaks bleiben unverändert, mit Zahlen gelabelte Peaks stellen die veränderten, cysteinhaltigen Peptide dar.

Diese Probe enthält den  $\beta$ -Defensin-1 Precursor 33-68 ( $M+H^+$  3929,56) und eine weitere, am N-Terminus um eine Aminosäure verlängerte Form ( $M+H^+$  4016,59) des Peptids [Zucht, H.D. *et al.* 1998]. Dieses kationische Peptid konnte aus humanem Urin und Blutfiltrat isoliert werden. Beide in dieser Fraktion vorkommenden Formen des Peptids besitzen sechs Cysteinreste, die im nativen Zustand vollständig in der verbrückten, oxidierten Form vorliegen und die Homologie in der Familie der Defensine entscheidend prägen.

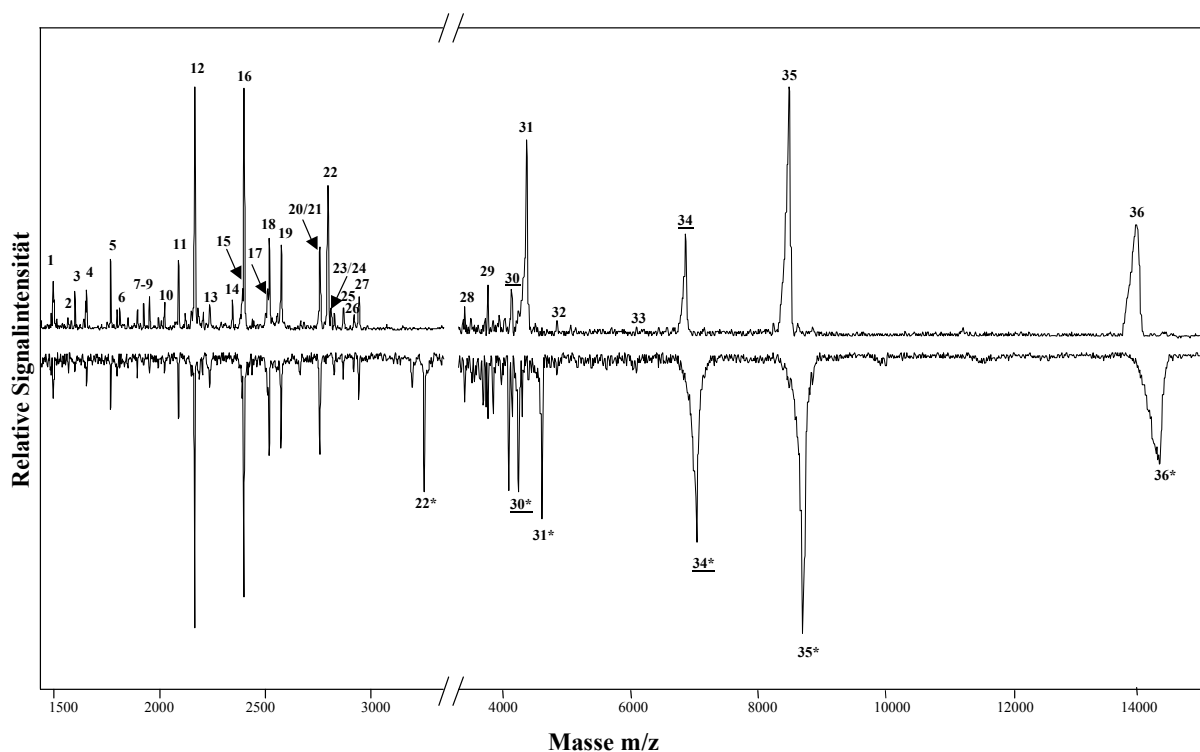
Nach durchgeführter Modifizierung erfahren jeweils beide Peaks im Massenspektrum einen positiven Massenshift von 348,7 bzw. 348,6 Da, welcher einer vollständigen Modifizierung der vorhandenen sechs Cysteinreste entspricht. Die Massenabweichungen liegen im Toleranzbereich der Messgenauigkeit des Massenspektrometers von etwa 300 ppm bei externer

Kalibrierung.

Die Abbildung zeigt in diesem Beispiel weiterhin, dass weitere Komponenten dieser Fraktion weder ihre Masse (detektiert als  $m/z$ -Wert) noch ihre Signalintensitäts-Verhältnisse deutlich verändern. Die chemische Behandlung der biologischen Probe scheint also hier auf den ersten Blick keine oder nur geringe Veränderungen im Messverhalten in dem verwendeten MALDI-TOF-Massenspektrometer zur Folge zu haben. Ob es sich bei den nicht veränderten Peaks um cysteinfreie Peptide handelt, kann letztendlich nur durch eine umfassende Analyse der einzelnen Peptide geklärt werden und ist im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

#### 4.3.4 Validierung der Methode

Nach der Entwicklung und Optimierung der beschriebenen Methode wurde eine Validierung durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurde eine möglichst weitgehende Sequenzanalyse der in der Fraktion 29 aus pH-Pool 7 detektierten Peptide erstellt, um falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse festzustellen. Die Abbildung 20 zeigt die gemessenen Vergleichsspektren dieser Fraktion vor und nach der Modifizierung mit Iodacetamid.



**Abbildung 20:** Ausschnitt aus den MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktion 29 aus pH-Pool 7 vor und nach Modifizierung. Die im unteren Spektrum mit Zahlen versehenen Peaks stellen die geschifteten Massen dar. Die Nummerierung entspricht der Reihenfolge in Tabelle 4 auf Seite 56. Doppelt geladene Ionen sind unterstrichen dargestellt.

Für die Validierung der Methode wurde ein weiterer Ansatz von 10 mg dieser Peptidbankfraktion in zwei aufeinanderfolgenden, chromatographischen Trennschritten mittels HPLC zuerst über eine RP-C4-Säule (Phenomenex Jupiter, 10 x 250 mm, 5  $\mu$ , 300 Å) separiert. Die abgesammelten Fraktionen wurden nach Massenkontrolle im MALDI-TOF-MS und Zuordnung der gesuchten Massen bei Bedarf weiter über eine RP C18-Säule (Reprosil pur - AQ, 4 x 250 mm, 5  $\mu$ m) und eine RP C5-Säule (Phenomenex Jupiter, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 300 Å) aufgereinigt. Nach kapillarelektrophoretischer Separation zur Bestimmung der Reinheit und zur Quantifizierung wurden die Peptide bis zu einem Molekulargewicht von etwa 3000 Da mit Hilfe eines Ionenfallen-Massenspektrometers (ESI-QIT-MS) durch eine MS/MS-Analyse im *nanospray*-Modus sequenziert.

Größere Peptide können in diesem Massenspektrometer nicht analysiert werden, da nur Ladungszustände bis etwa 4<sup>+</sup> mit ihrer Isotopenverteilung aufgelöst werden können. Da der messbare m/z-Bereich auf 2000 limitiert ist, werden diese Peptide im Massenspektrum zwar dargestellt, aber ihr Ladungszustand ist nicht eindeutig feststellbar und eine Sequenzanalyse somit schwer möglich. Aus diesem Grunde wurden die entsprechenden Peptide über eine Aminosäuresequenz-Analyse nach Edman analysiert. Potentiell cysteinhaltige Peptide wurden vor Sequenzierung reduziert und S-carboxyamidomethyliert. Die Recherchen wurden nach Erhalt der Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Suchprogramms *Protein-Prospector* in der Protein-Datenbank *Swiss-Prot* durchgeführt. Weitere, dort nicht zu identifizierende Peptide wurden in der Nukleotid-Datenbank *Genbank* [Benson, D.A. *et al.* 2000] durchgeführt. In Tabelle 4 sind alle detektierten Massen aus dieser Fraktion mit den entsprechenden Massenshifts und den identifizierten Peptiden dargestellt, bei denen die Sequenzanalyse erfolgreich durchgeführt werden konnte.

In dieser Fraktion wurde vor der S-Carboxyamidomethylierung im Spektrum eine Gesamtzahl von 36 Massen detektiert. 27 von diesen konnten nach Datenbankabgleich identifiziert werden. Die Sequenzanalyse ergab die in der nachfolgenden Tabelle 4 in der letzten Spalte dargestellten Peptide. Die nach S-Carboxyamidomethylierung nicht mehr detektierbaren Massen wiesen im Spektrum ausschließlich sehr schwache Signalintensitäten auf. Wahrscheinlich kommt es hier nach der Entsalzung der Fraktionen zu Probenverlusten, die im Verlauf der weiteren Analyse dazu führten, dass die entsprechenden Peptide unter die Detektionsgrenze des verwendeten MALDI-TOF-Gerätes fielen.

Von dem Peptid *Antimicrobial Peptide Hecidin Precursor 60-84* konnten zwei unterschiedliche Varianten mit einem Molekulargewicht von 2789,2 Da bzw. 2804,8 Da identifi-

ziert werden. Neben der kleineren, in der Datenbank *Swiss-Prot* annotierten Form wurde noch eine weitere, am Methioninrest oxidierte Form (plus 16 Da) in dieser Probe sequenziert. Nach der chemischen Modifizierung lassen sich beide Peptide im Massenspektrum nicht mehr voneinander unterscheiden. In der höherrmassigen Variante wird unter den gegebenen Reaktionsbedingungen neben den acht verbrückten Cysteinresten zusätzlich der oxidierte Methioninrest reduziert (minus 16 Da) und weist so nach Modifizierung die gleiche Masse auf wie die andere Variante des Peptids.

Nr.	m/z-Verhältnis vor Cam	m/z-Verhältnis nach Cam	Massen-shift	Anzahl der Cysteinreste	Peptid/Proteinfragment
1	1476,0	1475,7	0,3	-	Serum Albumin Prec. 178-189
2	1545,8	1545,7	0,1	-	-----
3	1578,5	1579,0	0,5	-	-----
4	1635,7	1635,7	0,0	-	-----
5	1750,0	1750,5	0,5	-	Serum Albumin Prec. 229-243
6	1778,0	n. d.	n. d.	-	Serum Albumin Prec. 361-375
7	1878,2	1878,8	0,6	-	-----
8	1908,2	1908,8	0,6	-	-----
9	1937,1	1937,1	0,0	-	Serum Albumin Prec. 360-375
10	2008,2	2008,7	0,5	-	Serum Albumin Prec. 359-375
11	2075,4	2075,4	0,0	-	-----
12	2153,3	2153,3	0,0	-	Serum Albumin Prec. 235-252
13	2225,2	2224,9	0,3	-	-----
14	2333,2	2333,5	0,3	-	-----
15	2381,0	2381,3	0,3	-	Serum Albumin Prec. 233-252
16	2389,8	2389,8	0,0	-	Cystatin C Prec. 70-90
17	2501,4	n. d.	n. d.	-	Fibrinogen A Prec. 498-520
18	2509,9	2509,8	0,1	-	Serum Albumin Prec. 232-253
19	2566,9	2566,8	0,1	-	Serum Albumin Prec. 231-252
20	2751,6	2751,6	0,0	-	Serum Albumin Prec. 26-49
21	2753,5	2753,6	0,1	-	Serum Albumin Prec. 27-50
22	2790,2	3254,7	464,5	8	Antimicrobial Peptide Hecpudin Prec. 60-84
23	2805,8	n. d.	n. d.	8	Antimicrobial Peptide Hecpudin Prec. 60-84, oxidiert
24	2821,5	2821,5	0,0	-	-----
25	2865,8	2865,6	0,2	-	beta-2-Microglobulin Prec. .59-82
26	2916,1	2916,2	0,1	-	beta-2-Microglobulin Prec. 60-83
27	2940,0	2939,4	0,6	-	Serum Albumin Prec. 25-50
28	3615,3	3615,4	0,1	-	Cystatin C Prec. 52-82
29	3971,0	3970,2	0,8	-	Cystatin C Prec. 48-82
30	4338,8	4456,2	117,4	4	Small Inducible Cytokine A14 Prec. 20-93 (doppelt geladenes Ion)
31	4583,1	4816,3	233,2	4	Accession-Nr. AI394524 (Genbank)
32	5061,5	n. d.	n. d.	-	Desmocollin 3A/3B Prec. 77-120
33	6296,6	6297,0	0,4	-	Ceruloplasmin Prec. 774-827
34	7064,2	7240,5	176,3	6	Angiogenin Prec. 25-147 (doppelt geladenes Ion)
35	8677,3	8909,8	232,5	4	Small Inducible Cytokine A14 Prec. 20-93
36	14121	14472	351	6	Angiogenin Prec. 25-147

**Tabelle 4:** Detektierte Massen aus der Peptidbankfraktion 970303-7-29 als *m/z*-Verhältnis vor (1. Spalte) und nach (2. Spalte) Carboxyamidomethylierung. Abkürzungen: Cam: S-Carboxyamidomethylierung n. d.: nicht detektiert, Prec.: Precursor. Die Namensgebung der Peptide/Proteinfragmente entspricht der Nomenklatur in *Swiss-Prot* (Release 39).

Ein besonderes Augenmerk bei der Auswertung der Spektren muss auf die vorliegenden Ladungszustände gelegt werden. Bei den in dieser Fraktion im MALDI-TOF-MS gemessenen Peaks mit den *m/z*-Werten 4338,8 und 7064,2 handelt es sich um die zweifach geladenen Ionen der Peptide *Small Inducible Cytokine A14 Precursor 20-93* [Schulz-Knappe, P. *et al.* 1996] und *Angiogenin Precursor 25-147* [Saxena, S. *et al.* 1992]. Die tatsächliche An-

zahl der Cysteinreste von vier bzw. sechs Resten stimmt hier nicht mit den korrespondierenden Massenshifts von 117,4 und 176,3 Da überein, da die detektierten Ionen aufgrund ihrer doppelten Ladungszahl scheinbar nur die halbe Masse besitzen. Da bei den Messungen im linearen Modus des verwendeten Massenspektrometers keine Isotopenauflösung gegeben ist, ist es nicht möglich, an Hand der Isotopenabstände eines Peaks den Ladungszustand des entsprechenden Ions zu bestimmen. In der Regel werden im MALDI-TOF-MS im Massenbereich der Peptide zwar überwiegend einfach geladene Ionen gebildet, aber bei höhermolekularen Peptiden beobachtet man häufig zwei- bis dreifach geladene Ionen. Da es in den Spektren von sehr komplexen Fraktionen nicht immer auf den ersten Blick ersichtlich ist, ob es sich um ein- oder mehrfach geladene Ladungszustände handelt, muss diesem Aspekt bei der Auswertung der Spektren besondere Berücksichtigung geschenkt werden.

Bei allen identifizierten Peptiden stimmte die Anzahl der vorhandenen Cysteinreste mit den resultierenden Massenshifts nach der S-Carboxyamidomethylierung mit den tatsächlich vorhandenen in den entsprechenden Peptidsequenzen überein. Die Modifizierung erfolgte meistens vollständig und ohne die Bildung von weiteren Nebenprodukten. Das zur Alkylierung eingesetzte Reagenz Iodacetamid eignet sich folglich gut für die Anwendung in komplexen, biologischen Proben. Die im Massenspektrum nicht geshifteten Peptide konnten nach Sequenzierung als cysteinfreie Peptide einwandfrei identifiziert werden.

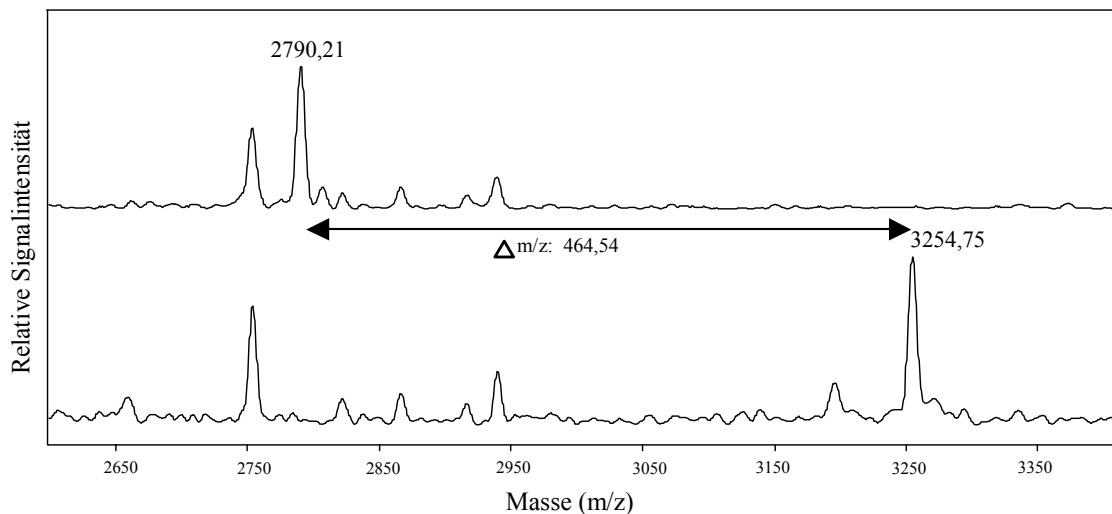
Die meisten der in dieser Fraktion identifizierten cysteinhaltigen Peptide erwiesen sich ausschließlich als biologisch aktive Substanzen, die auf Grund ihrer Funktion und ihres Molekulargewichts echten, nativen Peptidhormonen oder immunologisch wirkenden Substanzfamilien wie etwa den Chemokinen zugeordnet werden können. Das multifunktionelle Peptid *Angiogenin* gehört zur Familie der pankreatischen Ribonukleasen, die unter anderem die Gefäßbildung in normalen und Tumorgewebe induzieren. Darüberhinaus hemmt es die Ausschüttung von entzündungsauslösenden Enzymen aus Granulozyten im Blutstrom und besitzt dadurch entzündungshemmende Eigenschaften [Badet, J. 1999]. Das in dieser Fraktion identifizierte Peptid *Small Inducible Cytokine A14 Prec. 20-93* gehört zu den CC-Chemokinen und ist in das immunologische Geschehen von humanen Monozyten involviert. Es wird in verschiedensten Geweben wie der Milz und der Leber, in Skelett- und Herzmuskel exprimiert und ist in hohen Konzentrationen zwischen 1 und 80 nmolar im Blutplasma nachweisbar.

Bei einem weiteren Peptid mit dem im Massenspektrum detektierten  $m/z$ -Wert von 4583,1 fand sich kein Eintrag in den verwendeten Protein-Datenbanken. Hier konnte in der Protein-

und Nukleotid-Datenbank *NCBI* die entsprechende cDNA identifiziert und in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt werden. Die Anzahl der ermittelten Cysteinreste stimmt auch hier mit der erwarteten Anzahl auf Grund des im Massenspektrum detektierten Shifts überein.

#### 4.3.5 Die Isolierung des cysteinreichen Peptids „Liver-expressed antimicrobial peptide“ (LEAP-1)

Als ein Beispiel für eine erfolgreich durchgeführte Isolierung dient das Peptid *Liver-Expressed Antimicrobial Peptide (LEAP-1, Antimicrobial Peptide Hepcidin)* [Krause, A. *et al.* 2000]. Dieses Peptid konnte bis dato nur in humanem Urin nachgewiesen werden [Park, C.H. *et al.* 2000] und wurde durch die beschriebene Methode erstmals in humanem Blutfiltrat charakterisiert. Die Abbildung 21 zeigt den herausgeschnittenen Massenausschnitt von  $m/z$  2600-3400 aus den Vergleichsspektren der Peptidbankfraktion 29 aus pH-Pool 7, in welcher dieses Peptid detektiert werden konnte. Diese Fraktion wurde bereits - wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben - zur Validierung der Methode herangezogen.



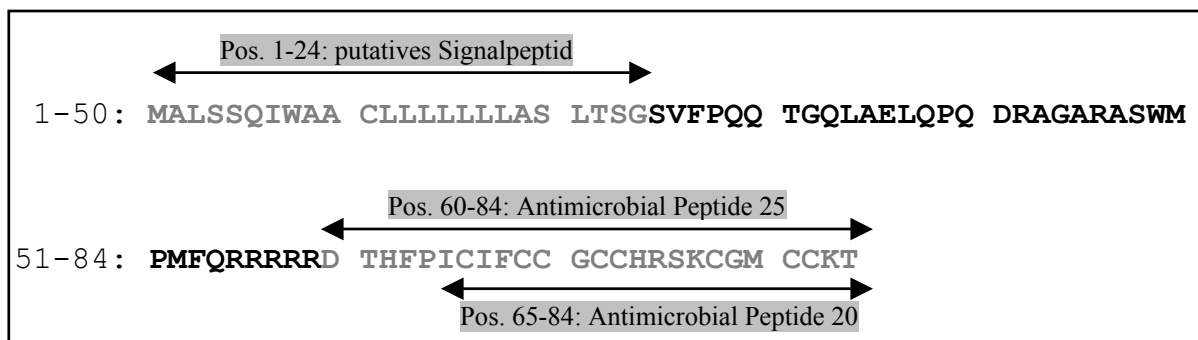
**Abbildung 21:** Ausschnitt aus den vergleichenden MALDI-TOF-Massenspektren der Fr. 29 aus dem pH-Pool 7. Das Peptid *Antimicrobial Peptide Hepcidin Precursor 60-84* ist mit seinen entsprechenden Massen im Spektrum dargestellt.

Nach Aufreinigung des Peptides durch chromatographische Auftrennung eines neuen Ansatzes dieser Fraktion und anschließender Sequenzanalyse nach Edman konnte es in der Datenbank *Swiss-Prot* als neues Peptid identifiziert werden. Dieses besteht aus einer Kette von 25 Aminosäuren und enthält acht Cysteinreste, welche vollständig zu Disulfidbrücken oxidiert

sind. Aus einer benachbarten Peptidbank-Fraktion konnte eine weitere, am N-Terminus um 5 Aminosäuren verkürzte Form dieses Peptids isoliert werden. In Abbildung 22 ist die Sequenz des Peptids und der trunkierten Form dargestellt.

Expressionsstudien haben ergeben, dass dieses Peptid hauptsächlich in der Leber, aber auch in verschiedenen anderen Geweben wie Prostata, Hoden, Dün- und Dickdarm exprimiert wird. Seine genaue Funktion konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Es scheint eine Rolle bei der körpereigenen Abwehr von Mikroorganismen zu spielen, da antimikrobielle und antifungale Eigenschaften nachgewiesen wurden. Des Weiteren wird eine nicht unbedeutende Funktion innerhalb des Eisenstoffwechsels diskutiert, da es bei einer Akkumulation von Eisen in Leber und Pankreas („Eisenspeicherkrankheit“) zu einem signifikanten Anstieg in der Genexpression von LEAP-1 im Mausmodell kommt [Nicolas, G. *et al.* 2001; Pigeon, C. *et al.* 2000]. Es könnte daher ein regulatorisches Peptidhormon in der Eisen-Homöostase darstellen.

Sequenzhomologien zu anderen Peptiden, besonders in Bezug auf das Cystein-Muster im Molekül, konnten bisher nicht nachgewiesen werden.



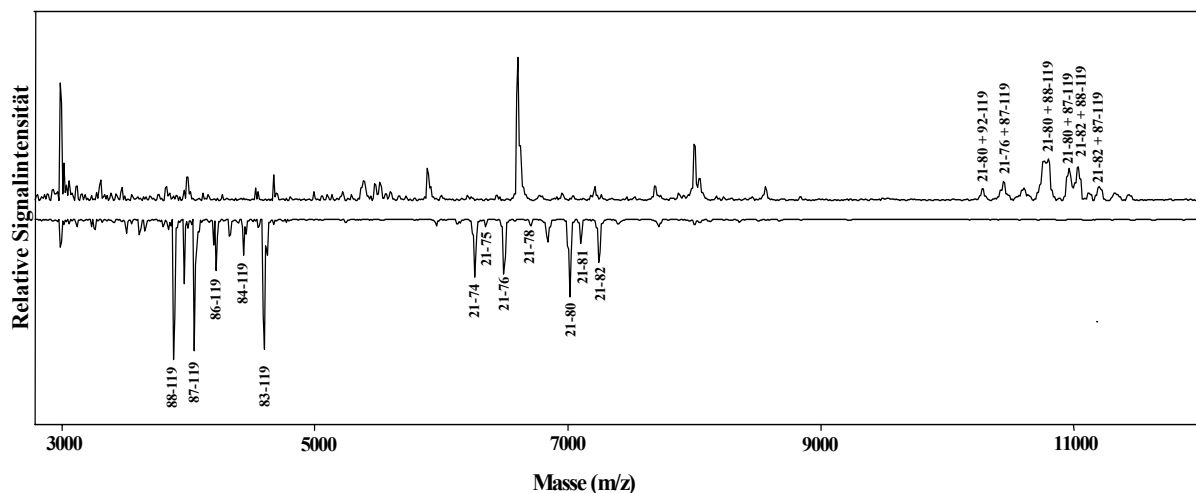
**Abbildung 22:** Aminosäuresequenz (dargestellt im Einbuchstabencode) des *Antimicrobial Peptide Hcpidin Precursors* (oben). Die Signalsequenz und die beiden aus Blutfiltrat isolierten Formen sind grau dargestellt (unten).

#### 4.3.6 Das Verhalten von mehrkettigen Peptiden nach der S-Carboxyamido-methylierung der Cysteinreste

Besondere Schwierigkeiten bei der differentiellen Auswertung der Spektren ergeben sich bei Proben mit Peptiden und Proteinfragmenten, deren Strukturen aus mehr als einer Aminosäurekette aufgebaut sind.

In den Fraktionen der Peptidbank 970303 treten breitgestreut über alle pH-Pools zahlreiche, trunkierte Formen des Beta-2-Microglobulins (B2MG) auf, ein aus 119 Aminosäuren beste-

hendes Peptid [Cunningham, B. *et al.* 1973]. Es gehört zum Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Komplex) und ist somit an der Präsentation von Antigenen an der Oberfläche von kernhaltigen Zellen beteiligt. Dieses Protein besitzt eine Disulfidbrücke, welche die beiden Cysteinreste in den Positionen 45 und 100 miteinander verknüpft. Im Blutfiltrat tritt eine große Anzahl von Molekülen dieser Spezies auf, bei denen durch proteolytische Abbauprozesse verschiedene Teilsequenzen zwischen der Disulfidbrücke herausgeschnitten sind und die aus zwei Aminosäureketten aufgebaut sind. Diese Fragmente besitzen keine bekannte biologische Aktivität.



**Abbildung 23:** Vergleich der MALDI-TOF-Massenspektren aus Fraktion 4-34 vor (oben) und nach (unten, invertiert) S-Carboxyamidomethylierung. Als Matrixsubstanz wurde hier Sinapinsäure verwendet. Die Zahlen geben die Positionen der entsprechenden Aminosäuren aus dem Beta-2-Microglobulin Precursor an.

Durch die beschriebene Methode brechen die Moleküle bei der Reduktion der Disulfidbrücken auseinander und es entstehen pro ursprünglichem Molekül jeweils zwei getrennte Peptidketten.

In Abbildung 23 ist der Vergleich der MALDI-Massenspektren aus Fraktion 4-34 vor und nach S-Carboxyamidomethylierung dargestellt. Die Peptide im Massenbereich um 11000 Da sind nach der chemischen Modifizierung nicht mehr detektierbar, da sie nur noch in der reduzierten Form vorliegen; es treten dagegen aber zahlreiche, neue Peptide im Molekulargewichtsbereich zwischen 3000 und 8000 Da auf. Eine Zuordnung erscheint auf den ersten Blick als relativ schwierig, ist in dem gezeigten Beispiel aber aufgrund der Kenntnis der vorliegenden Aminosäuresequenzen mit Molekulargewichtsberechnungen und teilweisen Sequenzierungen gelungen.



Betrachtet man die gesamte Peptidbank 970303 hinsichtlich der aus *Beta*-2-Microglobulin abzuleitenden Peptide, so konnten aus den untersuchten Fraktionen zahlreiche Formen isoliert und identifiziert werden. Tabelle 5 zeigt neben des kompletten Proteins die verschiedenen, ein und zwei Cysteinreste enthaltenden N- und C-terminalen Fragmente, die im Blutfiltrat als Abbauprodukte dieses Peptids isoliert werden konnten. Die gefundenen Spaltstellen lassen dabei einen Rückschluss auf die Art des Abbauvorgangs zu. Da bevorzugt Fragmente mit einem intakten N- bzw. C-Terminus auftreten, scheint der proteolytische Abbau des Peptids überwiegend von Endoproteasen vorgenommen zu werden.

PEPTID AUS B2MG PRECURSOR	MOLEKULARE MASSE (average)	PEPTID AUS B2MG PRECURSOR	MOLEKULARE MASSE (average)
B2MG PREC. 43-59	1908,12	B2MG PREC. 21-56 + 87-119	8135,13
B2MG PREC. 88-104	2040,20	B2MG PREC. 21-89	8172,11
B2MG PREC. 87-106	2403,61	B2MG PREC. 43-114	8474,53
B2MG PREC. 98-119	2660,12	B2MG PREC. 21-56 + 83-119	8685,75
B2MG PREC. 21-46	3064,48	B2MG PREC. 43-116	8804,85
B2MG PREC. 90-119	3608,12	B2MG PREC. 21-74 + 88-119	10046,27
B2MG PREC. 88-119	3838,34	B2MG PREC. 21-74 + 87-119	10207,43
B2MG PREC. 21-54	3891,34	B2MG PREC. 21-80 + 92-119	10319,6
B2MG PREC. 87-119	4002,51	B2MG PREC. 21-76 + 87-119	10445,7
B2MG PREC. 87-119, Methionin oxidiert	4017,51	B2MG PREC. 21-80 + 88-119	10799,3
B2MG PREC. 84-119	4407,01	B2MG PREC. 21-80 + 87-119	10963,3
B2MG PREC. 21-59	4461,00	B2MG PREC. 21-114	11025,40
B2MG PREC. 83-119	4553,18	B2MG PREC. 21-82 + 88-119	11033,5
B2MG PREC. 82-119	4554,18	B2MG PREC. 21-82 + 87-119	11197,5
B2MG PREC. 21-80	6960,77	B2MG PREC. 21-115	11204,58
B2MG PREC. 21-46 + 87-119	7063,97	B2MG PREC. 21-116	11326,69
B2MG PREC. 21-82	7195,02	B2MG PREC. 21-117	11482,88
B2MG PREC. 21-49 + 84-119	7694,72	B2MG PREC. 21-119 (komplett)	11729,19
B2MG PREC. 21-54 + 87-119	7890,84		

1-50	<b>MSRSVALAVL ALLSLSGLEA</b>	IQRTPKIQVY SRHPAENGKS NFLNCYVSGF
51-100	HPSDIEVDLL KNGERIEKVE	HSDLFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC
101-119	RVNHVTLSPQ KIVKWDRDM	

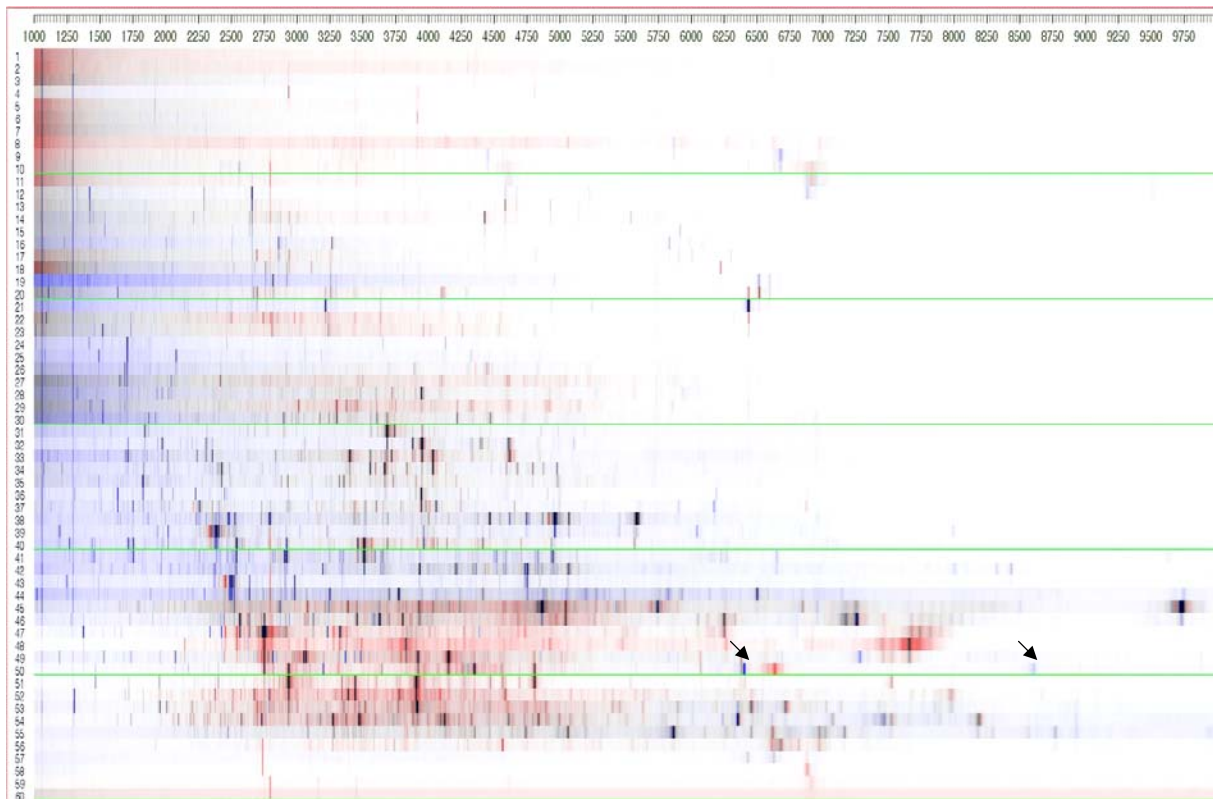
**Tabelle 5:** Aus der Peptidbank 970303 isolierte Peptide aus Beta-2-Microglobulin (B2MG). Die in Spalte 1 angegebenen Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren an; das untere, grau unterlegte Feld stellt die komplette Aminosäuresequenz dar. Das Signalpeptid ist fett gedruckt; die miteinander verbrückten Cysteinreste in Position 45 und 100 sind weiß dargestellt.

#### 4.3.7 Die S-Carboxyamidomethylierung von Proben aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit

Um die Eignung der Methode für andere biologische Quellen zu überprüfen, wurde von einer Präparation aus Cerebrospinalflüssigkeit eine Modifizierung mit Iodacetamid durchgeführt. Für die Erstellung der Peptidkarte wurde von den Proben ein Volumen von 0,4 mL (unbehandelte Probe) bzw. 1,0 mL (S-carboxyamidomethyliert und entsalzt) für die

MALDI-TOF-Messungen eingesetzt und miteinander verglichen. In Abbildung 24 ist die mit Spectromania erstellte Differenzkarte dargestellt.

Zur Überprüfung der Methode wurde aus der Fraktion 50, in der zwei Massenshifts von 232,3 Da bzw. 348,2 Da detektiert werden konnten, eines der entsprechenden Peptide analysiert. Nach weiterer chromatographischer Auftrennung eines neuen Ansatzes dieser Fraktion wurde eine Sequenzanalyse nach Edman durchgeführt, da eine massenspektrometrische Analyse aufgrund der verbrückten Cysteinreste und der hohen Masse nur bedingt möglich war. Das Peptid mit einem Molekulargewicht von 8602 Da konnte als ein Fragment aus dem Complement C4 Precursor identifiziert werden, welches dem C4A Anaphylatoxin, verkürzt um eine C-terminale Aminosäure, entspricht und die erwarteten sechs Cysteinreste enthält. Dieses Peptid wurde vormals in Cerebrospinalflüssigkeit beschrieben und gilt als Mediator für lokale Entzündungsprozesse [Kasuya, H. *et al.* 1989; Stark, M. *et al.* 2001].



**Abbildung 24:** Differenzkarte aus Cerebrospinalflüssigkeit. Senkrecht aufgetragen sind die RP-Fraktionen 1-60, horizontal der Massenbereich von 1000-10000 als  $m/z$ . Blau dargestellt ist die unbehandelte Präparation, rot die S-carboxyamidomethylierten Fraktionen. Gleiche, in beiden Karten vorkommende Signale werden dunkelgrau dargestellt. Die Pfeile zeigen die beiden detektierten Massenshifts in der Fraktion 50.

Auch am Beispiel von Cerebrospinalflüssigkeit konnte gezeigt werden, dass die vorgestellte Methode auch auf andere biologische Quellen anwendbar ist. Problematisch kann hier aller-

dings die geringe Verfügbarkeit des Probenmaterials werden, weil nach der Detektion der Massenshifts für die genauere Charakterisierung der jeweiligen Peptide nicht immer genügend Probenmenge zur Verfügung steht.

#### 4.3.8 Vor- und Nachteile der Kombination aus S-Carboxyamidomethylierung und massenspektrometrischer Differenzanalyse

Die vorgestellte Methode eignet sich aus verschiedenen Gesichtspunkten zur Analyse cysteinhaltiger Peptide in komplexen, biologischen Flüssigkeiten. Die Behandlung der Proben ist relativ unempfindlich gegenüber stöchiometrischer Verhältnisse. Da die eingesetzten Reduktions- und Alkylierungsmittel im großen Überschuss zur Probe gegeben werden, ist eine genaue Kenntnis der Gesamtkonzentration der Cysteinreste in einer Probe nicht erforderlich. Eine grobe Abschätzung über den Proteingehalt reicht für die Bestimmung der einzusetzenden Menge an DTT und Iodacetamid aus. Trotz der unbekanntem Konzentration der Peptide in den komplexen Proben lässt sich durch die massenspektrometrische Messung die Anzahl der Cysteine in den jeweiligen Peptiden eindeutig bestimmen.

Darüber hinaus erfolgt die chemische Umsetzung der cysteinhaltigen Peptide fast immer vollständig. Es wurden keine Nebenprodukte oder Reaktionen mit anderen Aminosäureseitenketten beobachtet, es ist also eine hohe Spezifität des Reagenzes für die Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste vorhanden. Das Verfahren lässt sich sehr gut mit dem Einsatz von Pipettierrobotern automatisieren, so dass auch hohe Probendurchsätze möglich sind.

Die Nachteile, die sich bei der Bestimmung der cysteinhaltigen Peptide ergeben, resultieren vor allem aus der hohen Komplexität der Proben. In vielen Fraktionen der Peptidbank befinden sich weit mehr Peptide, als die ohnehin schon sehr umfangreichen Massenspektren auf den ersten Blick erwarten lassen. Gerade die geringer konzentrierten Komponenten werden teilweise durch diejenigen Peptide unterdrückt oder überlagert, die in größeren Mengen vorliegen. Dieser Umstand kann die Auswertung der Spektren bei komplexeren Proben behindern, da eine Zuordnung der Peaks nach erfolgter Reaktion nicht immer ohne weiteres möglich ist. Durch die Modifizierung der Proben mit dem Alkylierungsreagenz verändern sich die physiko-chemischen Eigenschaften des gesamten Probengemisches und es kann demzufolge zu einer Verschiebung der Intensitätsverhältnisse der Signale einzelner Peptidkomponenten im Massenspektrum kommen. Dadurch wird die Auswertung erschwert, da das charakteristische Peptidpattern bezüglich der Signalintensitäten verändert wird und Massenshifts nicht direkt offenkundig sind.

Ein weiterer Schwachpunkt der Methode ist die Notwendigkeit der Probenentsalzung vor der massenspektrometrischen Analyse, da der eingesetzte Überschuss an DTT und Iodacetamid und die Verwendung von nicht MALDI-kompatiblen Lösungspuffern das homogene Auskristallisieren der Probenmatrix empfindlich stören. Ausserdem führen sie in manchen Fällen zur Adduktbildung und damit zu zusätzlichen Signalen im Spektrum. Beide Gesichtspunkte haben daher eine massive Verschlechterung der Probenmessbarkeit zur Folge, die eine Entsalzung zwingend erforderlich macht. Da diese Entsalzungen aber nicht ohne, wenn auch meist nur mit geringen Probenverlusten, erfolgen können, kommt es bei geringer konzentrierten Komponenten in bestimmten Proben zu Problemen bei der Wiederfindung der Signale im Massenspektrum.

Wie am Beispiel von Beta-2-Microglobulin gezeigt wurde, ist die Auswertung bei Proben mit mehrkettigen Peptiden erschwert, welche während der Reduktion der Disulfidbrücken auseinanderbrechen, da die Zuordnung im Massenspektrum äußerst aufwendig ist. Für diese Fälle konnten alternative Methoden etabliert werden, die in nachfolgenden Kapiteln beschrieben werden. Dennoch konnte das etablierte Verfahren als ein wichtiges Hilfsmittel bei der Auffindung von cysteinhaltigen Peptiden eingesetzt werden und es gelang damit, zahlreiche Peptide im Rahmen des *Peptide Trappings* zu identifizieren.

Die Methode lässt sich aber nicht nur für die Detektion cysteinhaltiger Peptide aus komplexen Gemischen heraus einsetzen, sondern eignet sich darüber hinaus sehr gut zur Bestimmung des Cysteingehaltes bei aufgereinigten Einzelpeptiden. Da die zu bestimmenden Peptide und Proteine bei den Sequenzierungen nach Edman oder durch massenspektrometrische Verfahren selten vollständig mit ihrer kompletten Aminosäureabfolge bestimmt werden, dient die Kenntnis des Cysteingehaltes neben der Kenntnis des genauen Molekulargewichts als wichtiger Indikator für die Richtigkeit der Rechercheergebnisse in den Protein-Datenbanken. Die vollständige Sequenzbestimmung ist beim Edman-Abbau zum einen aufgrund der Länge eines Peptids und der zur Verfügung stehenden Menge nicht immer möglich, da bei jedem Abbauschritt Verluste des Probenmaterials auftreten und dadurch nach einer bestimmten Anzahl von Abbauschritten keine Bestimmung mehr möglich ist. Zum anderen wird zudem aus Kosten- und Kapazitätsgründen keine vollständige Sequenzierung durchgeführt.

#### 4.4 Der Einsatz weiterer Modifizierungsreagenzien zum Nachweis von cysteinhaltigen Peptiden

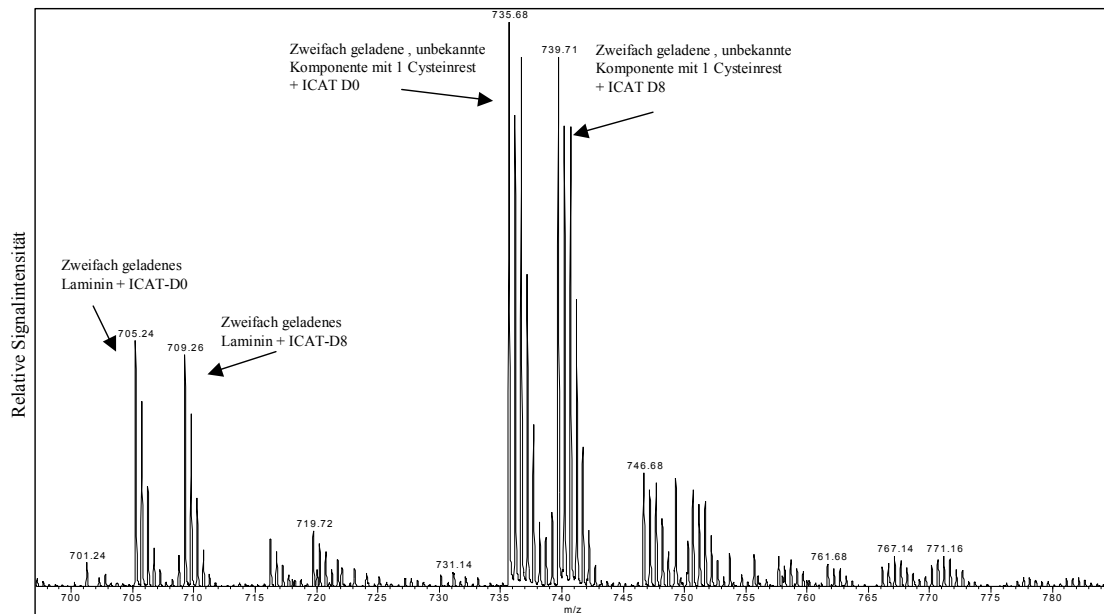
Für die Modifizierung von Cysteinresten in Peptiden und Proteinen standen eine ganze Reihe von kommerziell erhältlichen Reagenzien zur Verfügung. Neben Iodacetamid wurden deshalb verschiedene Modifizierungsreagenzien getestet, die in den folgenden Abschnitten vorgestellt und auf ihre Anwendbarkeit in bezug auf komplexe, biologische Peptidgemische untersucht und diskutiert werden sollen.

##### 4.4.1 Modifizierung mit ICAT

Als weitere Möglichkeit zur Modifizierung von Cysteinresten wurde die im Jahre 1999 von *Gygi et al.* publizierte Methode getestet, die ursprünglich zur Reduktion der Probenkomplexität und Quantifizierung von Proteinen in komplexen Gemischen entwickelt wurde. Die Versuche zur Eignung dieser Methode für eine Abtrennung von cysteinhaltigen Peptiden in komplexen biologischen Proben wurden mit einem Test-Kit der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt.

Die für diesen Ansatz herangezogene, gut charakterisierte Peptidbankfraktion 7-29 mit gespiktem Peptidstandard Laminin zeigte nach Durchführung des Versuchs ohne tryptischen Verdau im ESI-QTOF-Spektrum fast ausschließlich Hauptsignale, die sich auf den mit ICAT modifizierten Standard zurückführen lassen. Ein Ausschnitt aus dem Massenspektrum der Probe ist in der folgenden Abbildung 25 dargestellt. Von den - in Kapitel 4.3.4 beschriebenen, nach S-Carboxyamidomethylierung identifizierten Peptiden aus dieser Probe - lassen sich hier keine detektieren, obwohl die für den Versuch eingesetzte Menge für eine Detektion im ESI-QTOF-MS (ausgestattet mit einer Nanospray-Quelle) absolut ausreichend war. Es scheint daher bei dem Versuch während der einzelnen Schritte zu nicht unerheblichen Probenverlusten zu kommen.

Problematisch ist die Anwendung, weil das Modifizierungsreagenz pro Cysteinrest einen relativ grossen Massenshift von 442,23 Da (für D0) bzw. 450,28 Da (für D8) im Peptid herbeiführt. Infolge dessen kann es bei grösseren Peptiden mit einer Anzahl von mehreren Cysteinresten zu so hohen Massenverschiebungen kommen, welche bei der massenspektrometrischen Messung mit dem ESI-QTOF-MS nicht mehr vollständig mit ihrem Isotopenmuster aufgelöst werden können. Eine Zuordnung der einzelnen Ladungszustände zur Muttermasse erweist sich damit als sehr schwierig.



**Abbildung 25:** Ausschnitt aus dem im ESI-QTOF-MS im Nano-Modus erzeugtem Massenspektrum der Fraktion 7-29 mit gespiktem Laminin.

Da hier kein quantifizierender Vergleich zwischen zwei Proben durchgeführt werden sollte, bietet die Methode daher keinen wirklichen Vorteil gegenüber der bewährten Methode der S-Carboxyamidomethylierung. Auch der Versuchsaufwand für die weitere Etablierung dieser Methode wäre in Bezug auf Zeit und Kosten nicht zweckmäßig.

Ein weiteres, nicht unwichtiges Problem bei dem nach dem Hersteller-Protokoll angewandten zweiten Ansatz mit tryptischem Verdau ergibt sich aus der Tatsache, dass die tryptisch erzeugtem Peptide keinen Aufschluss mehr darüber geben, in welcher Form sie ursprünglich in der biologischen Probe vorlagen. Diese Durchführung ist also zur Detektion cysteinhaltiger Peptide aus komplexen, biologischen Proben nicht geeignet, wohl aber für die Analyse von einzelnen Proteinen und Peptiden.

#### 4.4.2 Modifizierung mit 4-Vinylpyridin

4-Vinylpyridin ist ein verbreitetes Reagenz für die Modifizierung von Cysteinresten zur Stabilisierung und zum Nachweis der Peptide und Proteine zum Beispiel vor der Anwendung gelelektrophoretischer Proteintrennungen oder der Aminosäuresequenzierung über Edman-Abbau [Friedman, M. *et al.* 1970; Sechi, S. *et al.* 1998]. Vor der Trennung in einem Polyacrylamidgel werden die Proteine alkyliert und später aus dem Gel als Einzelkomponenten tryptisch verdaut. Die Identifizierung der Proteine erfolgt darauf meist über massenspektro-

metrische Methoden. Das modifizierte Cystein (S- $\beta$ -(4-pyridylethyl)-cystein) zeigt des weiteren in der RP-Chromatographie bei einer Wellenlänge von 254 nm eine Absorption [Moritz, R.L. *et al.* 1996]. Die Anwendung in nativen, komplexen Peptidgemischen in bezug auf die Vollständigkeit der Modifizierung, Bildung von Nebenprodukten und der Handhabbarkeit des verwendeten Reagenzes wurde hier getestet. Als Einsatzstrategie wurde die Identifizierung der cysteinhaltigen Peptide über die spezifische Absorption bei 254 nm während der RP-Chromatographie und die differentielle Analyse über die Detektion von Peakshifts im Massenspektrum angestrebt. Nach erfolgter Modifizierung wurden die Peptidbankfraktionen und die eingesetzten Peptidstandards über RP-Chromatographie getrennt und die Fraktionen einer MALDI-TOF-Messung unterzogen.

Erste Ansätze zeigten in den Spektren der durchgeführten MALDI-TOF-Messungen, dass es zu unvollständigen Modifizierungen an den cysteinhaltigen Peptiden und zur Bildung von Nebenprodukten kommt. Da die Substanz auch von der Handhabung (starke, unangenehme Geruchsbildung und begrenzte Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln) nicht unproblematisch war, wurde von weiteren Optimierungen für den Einsatz von 4-Vinylpyridin zur Modifizierung und zum Nachweis von cysteinhaltigen Peptiden aus komplexen Gemischen abgesehen.

#### 4.4.3 Modifizierung mit DABIA

Dieses hydrophobe Iodacetamid-Derivat wurde untersucht, weil es durch seine stark molekülverändernden Eigenschaften als besonders geeignet erschien. Durch die starke Hydrophobizität der eingefügten Gruppe in die entsprechenden Peptide eluieren sie während der Gradientenelution in der RP-Chromatographie später und müssten sich auf diese Weise von den cysteinfreien Peptiden in der Probe trennen lassen. Des weiteren kommt es bei den cysteinhaltigen Peptiden im Chromatogramm bei einer gewählten Wellenlänge von 215 nm und einer Referenzwellenlänge von 450 nm zu der Ausbildung von Peaks, die eine negative Absorption zeigen [Cardamone, M. *et al.* 1993; Chang, J.Y. *et al.* 1983].

Die Peptidproben wurden nach der chemischen Modifizierung mit DABIA einer RP-Chromatographie unterzogen und ausserdem wurden Spektren im MALDI-TOF-MS aufgenommen. Die Experimente haben gezeigt, dass diese Methode sich nicht gut für den Einsatz in komplexen, biologischen Proben eignet. Die Ausbildung von Peaks mit negativer Absorption ist bei derart komplexen Proben, bei denen die Peptide im Chromatogramm kaum basis-

liniengetreunt, sondern in einem breiten „Berg“ eluieren, nicht mehr eindeutig detektierbar. Peptide mit mehr als einem Cysteinrest werden durch die eingefügten, hydrophoben Gruppen in der RP-Chromatographie so weit nach hinten verschoben, dass sie erst bei einer Laufmittelzusammensetzung von 95 % Acetonitril eluieren. Diese Eigenschaft ließe sich zwar als großer Vorteil ausnutzen, um eine quantitative Abtrennung der cysteinhaltigen Peptide von den übrigen zu erreichen, doch die extrem hydrophoben Eigenschaften der modifizierten Peptide erschweren in hohem Maße die weitere Analytik. Die Analysen der nur in basischen Lösungsmitteln gut löslichen Probe waren im MALDI-TOF-MS nur sehr bedingt möglich, da ein homogenes und vollständiges Auskristallisieren der Matrix nicht mehr gewährleistet war. Um diese Methode effektiv einsetzen zu können, hätten zur weiteren Verarbeitung und Analyse der Peptidproben neue, aufwendige Methoden etabliert werden müssen.

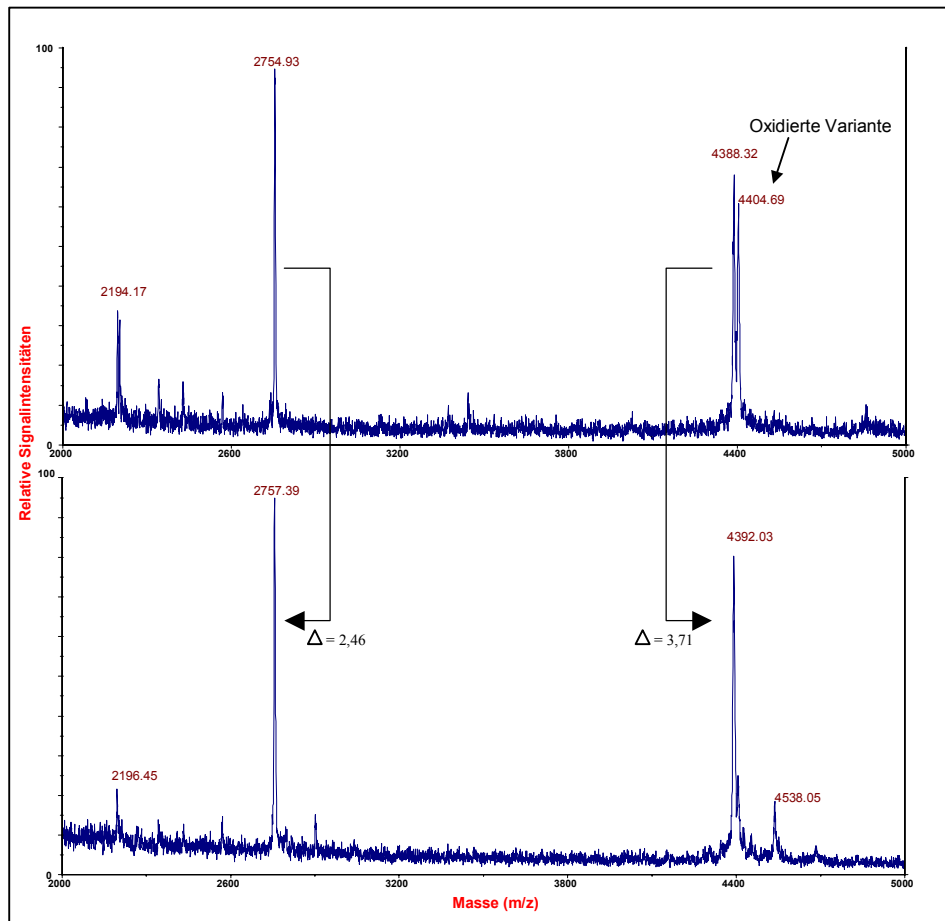
#### 4.4.4 Modifizierung mit TCEP

Neben DTT wurde als weiteres Reduktionsmittel Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) getestet, da es gegenüber DTT einige Vorteile besitzt. Die Reaktion verläuft schneller und lässt sich sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmitteln durchführen [Burmeister Getz, E. *et al.* 1999; Burns, J.A. *et al.* 1991; Gray, W.R. 1993]. Des Weiteren ist es über einen weiten pH-Bereich einsetzbar. Da das überschüssige Reagenz bei der massenspektrometrischen Analyse der reduzierten Peptide im linearen MALDI-TOF-MS das Auskristallisieren der Probenmatrix nicht behindert, entfallen die nach chemischer Modifikation notwendigen Entsalzungsschritte. Bei diesem Ansatz erfolgt also ausschließlich eine Reduktion der Disulfidbrücken in cysteinhaltigen Peptiden mit der Idee, die dadurch hervorgerufenen Massenshifts von 2 Da pro gespaltenen Brücke im MALDI-TOF-MS zu detektieren. Eine weitere chemische Modifizierung erfolgt nicht. Dieser Schritt würde salzhaltige oder andere störende Puffer erfordern, die eine problemlose Analyse der Peptide im Massenspektrometer ohne vorherige Entsalzung nicht mehr ermöglichen.

RP-Fractionen aus einer Präparation von Cerebrospinalflüssigkeit wurden nach Reduktion mit TCEP direkt im MALDI-TOF-MS im linearen Messmodus gemessen. Für den differentiellen Vergleich wurde als Kontrolle ein weiteres Aliquot der Probe ohne TCEP behandelt und auf die gleiche Weise gemessen. Es hat sich gezeigt, dass die Massengenauigkeit des MALDI-TOF-MS von ca. 300 ppm bei externer Kalibrierung zwar ausreicht, um bei cysteinreichen Peptiden größere Shifts zu detektieren, aber eine genaue Angabe über die



Zahl der Cysteinreste ist nur bedingt möglich. Die Abbildung 26 zeigt die vergleichenden Spektren aus Fr. 49 im oxidierten und reduzierten Zustand, welche dieses Problem durch die hier detektierten, ungeraden Massenshifts von 2,46 bzw. 3,71 veranschaulichen.



**Abbildung 26:** MALDI-TOF-Massenspektren ( $m/z$ -Bereich 2000-5000) der Kontrollfraktion (oben, oxidierte Rohfraktion) und der mit TCEP reduzierten RP-Fraktion 49 (unten) aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit. Die oxidierte Variante ( $m/z = 4404,69$ ) des Peptids mit  $m/z = 4388,32$  (oberes Spektrum) wird durch die Behandlung mit TCEP ebenfalls reduziert (minus 16 Da).

Trotzdem die Anzahl der Cysteinreste in einem Peptid nicht immer genau bestimmt werden kann, wird die vergleichende Analyse nach Reduktion mit TCEP als alternatives Verfahren zur S-Carboxyamidomethylierung angewendet. Weil die Detektion der geringen Massenshifts aber eine hohe Genauigkeit des verwendeten Massenspektrometers und zudem eine intensive und zeitaufwendige Bewertung der Spektren aufgrund der geringen Massenshifts erfordert, wird dieser Ansatz ausschließlich bei Proben eingesetzt, bei denen nur geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. Bei diesen Proben würde der Einsatz weiterer Modifizierungsmittel durch die erforderlichen Entsalzungen zu weiteren Materialverlusten führen.

#### 4.5 Die Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden durch die Anwendung von kovalenter Chromatographie

Aufgrund der hohen Komplexität der Proben und der Kenntnis darüber, dass nicht alle der in einer Probe vorliegenden Peptide im MALDI-MS detektiert werden können, wurde als weitere Strategie die kovalente Chromatographie in Betracht gezogen, da sie bei ausreichender Spezifität entscheidende Vorteile gegenüber den bisher vorgestellten Methoden auf der Basis von vergleichenden Analysen nach chemischer Modifizierung der Cysteinreste besitzt.

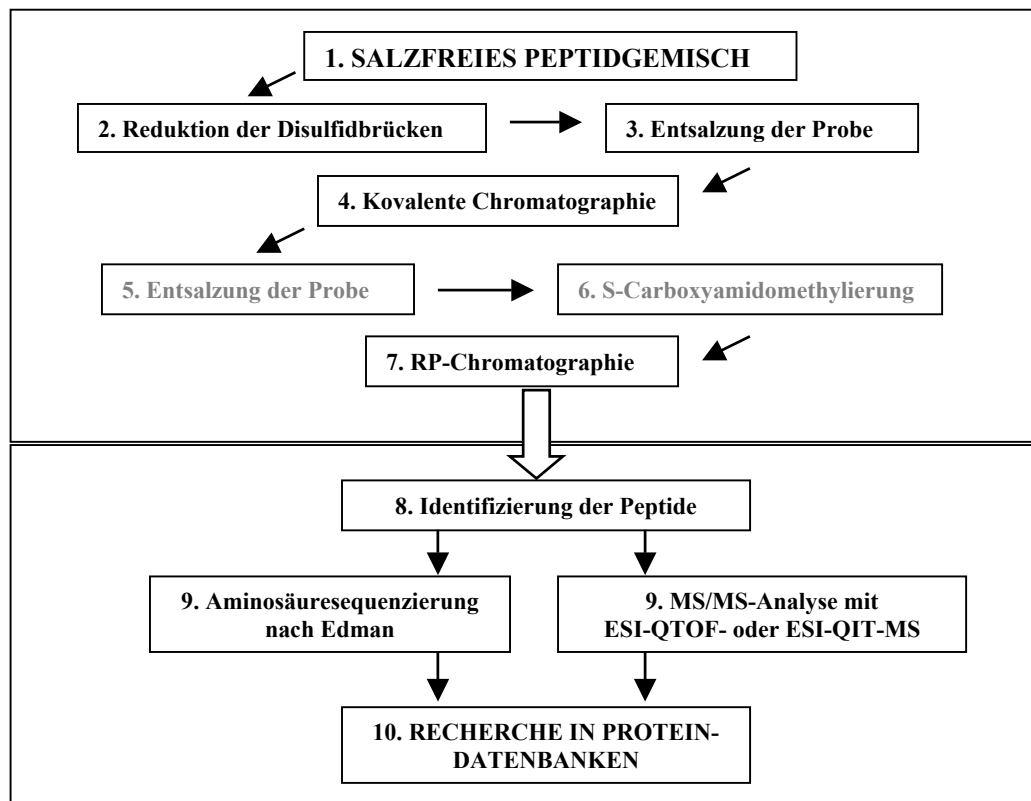
Zum einen ist hier durch die hohe Selektivität des Adsorbenten eine Anreicherung der cysteinhaltigen Peptide gegeben. Es wird dadurch eine weitere Reduzierung der Probenkomplexität erreicht und es sollten sich auch diejenigen Peptide erfassen lassen, die in den Probengemischen in geringeren Konzentrationen vorliegen. Des weiteren werden in einem Schritt die cysteinhaltigen Peptide von den cysteinfreien abgetrennt. Für die nachfolgende Weiterverarbeitung ist dieser Umstand von großer Bedeutung, da nur noch die relevanten cysteinhaltigen Peptide zur Verfügung stehen und diese weitgehend der Analyse zugeführt werden können.

Als stationäre Phase wurde das kommerziell erhältliche Gelmaterial Thiopropyl Sepharose 6B (TPS) eingesetzt, welches als aktive, thiolbindende Gruppe 2-Pyridyldisulfid an der Matrix gebunden hat. Da das Material nur eine geringe Druckstabilität besitzt und ausserdem nur einmal benutzt wurde, wurden die Versuche nicht mit einer automatisierten Chromatographieranlage durchgeführt, sondern manuell mit Hilfe von Einmalsäulen in unterschiedlichen Größen. Die verwendeten Säulen lassen sich über Adapter mit Einwegspritzen koppeln und mit den entsprechenden Lösungen spülen. Da diese verschließbar sind und längere Kontaktzeiten der Proben mit dem Packungsmaterial für die Bindung der cysteinhaltigen Peptide bei diesem Ansatz von Vorteil sind, wurde von einer Automatisierung dieses Schrittes abgesehen.

Das Schema in Abbildung 27 zeigt die Verarbeitung der Proben von der Präparation bis zur Identifizierung der Peptide, wie sie nach der Etablierung der beschriebenen Methode angewendet wurde. Die gesamte Prozedur umfasst eine ganze Reihe von Teilschritten, die je nach vorliegender Probenart und -menge leicht abgewandelt wurden.

Zu Beginn wurden kleinere Ansätze von 2-3 mg von einzelnen Fraktionen der Peptidbank 970303 verarbeitet. Bei diesen erfolgte direkt nach der Abtrennung der cysteinhaltigen Peptide in Schritt 4 die weitere Separation der Proben durch RP-Chromatographie. Es wurden zunächst keine weiteren Modifizierungen der im reduzierten Zustand vorliegenden Fraktionen aus dem Eluat durchgeführt, da die Stabilität der reduzierten Peptide in den benutzten, aus-

schließlich sauren Lösungsmitteln und Puffern sehr hoch ist und keine Reoxidationen der freien Cysteinreste zu erwarten waren.



**Abbildung 27:** Vorgehen bei der Isolierung und Charakterisierung von cysteinhaltigen Peptiden mit Hilfe der kovalenten Chromatographie. Im oberen Abschnitt ist die Probenvorbereitung dargestellt, im unteren Block die schematische Darstellung der Identifizierung. Die Arbeitsschritte 5 und 6 wurden nicht bei allen Versuchsansätzen durchgeführt.

Als ein Beispiel soll an dieser Stelle die Fraktion 26 aus pH-Pool 2 vorgestellt und diskutiert werden. Eingesetzt wurde eine Menge von 3 mg der genannten Fraktion aus der Peptidbank, die nach dem oben vorgestellten Schema verarbeitet wurden. Vom Gesamteluat aus Schritt 4 wurde nach erfolgter, kovalenter Chromatographie ein kleines Aliquot entsalzt und davon im Massenspektrometer ein MALDI-Spektrum aufgenommen.

Aus dem unbehandelten Resteluat wurde direkt eine weitere Auftrennung der Peptide über eine RP-Chromatographie vorgenommen. Einzelne Peptide wurden aus den erhaltenen Fraktionen nach kapillarelektrophoretischer Reinheitskontrolle über Edman-Sequenzierung identifiziert.

Die Tabelle 6 zeigt die identifizierten Peptide und Proteinfragmente aus dieser Fraktion. Es konnten neben drei Fragmenten aus den Proteinen Serumalbumin und *beta*-2-Microglobulin zwei weitere, biologisch aktive und cysteinreiche Substanzen isoliert werden, die strukturell

und funktionell eher den Peptiden als den Proteinen zuzuordnen sind.

Detektierte Masse als m/z	Identifiziertes Peptid als Precursor (Prec.)	Anzahl der Cysteinreste
3839,8	<i>beta</i> -2-Microglobulin Prec. 88-119	1
4003,4	<i>beta</i> -2-Microglobulin Prec. 87-119	1
5404,8	Serumalbumin Prec. 92-138	4
5536,2	Pankreatischer Sekretorischer Trypsin Inhibitor Prec. 24-72	5
6249,4	Pankreatischer Sekretorischer Trypsin Inhibitor Prec. 24-79	6
6701,1	Serine Protease Inhibitor Kazal-Typ 4 Prec. 27-86	6

**Tabelle 6:** Über Edman-Sequenzierung identifizierte Peptide und Proteinfragmente aus der Peptidbank 970303, Fraktion 26 des pH-Pools 2.

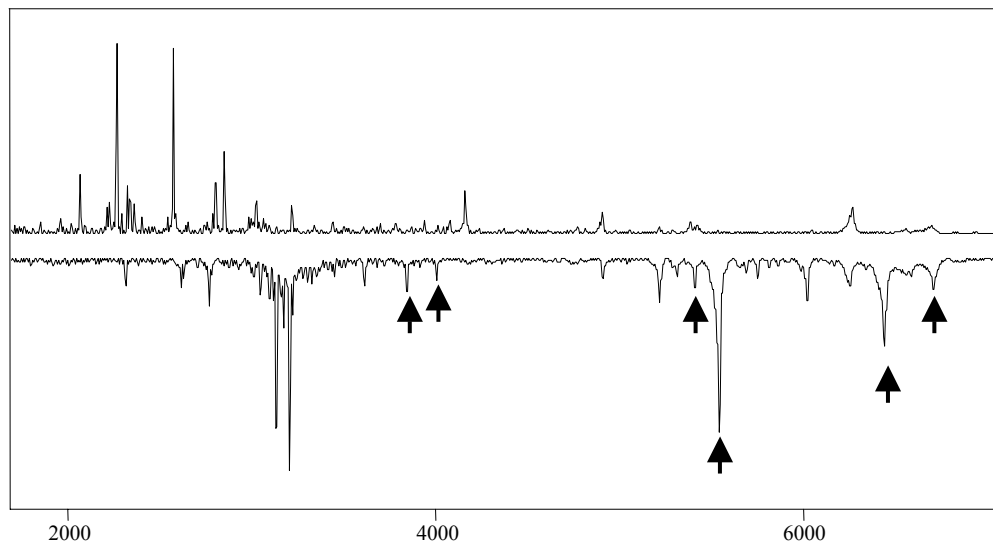
Der *Pankreatische Sekretorische Trypsin-Inhibitor* konnte aus dieser Peptidbankfraktion einmal in seiner biologisch aktiven Form isoliert werden, des weiteren als C-terminal trunctiertes Fragment. Alle sechs Cysteinreste liegen gänzlich oxidiert in verbrückter Form vor. Die physiologische Funktion dieses Peptides besteht darin, die frühzeitige, durch Trypsin katalysierte Aktivierung von Zymogenen, also den inaktiven Vorstufen der Proteasen im Verdauungsssekret, in der Bauchspeicheldrüse zu inhibieren.

Das ebenfalls aus dieser Fraktion isolierte Peptid *Serine Protease Inhibitor Kazal-Typ 4* besitzt ebenfalls sechs, vollständig zu Disulfidbrücken oxidierte Cysteinreste, die charakteristisch für diese Art von Protease-Inhibitoren sind. Über die Funktion dieses gastrointestinalen Peptids ist bisher wenig bekannt. Auffällig ist die hohe Sequenzhomologie von 70 % zu dem Peptid PEC-60, welches aus Schweinedarm isoliert wurde und dessen biologische Funktion ebenso nicht gänzlich bekannt ist [Agerberth, B. *et al.* 1989]. Als eine der bekannten Wirkungen von PEC-60 konnte die Inhibition auf die glucose-induzierte Insulinsekretion im Pankreas beschrieben werden [Metsis, M. *et al.* 1992]. Ebenfalls wird ein Zusammenhang dieser Peptide mit Tumorerkrankungen diskutiert.

In Abbildung 28 sind die Massenspektren der Peptidbankfraktion ohne Behandlung und das Spektrum vom erhaltenen Eluat aus der kovalenten Chromatographie dargestellt. Deutlich wird hier, dass sich die Spektren ganz erheblich bezüglich ihrer detektierten Massen voneinander unterscheiden. Wenige der detektierten Peaks aus dem Eluat, in welchem sich nur noch cysteinhaltige Peptide befinden sollten, konnten im oben abgebildeten Spektrum der unbehandelten Peptidbankfraktion nachgewiesen werden. Dieser Umstand zeigt deutlich die Komplexität der untersuchten Proben und dass ein ganz erheblicher Anteil der in der Probe enthaltenen Substanzen nicht detektiert werden.

Durch die Abtrennung der cysteinfreien Peptide ist es gelungen, infolge des Anreicherungs-

fekts und der Verringerung der Komplexität der kovalenten Chromatographie mit nur einem weiteren Schritt in die Tiefe der Proben vorzudringen. Weniger konzentrierte, cysteinhaltige Peptide konnten identifiziert werden, die auf Ebene der Peptidbank nicht oder nur schwach detektierbar waren. Neben der geringeren Konzentration dieser Komponenten spielen dabei sicherlich auch Einflüsse der Peptidmoleküle untereinander eine Rolle, welche den Desorptionsvorgang im MALDI-TOF-MS mit beeinflussen.



**Abbildung 28:** Oben: MALDI-Spektrum aus der Peptidbankfraktion 2-26. Unten: Invertiertes Massenspektrum des entsalzten Eluats aus der kovalenten Chromatographie mit Thiopropyl Sepharose. Die mit Pfeil markierten Peaks wurden mittels Edman-Sequenzierung und anschließender Datenbankrecherche identifiziert und sind in Tabelle 6 dargestellt.

Generell würde es durch weitere RP-Chromatographieschritte sicherlich gelingen, aus der Peptidbankfraktion wesentlich mehr Peptide zu detektieren, doch es stellt einen erheblich größeren zeitlichen und finanziellen Aufwand dar, um die relevanten cysteinhaltigen Peptide zu erfassen und zu identifizieren. Durch den Einsatz der kovalenten Chromatographie gelingt es dagegen in einem Arbeitsschritt, diese Peptide zu selektieren und anzureichern.

#### 4.5.1 Automatisierung der Sequenzanalyse nach kovalenter Chromatographie mit Thiopropyl Sepharose

Das vorhergehende Beispiel hat gezeigt, dass die Abtrennung von cysteinhaltigen Peptiden in kleineren Ansätzen bezüglich der Probenvorbereitung bis zum Zeitpunkt der Sequenzanalyse der Peptide gut funktioniert, da alle bisher identifizierten Peptide Cysteinreste enthielten. Allerdings lassen sich viele der detektierten Peptide auch hier nicht weiter über Edman-

Sequenzierung analysieren, da nach weiterer chromatographischer Aufreinigung die erforderliche Peptidmenge nicht immer gegeben ist. Zudem ist eine chromatographische Aufreinigung aller Komponenten zeitaufwendig und kostspielig, so dass im folgenden Kapitel ein besonderes Augenmerk auf die Sequenzierung der cysteinhaltigen Peptide durch automatisierte, massenspektrometrische Methoden gelegt werden soll.

#### 4.5.2 Der automatisierte Weg vom MALDI-TOF-MS bis zur Analyse der cysteinhaltigen Peptide

In der Firma BioVision konnte die massenspektrometrische Sequenzierung von Peptiden aus humanem Blutfiltrat unter Einsatz eines Ionenfallen-Massenspektrometers erfolgreich etabliert werden. Dafür werden zuerst MALDI-TOF-Messungen im Reflektron-Modus durchgeführt, um eine höchst mögliche Massengenauigkeit für die zu identifizierenden Komponenten zu gewährleisten. Die erhaltenen Peaklisten aus diesen Messungen werden inklusive den  $m/z$ -Werten und den entsprechenden Signalintensitäten als Textdateien in das im Haus entwickelte Programm *Alcatrap* importiert. In diesem Tool werden die theoretisch möglichen Ladungszustände der im MALDI-TOF-MS detektierten Ionen berechnet, wobei aus den gemessenen Signalintensitäten eine definierte Anzahl der intensivsten Ionen ausgewählt werden kann. Die daraus erhaltenen, wiederum als Textdatei vorliegenden Peaklisten aus den  $m/z$ -Werten aus ein- bis vierfach geladenen Ionen werden für die automatische Abarbeitung der Fraktionen im Ionenfallen-Massenspektrometer prozessiert. In einem kompatiblen Format werden sie danach in die entsprechenden Messmethoden des Steuerprogrammes importiert.

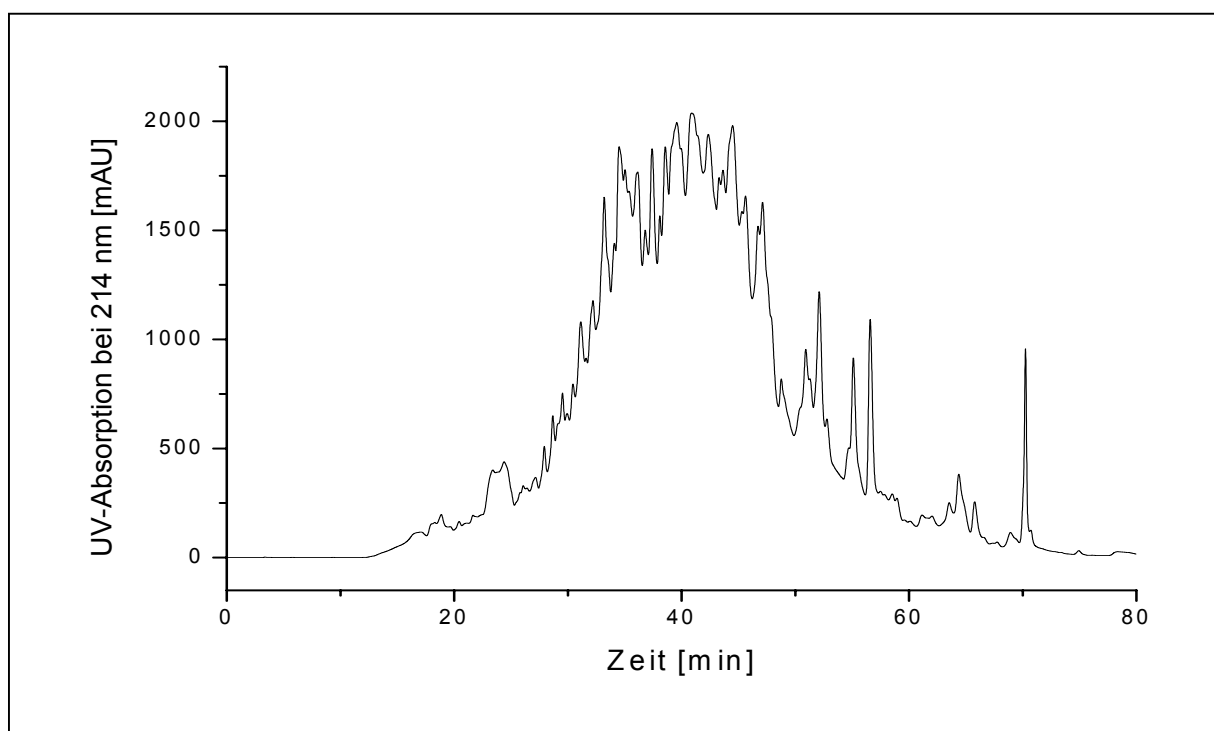
Nach der Analyse im Ionenfallen-Massenspektrometer werden die durch Fragmentierungen erhaltenen Massenspektren für die erforderlichen Recherchen in Protein- und Nukleotid-Datenbanken in das Suchprogramm *Mascot* importiert. Die wiederum als Textdateien vorliegenden Daten werden über das in *Mascot* integrierte Programm *Daemon* (Matrix Science) geladen, welches eine automatische Abarbeitung der gesamten Recherche im Batch-Verfahren und kaskadierend in verschiedenen Datenbanken ermöglicht.

#### 4.5.3 Die Anwendung der automatisierten Sequenzanalyse mittels ESI-QIT-MS

Als exemplarisches Beispiel soll an dieser Stelle der pH-Pool 2 betrachtet werden. Ein Überblick über die Herstellung dieser Pools ist in Kapitel 3.1.1 beschrieben worden. Der hier verarbeitete pH-Pool 2 wurde durch die Elution mit einem Gemisch aus 0.1 M Essigsäure und

0.1 M Natriumacetat (pH-Wert 4.5) erhalten und enthielt etwa 15,6 Gewichtsprozent des gesamten Peptidmaterials aus der eingesetzten Blutfiltratmenge.

Für den Versuch wurde ein Äquivalent aus 45.6 Litern Hämofiltrat lyophilisiert und zur Reduktion in 4-Methylmorpholin gelöst. Nach Zugabe von DTT und Inkubation wurden die Proben durch Festphasenextraktion entsalzt und schließlich der kovalenten Chromatographie mit Thiopropyl Sepharose unterzogen. Das Eluat wurde erneut entsalzt und zusätzlich S-carboxyamidomethyliert. Der Reaktionsansatz wurde nach erfolgter Inkubation einer RP-Chromatographie zur weiteren Auftrennung der cysteininhaltigen Peptide unterzogen. In der Abbildung 29 ist das RP-Chromatogramm dieses pH-Pools dargestellt.



**Abbildung 29:** RP-Chromatographie des S-carboxyamidomethylierten TPS-Eluats aus pH-Pool 2 der Peptidbank 970303. Verwendete Chromatographie-Säule: RP C18 (250 x 4 mm, Reprosil pur AQ-5µm), Gradient: 0–60 % Laufmittel B (80 % Acetonitril/0,05 % TFA) in 60 Minuten; Fluß: 0,8 mL/min

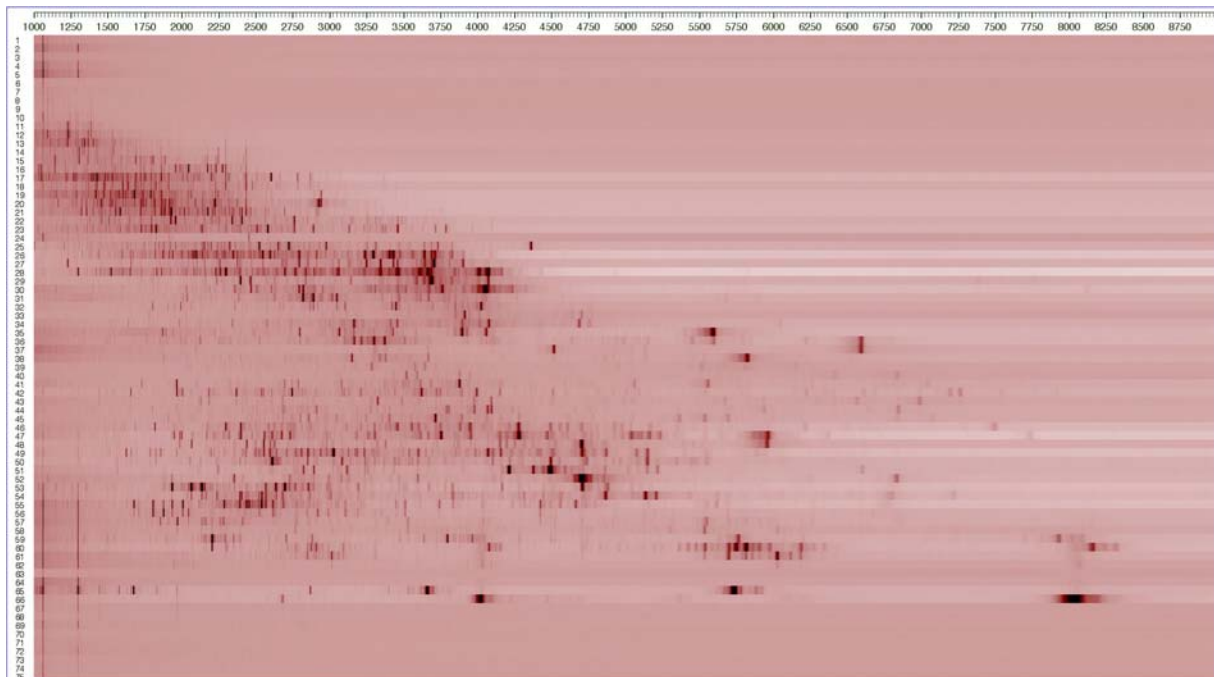
Ab der 5. Minute wurden Fraktionen in Schritten von jeweils 60 Sekunden automatisch in *96-deep well*-Platten gesammelt und aliquotiert. Aus den erhaltenen RP-Fraktionen wurden zuerst Messungen im MALDI-TOF-MS im Reflektoren-Modus durchgeführt, um die Peaklisten für die nachfolgenden Sequenzierungen zu generieren. Der gewählte Massenbereich wurde dabei an die Messparameter des verwendeten Ionenfallen-Massenspektrometers angepasst und erstreckt sich über einen  $m/z$ -Bereich von 1000-4000.

Des Weiteren werden zusätzliche MALDI Messungen im Linear-Modus durchgeführt, um

einen Überblick über das gesamte Peptidspektrum zu erhalten. Zudem wurde für die weiterführenden Sequenzanalysen von Peptiden mit höheren Molekulargewichten im Edman-Sequencer oder im ESI-QTOF-MS eine Abdeckung über den gesamten Massenbereich der Peptide benötigt.

Ein Vorteil der angewandten Messmethoden des MALDI-TOF-MS ist der während der Analysen sehr geringe Probenverbrauch. Während des Desorptionsprozesses aus der Matrix heraus bzw. beim Übergang der Peptidionen in die Gasphase wird nur ein relativ geringer Anteil der vorhandenen Peptidmoleküle verbraucht. Sowohl Reflektion- als auch Linear-Messung können daher auf der gleichen Probenplatte erfolgen.

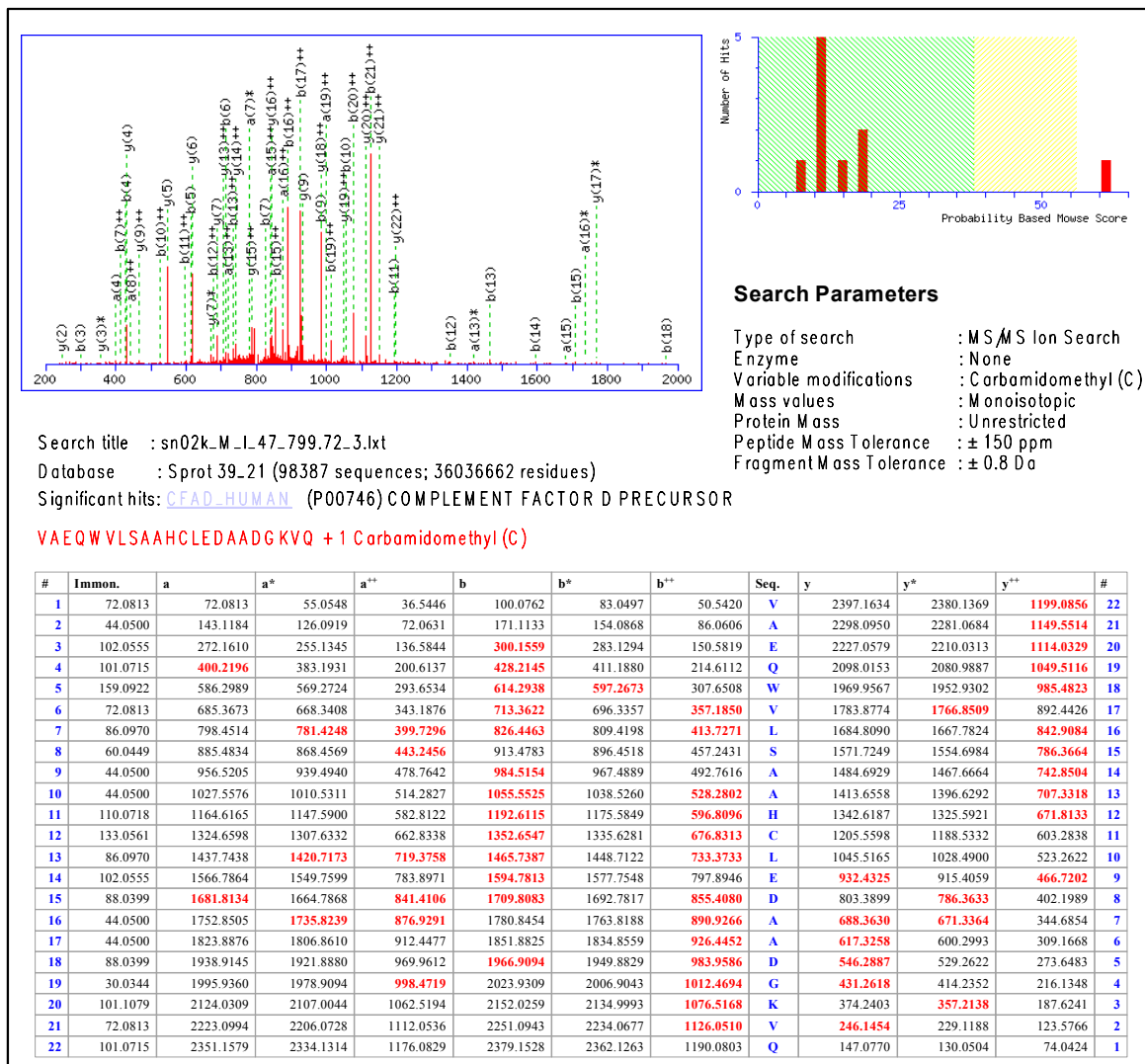
Neben dem oben abgebildeten Chromatogramm ist in der Abbildung 30 die mit *Spectromania* erstellte Peptidkarte aus der linearen MALDI-Messung dargestellt. Wie das Chromatogramm spiegeln auch diese Karten die hohe Komplexität der Proben wieder. Die tatsächliche Anzahl der Peptide ist aber wegen der großen Anzahl nicht detektierbarer Ionen schwer ermittelbar. Durch die früheren und sehr zahlreichen Auswertungen von Massenspektren vor und nach chromatographischer Auftrennung einer komplexen Probe konnten hierfür grobe Schätzwerte ermittelt werden, bei denen die tatsächliche Anzahl von Peptiden in einer Fraktion etwa um den Faktor 10 höher liegt.



**Abbildung 30:** Mit *Spectromania* erstellte Peptidkarte der im MALDI-TOF-MS gemessenen Fraktionen 1-75 aus dem pH-Pool 2 nach kovalenter Chromatographie (linearer Messmodus). Senkrechte: Fraktionsnummern aus der RP-Chromatographie; obere Skalierung: Massenbereich als  $m/z$ .

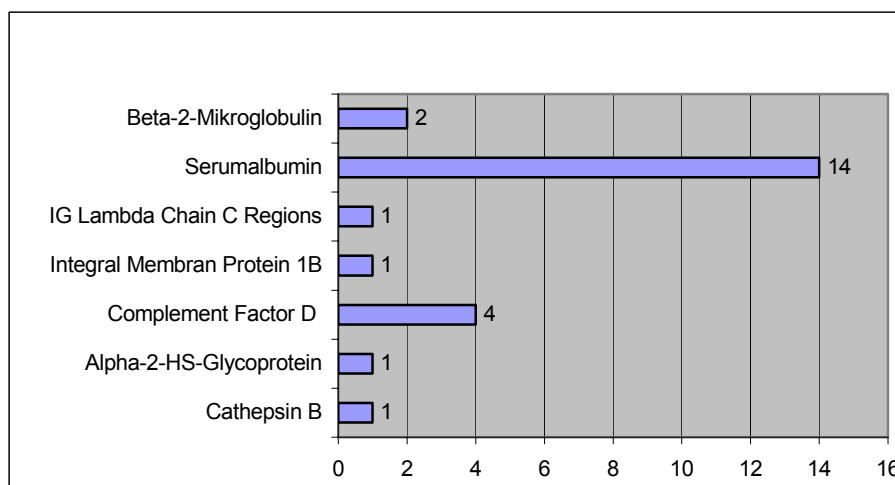


Für weitere Sequenzanalysen im Ionenfallen-Massenspektrometer wurden die einzusetzenden Verdünnungen der Fraktionen durch die Höhe der UV-Absorption der einzelnen Fraktionen aus dem RP-Chromatogramm ermittelt, um optimale Probenkonzentrationen für die erforderliche massenspektrometrische Messung zu erhalten. Fraktionen mit einem Absorptionswert größer als 1000 mAU wurden in einer 1:2-Verdünnung eingesetzt, die Randfraktionen dagegen wurden doppelt aufkonzentriert. Die Abbildung 31 zeigt ein typisches Beispiel des Ergebnis eines im ESI-QIT-MS generiertes MS/MS-Spektrums, aus dessen Daten in *Swiss-Prot* ein Fragment aus dem Protein *Complement Faktor D Precursor* identifiziert werden konnte. Die Darstellung ist dem Format des Suchergebnisses in *Mascot* entnommen.



**Abbildung 31:** Ausschnitt aus der Darstellung des Suchergebnisses in *Swiss-Prot* mit dem Suchprogramm *Mascot*. Links oben ist das theoretisch berechnete Fragmentspektrum mit den detektierten Ionen dargestellt. Das Balkendiagramm rechts oben stellt den Score, d.h. die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit der gefundenen Sequenzen graphisch dar. Balken im weißen Bereich weisen eine Wahrscheinlichkeit von < 5 % auf, dass es sich um einen Zufallstreffer handelt und sind somit besonders relevant. Die Tabelle zeigt alle theoretisch möglichen Tochterionen des höchsten Scores an. Die rote Werte wurden im experimentell erzeugten Massenspektrum abgedeckt. Die „Search Parameters“ geben die ausgewählten Parameter für die eingeschränkte Suche in der Datenbank an.

In einem im Suchprogramm integrierten *Parameter Editor* wurden für die Suche in den Proteindatenbanken bestimmte Voreinstellungen vorgenommen. Neben taxonomischen Einschränkungen lassen sich fixe und variable Modifikationen angeben. Da in diesem Fall jedes der zu identifizierenden Peptide S-carboxyamidomethylierte Cysteinreste enthalten sollte, wurde dieser Parameter als feste Voreinstellung gewählt. Des Weiteren wird die Massentoleranz der Mutter- und Tochterionen angegeben. Die Suche erfolgte nacheinander in den Datenbanken *Swiss-Prot* und *MSDB* ohne Einschränkungen bezüglich der Spezies. Die Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der aus dem pH-Pool 2 identifizierten Peptide und Proteinfragmente.



**Tabelle 7:** Aus pH-Pool 2 der Peptidbank 970303 charakterisierte Peptide bzw. Proteinfragmente durch den Einsatz automatisierter Ionenfallen-Massenspektrometrie (ESI-QIT-MS).

Stellt man die Zahl der tatsächlich identifizierten Peptide den über MALDI-TOF-MS detektierten Massen in der Peptidkarte gegenüber, so tritt eine große Diskrepanz auf. Der limitierende Faktor bei der verwendeten Methode ist aber weder die Qualität der Probenvorbereitung noch die recht hohe Komplexität der einzelnen Peptidfraktionen, sondern der recht hohe Probenverbrauch. Bei der Probenzuführung vom Autosampler zur Ionenquelle des Massenspektrometers treten hohe Flüssigkeitsverluste durch den notwendigen Einsatz eines Flüssigkeit-Splitters auf. Zum anderen müssen aufgrund der eingesetzten Ionenquelle recht hohe Flussraten gewählt werden. Diesem Problem kann in Zukunft durch die permanente Weiterentwicklung des Probenzuführungssystems entgegen gewirkt werden. Weiterhin ist eine Weiterentwicklung bei der Automatisierung von Nanospray-Ionenquellen zu erwarten, die den Probenverbrauch in den Nanoliterbereich reduzieren können.

Ein Problem stellen die während der Datenbankabfrage nicht identifizierbaren Peptide dar, da

viele Fragmentspektren trotz guter Qualität der Daten keine sicheren Ergebnisse liefern. In diesen Fällen müssen zum einen weitere Recherchen unternommen werden, wobei verstärkt Suchen in Nukleotid- und EST-Datenbanken berücksichtigt werden, da viele der Sequenzen zwar auf der Ebene der Gene, aber noch nicht auf Proteinebene annotiert sind. Des Weiteren muss in manchen Fällen eine vollständige „*de novo*“-Sequenzierung erfolgen. Da bei den hier vorgestellten, automatischen MS/MS-Analysen selten die Abdeckung der kompletten Aminosäuresequenz eines Peptids erreicht wird, können Identifizierungsansätze über zusätzliche massenspektrometrische Techniken unternommen werden. Alternativ dazu kann die chromatographische Aufreinigung unbekannter Peptide und die Sequenzierung durch Edman-Abbau weiteren Aufschluss über die Kompletsequenz geben.

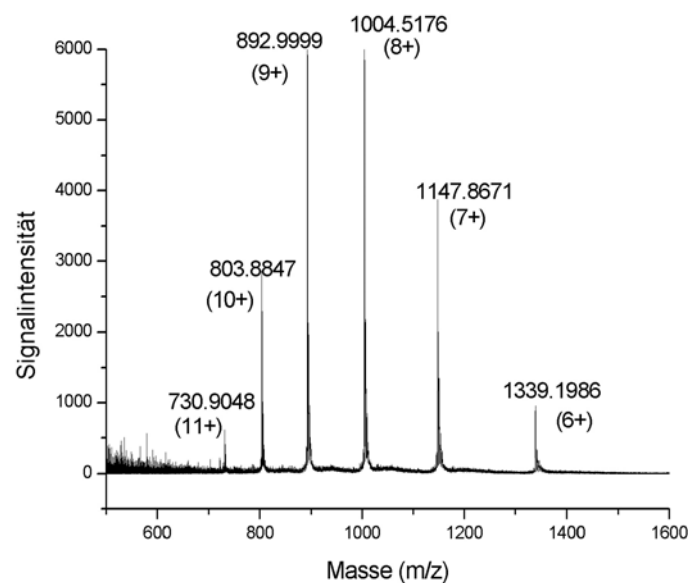
Zusammengefasst ist zum momentanen Zeitpunkt mit der hier beschriebenen Methode der Identifizierung von cysteinhaltigen Peptide eine wesentliche Verbesserung in Bezug auf Kosten- und Zeitersparnis im Gegensatz zu herkömmlichen Sequenzierungsmethoden wie der chromatographischen Aufreinigung und anschließender Sequenzierung der Peptide über Edman-Abbau zu verzeichnen. Der Grund liegt vor allem in der großen Erhöhung des Probendurchsatzes und in der Zunahme der Empfindlichkeit dieser Methoden.

#### 4.5.4 Die weitere Identifizierung von cysteinhaltigen Peptiden nach kovalenter Chromatographie mittels ESI-QTOF-MS

Da das Ionenfallen-Massenspektrometer in bezug auf den Massenbereich der zu identifizierenden Peptide limitiert ist, wurden neben den beschriebenen, automatisierten Sequenzierungen weitere Analysen per Edman-Abbau oder durch den Einsatz eines ESI-TripleQuadrupol-TOF-Massenspektrometers vorgenommen. Diese zwar im Augenblick noch relativ zeitaufwendige Methode, gerade in bezug auf die Auswertung der Spektren, hat im Vergleich zum oben verwendeten Ionenfallen-Massenspektrometers einige Vorteile, die diesen Zeitaufwand rechtfertigen. Augenblicklich wird zudem intensiv auch an diesem Gerät an der Automatisierung der Meßmethoden inklusive Auswertung und nötiger Datenbanksuchen gearbeitet, so dass in Zukunft mit einer weiteren Erhöhung des Probendurchsatzes zu rechnen ist.

Mit dem hier genannten, zur Verfügung stehenden Massenspektrometer lassen sich auch größere Peptide mit Molekulargewichten bis hin zu 10 kDa erfolgreich sequenzieren, da durch die Art der Ionisierung auch höhere Ladungszustände der einzelnen Peptidionen gebildet und detektiert werden. Durch die sehr hohe Massenauflösung von bis zu 15.000 (FWHM) lassen

sich diese auch mit ihrem Isotopenmuster darstellen und dadurch ihr Ladungszustand bestimmen. Da die Messungen im Nanospray-Modus erfolgen können, ist ein äußerst geringes Probenvolumen von nur 2-3  $\mu\text{L}$  notwendig. Durch die hohe Massengenauigkeit von besser 10 ppm bei externer Kalibrierung liefert das Gerät zudem sehr präzise Informationen, welche die Suchergebnisse in den Protein-Datenbanken stark verbessern. Da die cysteinhaltigen Peptide nach der Prozedur modifiziert vorliegen, sind diese auch ohne weiteres einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich. Anhand des Beispiels von dem Protein *Clara Cell Phospholipid-Binding Protein Precursor* aus dem oben behandelten pH-Pool 2 soll hier die Vorgehensweise bei der Auswertung der erzeugten Daten und der Identifizierung vorgestellt werden. Von der Fraktion 66 aus der RP-Chromatographie wurde zuerst das in Abbildung 32 dargestellte *full scan*-Spektrum aufgenommen, um die Messbarkeit der gesuchten Masse zu überprüfen. In dem eingestellten Messmodus passieren die gebildeten Ionen in ihrer Gesamtheit in einem definierten Massenbereich ohne weitere Vorselektion den TOF-Analysator und werden am Detektor nachgewiesen.

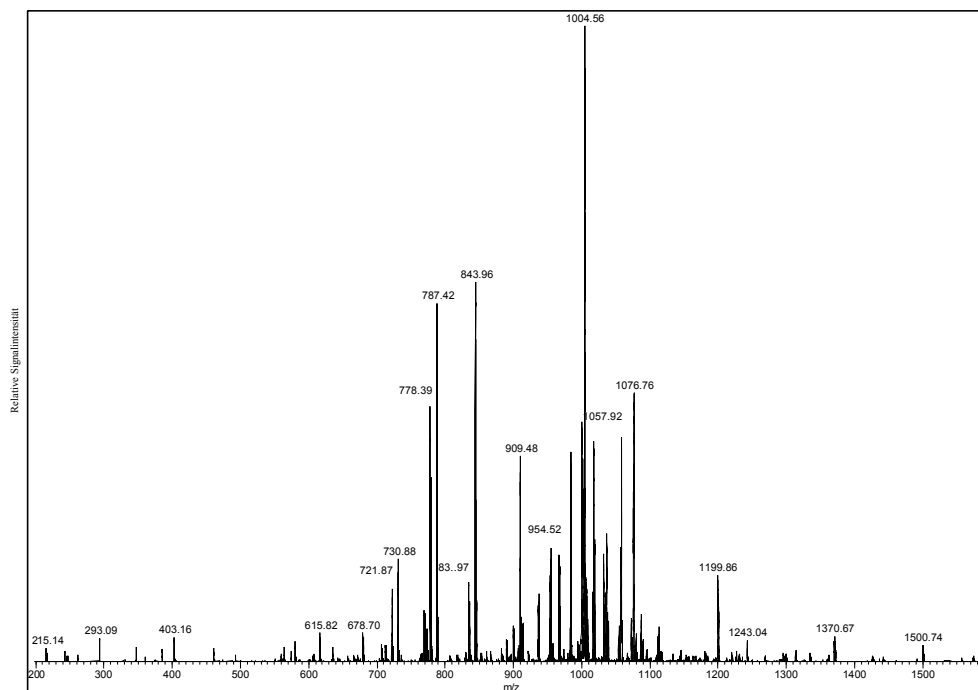


**Abbildung 32:** ESI-QTOF-Massenspektrum (Summe aus 20 Einzelscans) aus der RP-Fraktion 66. In Klammern dargestellt sind die Ladungszustände 6+ bis 11+ aus der Muttermasse 8029,0 des gesuchten Peptids und darüber die  $m/z$ -Werte der entsprechenden Peptidionen.

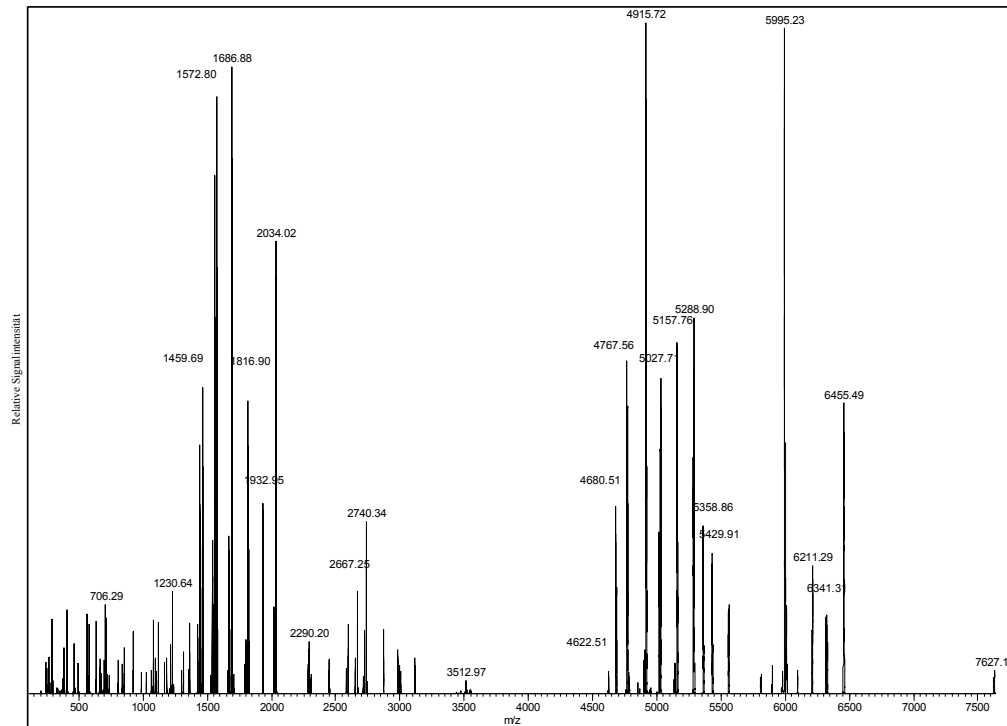
Da diese Randfraktion nur einen basisliniengetrennten Peak und somit vermutlich nur ein Peptid in relativ hoher Reinheit enthält, lassen sich im Massenspektrum überwiegend Hauptsignale von Ladungszuständen finden, die nur einer Muttermasse zuzuordnen sind. Nach der Bestimmung wurde das achtfach geladene Ion mit einem  $m/z$ -Wert von 1004,52 selektiert und das entsprechende Fragmentspektrum dazu aufgenommen. Diese Fragmentspektren sind auf-

grund der höheren fragmentierten Massen und der daraus resultierenden, zahlreicheren möglichen Ladungszustände wesentlich komplexer. Demzufolge sind sie auch schwerer interpretierbar als ein im Ionenfallen-MS erzeugtes Fragmentspektrum. Daher wird zuerst bei der Datenauswertung mit einer im Auswerteprogramm integrierten Rechenfunktion eine Dekonvolution der erzeugten Rohdaten vorgenommen. Unter Anwendung des Algorithmus nach *Bayesian* [Skilling, J. 1989] wird aus den Daten ein Spektrum mit nur einfach geladenen Ionen berechnet und rekonstruiert. Die Abbildungen 33 und 34 zeigen neben dem Fragmentspektrum aus den am ESI-QTOF-MS generierten Rohdaten das dekonvolvierte Spektrum.

Das dekonvolvierte Spektrum wurde als Textdatei inklusive der Muttermasse in das Suchprogramm *Mascot* importiert und darauf in Datenbanken gesucht. Alternativ können die entsprechenden Fragmentmassen ohne Dekonvolution auch manuell aus dem Rohdatenspektrum mit ihren entsprechenden Ladungszuständen herausgelesen werden und mit dem Programm *MS-Tag* im Suchprogramm *ProteinProspector* in verschiedenen Datenbanken gesucht werden. Auch hier ist die Möglichkeit zur Voreinstellung von bestimmten Modifikationen, so auch von S-carboxyamidomethylierten Cysteinresten, gegeben. Durch die Angabe der Massengenauigkeit der Fragment- und Mutterionen bzw. der Art des verwendeten Massenspektrometers ist eine weitere Präzisierung der vorgegebenen Daten möglich.



**Abbildung 33:** Nanospray-Fragmentspektrum aus den Rohdaten. Die Analyse des Peptids *Clara Cell Phospholipid-Binding Protein Precursor* erfolgte auf einem ESI-QTOF-MS. Der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle Fragmentmassen gelabelt und nur mit zwei Dezimalstellen nach dem Komma angegeben worden.



**Abbildung 34:** Fragmentspektrum aus dem Rekonstrukt der dekonvolvierten Spektrendaten aus der Abbildung 33. Der Übersichtlichkeit halber sind hier nicht alle Fragmentmassen gelabelt und nur mit zwei Nachkommastellen angegeben.

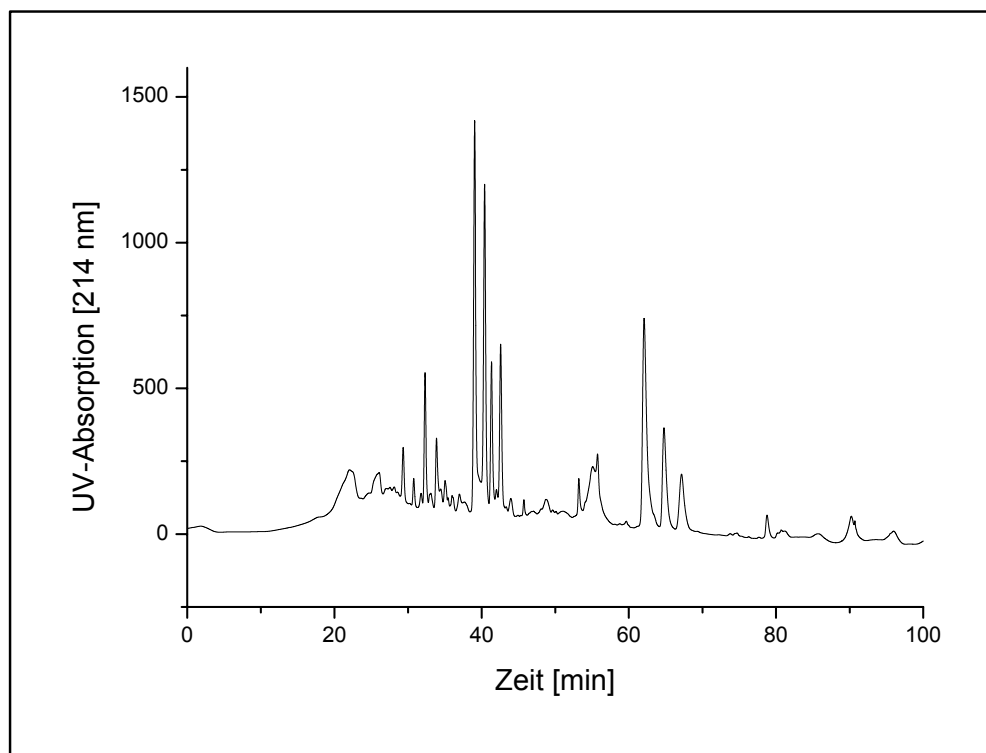
Der Datenbankabgleich in *Swiss-Prot* ergab, dass es sich bei diesem Peptid um das Monomer des *Clara Cell Phospholipid-Binding Protein Precursor (Uteroglobin, Clara Cell 10-kDa Protein)* handelt, welches *in vivo* als antiparalleles, disulfidverbrücktes Homodimer vorkommt [Pilon, A. 2000; Singh, G. und Katyal, S. 2000]. Da hier bei diesem Versuchsansatz vor der kovalenten Chromatographie die Peptidprobe reduziert wird, kommt es zur Aufspaltung der beiden Monomere. Beim gezielten Screening der Peptidbankfraktionen des pH-Pools 2 nach dem Gesamtmolekulgewicht (15.826 Da) konnte es zusätzlich als intaktes Homodimer in der Fraktion 50 charakterisiert werden.

Dieses multifunktionelle Peptid wird von den sekretorisch aktiven Clara-Zellen in den pulmonalen Luftwegen gebildet und konnte mit einer hoch konservierten Aminosäuresequenz bei vielen Säugetieren in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin nachgewiesen werden. Es konnten an diesem Peptid bisher eine Reihe von pharmakologischen Effekten *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Neben anti-inflammatorischen Eigenschaften konnte an dem Peptid ein tumor-suppressorischer Effekt nachgewiesen werden. So wird *Uteroglobin* zum Beispiel auch als neues Cytokin diskutiert [Mukherjee, A.B. *et al.* 1999].

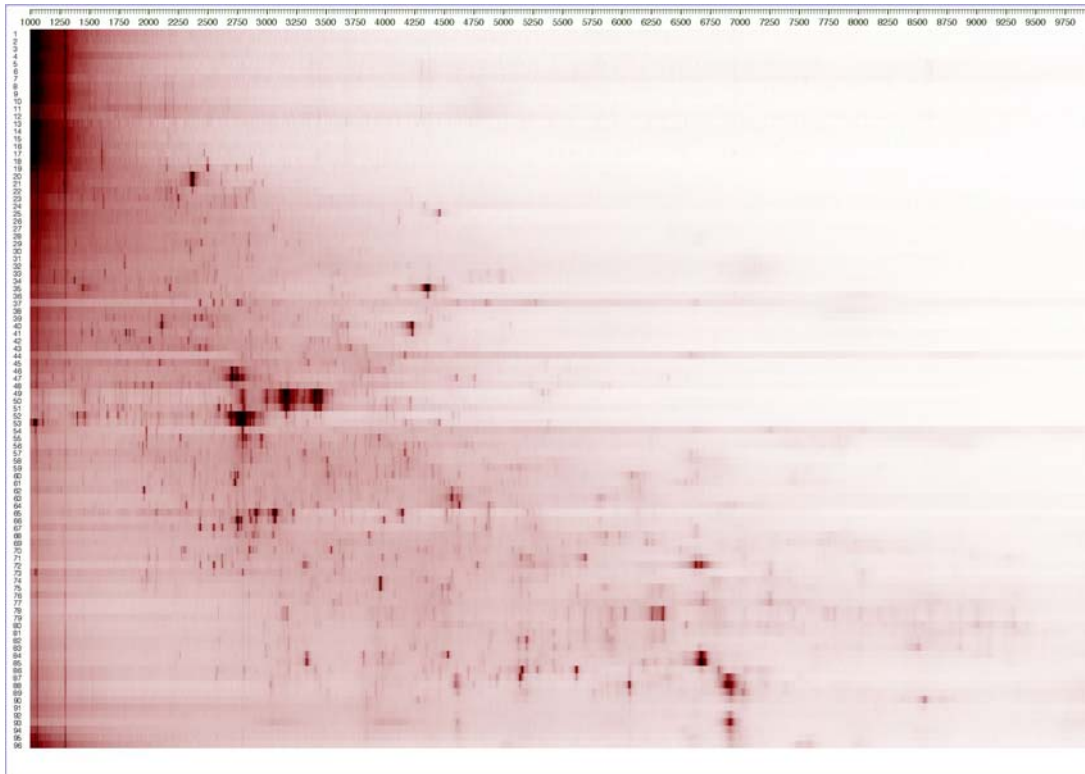
#### 4.5.5 Die Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden aus Cerebrospinalflüssigkeit mittels kovalenter Chromatographie

Neben Fraktionen aus der bisher verwendeten Peptidbank aus humanem Blutfiltrat wurden Proben aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit zur Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden bearbeitet, um die Übertragbarkeit der etablierten Methode auf andere humane Körperflüssigkeiten zu bestätigen.

Aus einem 100 mL-Äquivalent CSF erfolgte nacheinander eine Kationenaustauscher- und eine *Reversed Phase* Chromatographie im Batch-Verfahren. Das nach Gefriertrocknung erhaltene Lyophilisat wurde reduziert und der kovalenten Chromatographie mit Thiopropyl Sepharose unterzogen. Die weitere Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an das in der Abbildung 27 dargestellte Schema. Zur Auftrennung der cysteinhaltigen Peptide wurde nach S-Carboxyamidomethylierung eine RP-Chromatographie durchgeführt und das Eluat in 192 Fraktionen separiert. Das RP-Chromatogramm ist in Abbildung 35, die entsprechende Peptidkarte der linearen MALDI-TOF-Messung von den Fraktionen 1-96 in der Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 35:** RP-Chromatogramm des TPS-Eluates von CSF. Laufbedingungen: Flussrate: 0,5 mL/Minute; Säule: 4 x 150 mm Source 15RPC (Amersham Pharmacia); Laufmittel A: 0,06 % TFA, Laufmittel B: 80 % Acetonitril/0,05 %; Gradient: ab Minute 1,2 von 5-70 % B in 63,6 Minuten, von 70-100 % B in 3,8 Minuten. Fraktionierung: ab der 10. Minute in Schritten von 0,5 Minuten.



**Abbildung 36:** Peptidkarte der nach kovalenter Chromatographie im MALDI-TOF-MS (linearer Messmodus) detektierten cysteinhaltigen Peptide der RP-Fractionen 1-96 aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit.

Wie die Peptidkarte und das dazugehörige Chromatogramm zeigen, lassen sich auch hier eine Reihe von cysteinhaltigen Peptiden detektieren. Zur mengenmäßigen Bestimmung der cysteinhaltigen Peptide in CSF wurde zusätzlich mit einem Aliquot des Durchlaufs und des Eluats der kovalenten Chromatographie eine Protein-Bestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass etwa 10 % der im CSF vorkommenden Peptid- bzw. Proteinmenge cysteinhaltig ist.

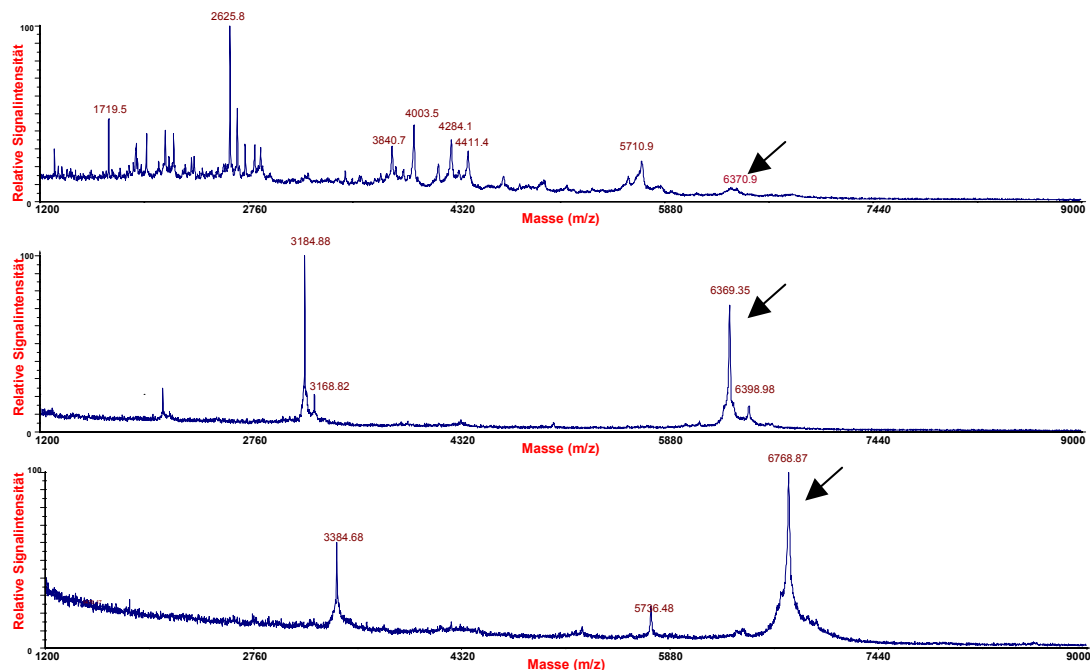
#### 4.6 Ausgewählte Beispiele von cysteinhaltigen Peptiden aus humanem Blutfiltrat

Es konnten im Verlauf der Arbeit eine Reihe von interessanten Peptiden mit biologischer und medizinischer Relevanz isoliert und charakterisiert werden. An dieser Stelle sollen für sie beispielhaft zwei der Peptide vorgestellt werden, die sich besonders durch einen hohen Anteil an Cysteinresten oder ihre biologische Funktion auszeichnen.



#### 4.6.1 Cystein-rich Protein 1 (CRIP)

Ein N-terminales Fragment des Peptids *Cystein-rich Protein 1* (CRIP, *Cystein-rich intestinal Protein*) wurde durch die Anwendung der kovalenten Chromatographie aus der Peptidbankfraktion 25 aus pH-Pool 5 aus humanem Blutfiltrat isoliert. Auf Peptidbankebene konnte es nicht im MALDI-TOF-Massenspektrum detektiert werden, sondern war erst nach selektiver Abtrennung der cysteinhaltigen Peptide durch Thiopropyl Sepharose messbar. Nach zwei Aufreinigungsschritten durch RP-Chromatographie konnte das Peptid mit einem mittleren Molekülgewicht von 6369,35 für  $M+H^+$  per Edman-Analyse sequenziert werden. Das isolierte Fragment umfasst 56 der insgesamt 69 Aminosäurereste des Peptids. Die durchgeführte S-Carboxyamidomethylierung ergab durch einen detektierten Massenshift von 399,52 einen Anteil von 7 Cysteinresten in dem Peptid, der durch die Sequenzanalyse und anschließende Datenbankrecherche bestätigt werden konnte.



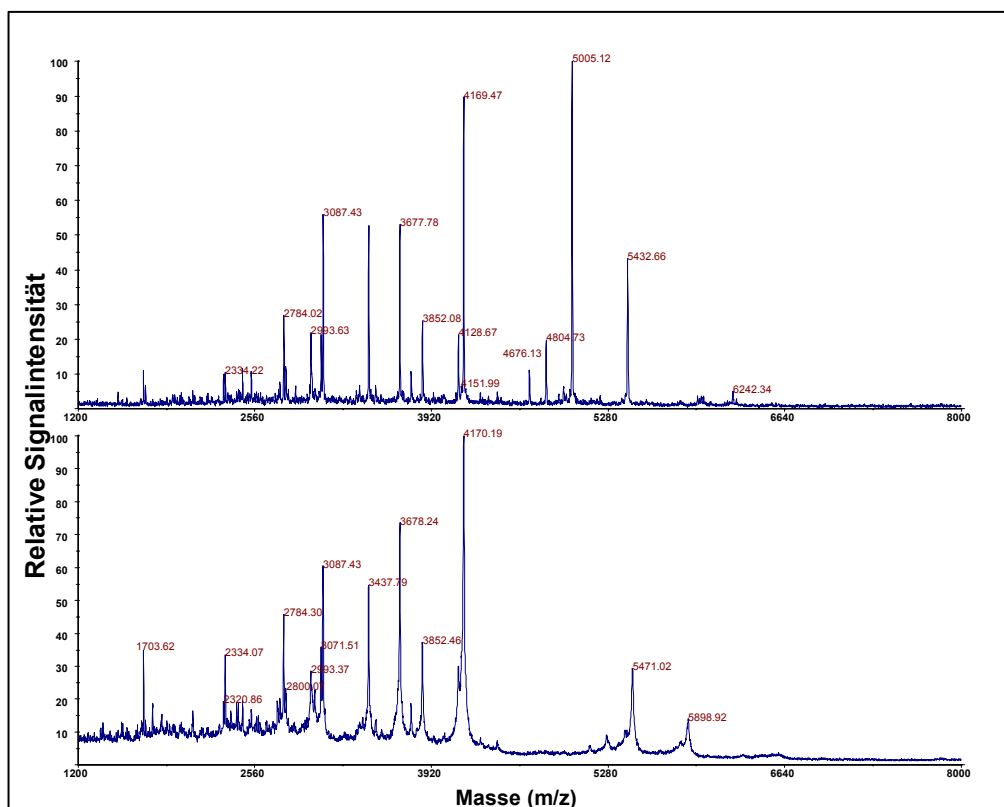
**Abbildung 37:** MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen mit *Cystein-rich Protein 1* aus der RP-Chromatographie. Die Fraktion 25 (oben) der ersten RP-Chromatographie des Eluates aus kovalenter Chromatographie enthielt die entsprechende Masse von 6369,35 für  $M+H^+$ . Diese Fraktion wurde zur weiteren Aufreinigung einer zweiten RP-Chromatographie unterzogen und enthielt in Fraktion 42 (Mitte) das Peptid in sequenzierbarer Reinheit, von welchem ein weiteres Aliquot S-carboxyamidomethyliert (unten) wurde. Die Pfeile markieren das einfach geladene, isolierte Peptid.

Über die Art der Verbrückung gibt es bisher keine Informationen. Da bei der durchgeführten kovalenten Chromatographie die Peptide reduziert im Eluat vorliegen und *Cystein-rich Protein 1* auf Ebene der Peptidbank nicht detektiert werden konnte, lässt diese Art der Analyse keinen Rückschluss auf die Anzahl der verbrückten Cysteinreste zu.

Die Expression dieses Peptids konnte unter anderem in intestinale Gewebe, mononukleären Blutzellen und peritonealen Makrophagen nachgewiesen werden [Birkenmeier, E.H. und Gordon, J.I. 1986; Hempe, J.M. und Cousins, R.J. 1991]. Es enthält ein cysteinreiches Zinkfinger-Motiv, die sogenannte LIM-Domäne [Freyd, G. *et al.* 1990], welche unter anderem für intrazelluläre Transporte von Zinkionen zuständig ist.

#### 4.6.2 Somatomedin B

Aus der Fraktion 27 des pH-Pools 1 konnte das biologisch aktive Peptid *Somatomedin B* nach S-Carboxyamidomethylierung und vergleichender, massenspektrometrischer Analyse isoliert werden. In der unbehandelten Probe konnte das Peptid mit einer Masse von 5005,12 als  $M+H^+$  detektiert werden, welches wie in der Abbildung 38 nach Modifizierung um 465,9 Masseneinheiten shiftet.



**Abbildung 38:** MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktion 1-27 aus humanem Blutfiltrat vor (oben) und nach (unten) S-Carboxyamidomethylierung. Das obere Spektrum zeigt das in dieser Probe enthaltene Somatomedin B mit einem  $m/z$ -Wert von 5005,12. Nach Modifizierung shiftet der Peak um 465,9 entsprechend der acht Cysteinreste nach 5471,02 für  $m/z$ . Des weiteren konnte ein um vier Aminosäuren verlängertes Peptid aus dem Vorläufer Vitronectin charakterisiert werden, der um 466,3 Masseneinheiten von 5432,66 nach 5898,92 für  $m/z$  shiftet und damit die gleiche Anzahl an Cysteinresten besitzt.

Somatomedin B geht als N-terminales Fragment (Position 20-63) mit einer Länge von 44 Aminosäureresten aus dem Vorläuferprotein Vitronectin hervor. Mit acht Cysteinresten besitzt dieses Peptid einen recht hohen Cysteingehalt von 18,2 %. Somatomedin B gilt als ein wachstumshormon-abhängiger Faktor mit protease-inhibierender Wirkung, der im Plasma zirkuliert [Fryklund, L. und Sievertsson, H. 1978].

In der oben beschriebenen Fraktion konnte ein weiteres Fragment (5432,66 für  $M+H^+$ ) mit ebenfalls acht Cysteinresten (detektierte Masse nach S-Carboxyamidomethylierung: 5898,92 für  $M+H^+$ ) aus dem Vorläufer Vitronectin isoliert werden, das über die Sequenz des biologisch aktiven Somatomedin B hinausgeht (Position 20-67). Es könnte somit ein Abbauprodukt aus Vitronectin darstellen. Dieses extrazellulär vorkommende Protein hat verschiedene Wirkungen, etwa im Bereich der Zelladhäsion und es interagiert ausserdem mit verschiedenen Proteoglycanen. Es bindet an Heparin und besitzt weiterhin eine sogenannte Hemopexin-Dömane, welche unter anderem für die Bindung von Streptokokken an ihre Wirtszelle verantwortlich gemacht wird. Es könnte somit eine wichtige Rolle bei bakteriellen Infektionsprozessen spielen.

#### **4.7 Die Verteilung von Cysteinen in Proteinen und Peptiden in humanem Blutfiltrat**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Etablierung von Methoden zur spezifischen Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden eine Differenzierung zwischen Peptiden und Proteinen zu erreichen bzw. native, biologisch aktive Peptide bevorzugt anzureichern und zu identifizieren. Um zu klären, ob dieses Ziel erreicht werden konnte, müssen an dieser Stelle einige Gesichtspunkte genauer betrachtet werden:

Ein wesentliches Problem bei dieser Klärung stellt die Unterscheidung zwischen Proteinen und Peptiden dar. Zieht man die in der Literatur häufig definierte Grenze von 10 kDa bzw. 100 Aminosäuren, werden damit möglicherweise einige, ihrer Funktion nach eher zu den Peptiden zählenden Stoffen, falsch zugeordnet. Gerade in dem Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 20 kDa sind in den letzten beiden Dekaden eine Reihe von Stoffen, die ihrer Funktion nach eher einem Peptid entsprechen, identifiziert worden. Beispielsweise konnten im Umfeld der immunologischen Forschung eine Vielzahl von Stoffen mit extrazellulärer Signalwirkung charakterisiert werden. Als Beispiel seien hier die zu den Cytokinen gehörenden Interferone und Interleukine genannt, die zum Teil diesen Molekulargewichtsbereich abdecken. Eine Abgrenzung rein aus formellen bzw. strukturellen Gesichtspunkten wäre daher nicht mehr zeitgemäß. Ein weiteres Problem bei der Bestimmung der Grenze zwischen

Peptiden und Proteinen ist die Berücksichtigung der Signalpeptide und die Frage, inwieweit sie zum Gesamtmolekulargewicht eines Peptides hinzugezogen werden. Da in der vorliegenden Arbeit nur Peptide und Proteine aus extrazellulären Körperflüssigkeiten charakterisiert wurden, besitzen diese zwangsläufig kein Signalpeptid, weil dieser Sequenzabschnitt vor dem Ausschleusen aus der Zelle enzymatisch abgespalten wird. Zur Darstellung des vorliegenden Problems soll an dieser Stelle der *Platelet Basic Protein Precursor* betrachtet werden, aus welchem die Teilsequenz 44-128 über Edman-Sequenzierung nach chromatographischer Aufreinigung identifiziert wurde. Dieses Molekül mit einer Gesamtlänge von 128 Aminosäuren und zwei Disulfidbrücken besitzt einschließlich der aus 34 Aminosäuren bestehenden Signalsequenz ein spezifisches Molekulargewicht von 13.894 Da und liegt damit im Bereich der kleinen Proteine. Das nach Abspaltung des Signalpeptids im Blut zirkulierende Peptid besitzt ein Molekulargewicht von 9288 Da und wäre daher den Peptiden zuzuordnen. Ein zusätzliches Problem für die Einteilung bzw. Zuordnung ergibt sich speziell bei diesem Peptid wie auch bei vielen anderen daraus, dass aus der Prohormonform mehrere Peptide mit unterschiedlicher biologischer Aktivität und Funktion hervorgehen, die für dieses Beispiel im folgenden dargestellt sind:

AS-Sequenz 44-128:	Connective-Tissue Activating Peptide III (CTAP-III)
AS-Sequenz 48-128:	Beta-Thromboglobulin (bildet Homotetramer)
AS-Sequenz 39-128:	Neutrophil-Activating Peptide (NAP-2)

Bei nicht vollständigen Sequenzen lässt sich daher schwer nachvollziehen, auf welches Peptid die entsprechende Teilsequenz zurückzuführen ist. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten eine Reihe von Molekülen charakterisiert werden, deren Precursor zwischen einem Molekulargewicht von 10 und 20 kDa liegen, die aber aus den oben genannten Gründen, folgend ihrer regulatorischen Funktion, eher zu den Peptiden zählen sollten. Aus diesem Grund wurde eine Einteilung zur Bewertung der etablierten Methoden vorgenommen, bei welcher die Grenze zwischen Peptiden und Proteinen erst bei einem Molekulargewicht von 20 kDa gezogen wurde. Mit den beschriebenen Methoden gelang es, Peptid- und Proteinfragmente sowie biologisch aktive Peptide aus 47 verschiedenen Vorläufern zu charakterisieren. Die Verteilung nach der oben definierten Einordnung ergibt sich wie folgt in der Tabelle 8 dargestellt.

	Anzahl der isolierten Peptide	Anzahl der Vorläufer
Peptide (1-20 kDa)	93	22
Proteinfragmente (> 20 kDa)	113	25

**Tabelle 8:** Verteilung der insgesamt 206, aus humanem Blutfiltrat charakterisierten Peptide und Proteinfragmente und die Anzahl ihrer Vorläufer.

Betrachtet man die aus Serumalbumin detektierten Fragmente, so nehmen diese einen Gesamtanteil von rund 22 % der gesamten Peptide ein, die hier bestimmt werden konnten. Da im Blut die Gesamtkonzentration von Albumin mit ungefähr 70 mg/L sehr hoch ist, werden demzufolge auch bevorzugt seine Abbauprodukte isoliert, die ebenfalls in recht hohen Konzentrationen im Blut zirkulieren. Ähnlich verhält es sich mit dem hohen Anteil von Fragmenten aus anderen Proteinen, die in großen Konzentrationen im Blut vorkommen. Trotzdem ist der Gesamtanteil der isolierten Peptide mit 45,1 % recht hoch. Vor allem durch die Anwendung der kovalenten Chromatographie konnte hier eine Anreicherung echter Peptide erzielt werden.

Auch die qualitative Bewertung der großen Anzahl von isolierten Proteinfragmenten erweist sich als nicht ganz einfach, wie das oben genannte Beispiel von Albumin gezeigt hat. Eine medizinische bzw. biologische Relevanz ist bei diesen Fragmenten nicht zwangsläufig auszuschließen, da auch das Vorhandensein von bestimmten, proteolytisch entstandenen Peptiden auf ein pathologisches Geschehen hinweisen kann. Des Weiteren können auch einzelne Austausche von Aminosäuren, die in verschiedenen Proteinen zum Teil sehr zahlreich auftreten können, eine klinische Bedeutung besitzen.

Darüber hinaus ist die tatsächliche Anzahl der menschlichen Peptide und Proteine nicht geklärt, da viele dieser Stoffe noch unbekannt sind. Die Ableitung vom Humangenom, welches etwa 50.000-60.000 Gene beinhalten soll und vollständig sequenziert vorliegt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur sehr bedingt möglich [Camargo, A.A. *et al.* 2001]. Denn gerade bei kleinen Proteinen/Peptiden versagen momentan noch die zur Verfügung stehenden Suchalgorithmen, welche die Lage, Sequenz und Größe eines Proteins oder Peptids auf der Grundlage von spezifischen Sequenzmotiven in einem Genom berechnen und vorhersagen sollen. Aus den genannten Gründen ist auch die Voraussage des tatsächlich vorliegenden Anteils cysteinhaltiger Peptide bzw. der relativen Häufigkeit von Cysteinresten in humanen Eiweißstoffen nur schwer möglich.

## 5. Ausblick

Die Entwicklung von Verfahren zur selektiven Detektion und Isolierung von cysteinhaltigen Peptiden hat gezeigt, dass eine Reihe von biologisch aktiven Substanzen charakterisiert werden konnten, die aufgrund der Komplexität der Proben mit herkömmlichen Standardmethoden nur schwer oder gar nicht erfassbar waren.

Ein besonderes Augenmerk wird in naher Zukunft auf die weitere Automatisierung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden gelegt, um eine Steigerung des Probendurchsatzes zu erzielen. Bei der Vielzahl der im menschlichem Organismus in sehr unterschiedlichen Konzentrationen zirkulierenden Peptiden ist die Entwicklung solcher Strategien unumgänglich. Besonders auf Seite der massenspektrometrischen Identifizierung und der sich daran anschließenden Datenauswertungen und Recherchen besteht noch ein enormer Handlungsbedarf. Denkbar wäre hier zum Beispiel der Einsatz von direkter Kopplung flüssigkeitschromatographischer Trennungen und massenspektrometrischer Fragmentierungsmethoden, durch die eine weitere Reduktion der Komplexität der zu bearbeitenden Peptidproben erreicht werden könnte. Eine höhere Effizienz bei der Anzahl der tatsächlich identifizierten Stoffe wäre dabei zu erwarten, weil eine höhere Zahl der vorhandenen Peptide durch die weitere Auftrennung auch detektiert werden könnte. Zudem wäre ein höherer Probendurchsatz durch die Automatisierbarkeit der Methode die Folge. An der Lösung dieses Problems wird gegenwärtig gearbeitet. Weitere technische Verbesserungen der Gesamtprozesse gehen in ähnliche Richtung und beschäftigen sich vor allem mit der Verminderung des einzusetzenden Probenvolumens, der automatischen Erzeugung von MS/MS-Spektren im ESI-QTOF-MS im Batch-Verfahren und der Automatisierung der Verarbeitung erzeugter Rohdaten bis hin zur Identifizierung der Peptide. Des weiteren ist zu erwarten, dass durch die zunehmende Empfindlichkeit der auf dem Markt verfügbaren Analysegeräte, in geringen Konzentrationen vorkommende Peptide mit biologischer und medizinischer Bedeutung identifiziert werden können.

Die allgemeine Entwicklung im gesamten Umfeld der Proteom-Forschung gerade in Bezug auf den Einsatz von Robotersystemen zur Probenvorbereitung und –messung lässt eine große Steigerung des Probendurchsatzes erwarten und kann selbstverständlich auch im Bereich der Peptidforschung eingesetzt werden.

Als sehr zeit- und arbeitsaufwendig erwiesen sich im Zuge der vorliegenden Arbeit die Analysen von isolierten Peptiden, deren vollständige Aminosäuresequenz nicht bekannt war. Die

Charakterisierung solcher Peptide in Bezug auf ihre vollständige Struktur und biologische Funktion muss intensiv bearbeitet werden.

In Zukunft stehen neben der Automatisierung der bestehenden Methoden auch die verstärkte Bearbeitung von weiteren biologischen Probenquellen im Fokus. In Hinblick auf den medizinischen Hintergrund bieten sich zu diesem Zwecke humane Proben mit gesichertem pathologischem Befund an. Zum Beispiel wird die Präparation und Untersuchung von Gelenkflüssigkeit arthritischer Patienten oder Gehirnflüssigkeit von Personen mit neurodegenerativen Erkrankungen verstärkt in Angriff genommen. Auch die Untersuchung von intrazellulären Extrakten oder Zellkompartimenten ist angedacht, um das Geschehen innerhalb der Zelle mit ein zu beziehen und einen umfassenden Überblick über die Gesamtheit aller Peptide im Körper zu erlangen. Weiterhin vorstellbar wäre die Übertragung der etablierten Verfahren auf Tiermodelle. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Untersuchung von *knock out*-Mäusen oder anderen Tieren mit künstlich ausgeschalteten Genen oder Gengruppen, um ein besseres Verständnis der biologischen Abläufe bei krankheitsrelevanten Prozessen auf Ebene der Peptide und Proteine zu erreichen.

Allgemein auffällig bei den in Datenbanken annotierten Peptiden und Proteinen ist die geringe Präsenz von posttranslational modifizierten Substanzen. Eine Möglichkeit für die Detektion und Charakterisierung derart modifizierter Eiweißstoffe konnte hier am Beispiel disulfidverbrückter Peptide gezeigt werden. In der Literatur werden eine ganze Reihe von Möglichkeiten beschrieben, die sich mit der Identifizierung weiterer Modifizierungen beschäftigen. Einige lassen sich sicherlich weiterentwickeln und abwandeln und dadurch auf die speziellen Eigenschaften komplexer, biologischer Peptidgemische anpassen und automatisieren. In diesem Zusammenhang wurde die Etablierung von Methoden zur spezifischen Detektion von N-terminal modifizierten Peptiden, die beispielsweise einen Pyroglutamylrest besitzen, bereits begonnen und zeigt erste vielversprechende Ergebnisse.

## 6. Verwendete Abkürzungen

2D	zweidimensional
AS	Aminosäure
cDNA	copy (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis
Da	Dalton
DABIA	N-(4-Dimethylaminoazobenzol-4-)iodacetamid
DE	Delayed extraction
DTT	Dithiothreitol
D0	Ungelabeltes ICAT-Reagenz
D8	Deuteriertes ICAT-Reagenz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Electrospray-Ionisation Massenspektrometrie/Massenspektrometer
ESI-QIT-MS	Elektrospray-Ionisation Quadrupol Ionenfallen-Massenspektrometrie/ Massenspektrometer
ESI-QTOF-MS	Elektrospray-Ionisation Quadrupol Flugzeit-Massenspektrometrie /Massenspektrometer
EST	Expressed Sequence Tags
et al.	et aliter
eV	Elektronenvolt
Fr.	Fraktion
FWHM	Full Width at Half Maximum (Halbwertsbreite)
HF	Hämofiltrat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICAT	<i>Isotope-coded Affinity Tags</i>
kDa	kiloDalton
M	mol/L
m/z	Masse zu Ladung
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry
mAU	Milli-Absorbance Units
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mS	MilliSiemens
MW	Molecular weight (Molekulargewicht)



---

nmolar	nmol/L
ppm	parts per million
PSD	Post Source Decay
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	time-of-flight (Flugzeit)
TPS	Thiopropyl Sepharose
$\alpha$ CHC	<i>alpha</i> -Cyano-4-hydroxymizsäure

## 7. Liste der eigenen Publikationen

### Journal-Veröffentlichungen:

Krause, A.; **Neitz, S.**; Mägert, H.-J.; Schulz, Axel, A.; Forssmann, W.-G.; Schulz-Knappe, P.; Adermann, K.; LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity; *Febs Letters* 480, **2000**, 147-157.

**Neitz, S.**; Jürgens, M.; Kellmann, M.; Schulz-Knappe, P.; Schrader, M.; Screening for disulfide-rich peptides in biological sources by carboxyamidomethylation in combination with differential matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15, **2001**, 1586-1592.

### Poster-Beiträge zu Konferenzen:

Fourth Symposium of „Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis **1995**“, Edinburgh, Schottland:

Adermann, K., **Neitz, S.**, Marx, Ute C., Rösch, P., Forssmann, W.-G.; *Synthesis of human guanylin: temperature-dependent HPLC, CZE and NMR studies verify stereoisomerism of a disulfide-containing peptide.*

13. Konferenz der „IAPSAP“ (International Association For Protein Structure Analysis and Proteomics: „Methods of Protein Structure Analysis“ **2000**); Charlottesville, Virginia, USA:

**Neitz, S.**; Jürgens, M.; Kellmann, M.; Schulz-Knappe, P.; Schrader, M.; *Screening for disulfide-rich peptides in biological sources by carboxyamidomethylation in combination with MALDI-TOF mass spectrometry.*

Jahreskonferenz der „Association of Biomolecular Resource Facilities“, ABRF **2001** - The New Biology: „Technologies for Resolving Macromolecular Communications“; San Diego, California, USA:

Kellmann, M.; **Neitz, S.**; Jürgens, M.; *Routine Identification of Large (> 5 kDa) Peptides Derived from Biological Sources using an ESI-Quadrupole-TOF Mass Spectrometer*

### Vorträge:

Workshop Bioanalytik für junge Wissenschaftler der GBM-Studiengruppe Bioanalytik **2001**, Rauschholzhausen, Deutschland:

*Analyse von disulfidreichen Peptiden aus biologischen Quellen.*

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Agerberth, B., Soderling-Barros, J., Jornvall, H., Chen, Z.W., Ostenson, C.G., Efendic, S. und Mutt, V. (1989). "Isolation and characterization of a 60-residue intestinal peptide structurally related to the pancreatic secretory type of trypsin inhibitor: influence on insulin secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(21): 8590-4.
- Aitken, A. (1994). "Analysis of cysteine residues and disulfide bonds." Methods Mol Biol **32**: 351-60.
- Akiyama, T., Sasagawa, T., Suzuki, M. und Titani, K. (1994). "A Method for Selective Isolation of the Amino-Terminal Peptide from  $\alpha$ -Amino-Blocked Proteins." Analytical Biochemistry **222**: 210-216.
- Aldred, A.R., Brack, C.M. und Schreiber, G. (1995). "The cerebral expression of plasma protein genes in different species." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **111**(1): 1-15.
- Annan, R.S. und Carr, S.A. (1997). "The essential role of mass spectrometry in characterizing protein structure: mapping posttranslational modifications." J Protein Chem **16**(5): 391-402.
- Apweiler, R. (2000). "Protein sequence databases." Adv Protein Chem **54**: 31-71.
- Badet, J. (1999). "Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties." Pathol Biol (Paris) **47**(4): 345-51.
- Baggiolini, M., Dewald, B. und Moser, B. (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." Adv Immunol **55**: 97-179.
- Bairoch, A. und Apweiler, R. (2000). "The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000." Nucleic Acids Res **28**(1): 45-48.
- Banks, R.E., Dunn, M.J., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Blackstock, W., Pappin, D.J. und Selby, P.J. (2000). "Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities." Lancet **356**(9243): 1749-56.
- Beavis, R.C. und Chait, B.T. (1996). "Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins." Methods Enzymol **270**: 519-51.
- Bensch, K.W., Raida, M., Mägert, H.-J., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W.-G. (1995). "hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma." FEBS Letters **368**(2): 331-335.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. und Wheeler, D.L. (2000). "GenBank." Nucleic Acids Res **28**(1): 15-18.
- Biemann, K. (1988). "Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure." Biomed Environ Mass Spectrom **16**(1-12): 99-111.
- Birkenmeier, E.H. und Gordon, J.I. (1986). "Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain

locus." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2516-2520.

Blackburn, R.K. und Anderegg, R. (1997). "Characterization of femtomol levels of protein in solution using rapid proteolysis and nanospray ionisation." J Am. Soc. Mass Spec **8**(483-494).

Bleasby, A.J. und Wootton, J.C. (1990). "Construction of validated, non-redundant composite protein sequence databases." Protein Eng **3**(3): 153-159.

Boguski, M.S., Lowe, T.M. und Tolstoshev, C.M. (1993). "dbEST--database for "expressed sequence tags"." Nat Genet **4**(4): 332-333.

Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brandt, J., A. S. und Carlsson, J. (1977). "Covalent coupling of unsaturated compounds to thiol agarose using  $\gamma$ -radiation. A new method for preparation of adsorbents for affinity chromatography" J Solid-Phase Biochem **2**: 105-109.

Burlingame, A.L. (1996). "Characterization of protein glycosylation by mass spectrometry." Curr Opin Biotechnol **7**(1): 4-10.

Burmeister Getz, E., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. und Selvin, P.R. (1999). "A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris-(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry." Anal Biochem **273**: 73-80.

Burns, J.A., Butler, J.C., Moran, J. und Whitesides, G.M. (1991). "Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine." Journal of Organic Chemistry **56**: 2648-2650.

Camargo, A.A., Samaia, H.P. et al. (2001). "The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12103-8.

Cardamone, M., Asham, K., Bandom, M.R. und Puri, N.K. (1993). "Identification of Cysteine-Containing Peptides During the Peptide Mapping of Recombinant Proteins." Peptide Research **6**(5): 242-248.

Carr, S.A., Hemling, M.E., Bean, M.F. und Roberts, G.D. (1991). "Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology." Anal Chem **63**(24): 2802-2824.

Carr, S.A., Huddleston, M.J. und Annan, R.S. (1996). "Selective detection and sequencing of phosphopeptides at the femtomole level by mass spectrometry." Anal Biochem **239**(2): 180-192.

Chambers, G., Lawrie, L., Cash, P. und Murray, G.I. (2000). "Proteomics: a new approach to the study of disease." J Pathol **192**(3): 280-288.

Chang, J.Y., Knecht, R. und Braun, D.G. (1983). "A new method for the selective isolation of cysteine-containing peptides. Specific labelling of the thiol group with a hydrophobic chromophore." Biochem J **211**(1): 163-171.

Chaurand, P., Luetzenkirchen, F. und Spengler, B. (1998). "Peptide and Protein Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-Post-Source Decay

Time-of-Flight Mass Spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom **10**: 91-103.

Clauser, K.R., Baker, P. und Burlingame, A.L. (1999). "Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching." Anal Chem **71**(14): 2871-2882.

Cohen, S.L. und Chait, B.T. (1996). "Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins." Anal Chem **68**(1): 31-37.

Covey, T.R., Bonner, R.F., Shushan, B.I. und Henion, J. (1988). "The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **2**(11): 249-256.

Cunningham, B., Wang, J., Berggard, I. und Peterson, P. (1973). "The complete amino acid sequence of beta 2-microglobulin." Biochem **12**: 4811-4822.

Davidsson, P., Paulson, L., Hesse, C., Blennow, K. und Nilsson, C. (2001). "Proteome studies of human cerebrospinal fluid and brain tissue using a preparative two-dimensional electrophoresis approach prior to mass spectrometry." Proteomics **1**: 444-452.

Dole, M., Mack, L., Hines, R., Mobley, R., Ferguson, L. und Alice, M. (1969). "Molecular Beams of Macroions." J Chem Phys **64**: 2240-2249.

Eckerskorn, C. (1998). Massenspektrometrie. Bioanalytik. F. Lottspeich and H. Zorbas. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag. **1**: 323-368.

Edman, P. (1956). "On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides." Acta Chem Scand. **10**: 761-768.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. und Whitehouse, C.M. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." Science **246**(4926): 64-71.

Fenyo, D., Qin, J. und Chait, B.T. (1998). "Protein identification using mass spectrometric information." Electrophoresis **19**(6): 998-1005.

Freyd, G., Kim, S.K. und Horvitz, H.R. (1990). "Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*." Nature **344**(6269): 876-879.

Friedman, M., Krull, L.H. und Cavins, J.F. (1970). "The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as s-beta-(4-pyridylethyl)cysteine." J Biol Chem **245**(15): 3868-3871.

Fryklund, L. und Sievertsson, H. (1978). "Primary structure of somatomedin B: a growth hormone-dependent serum factor with protease inhibiting activity." FEBS Lett **87**(1): 55-60.

Fullmer, C.S. (1984). "Identification of Cysteine-Containing Peptides in Protein Digests by High-Performance Liquid Chromatography." Analytical Biochemistry **142**: 336-339.

Gaskell, S. und Reilly, M. (1988). "Hybrid tandem mass spectrometry of peptides above mass 1000." Rapid Commun Mass Spectrom **2**(9): 188-191.

Goodlett, D.R., Bruce, J.E., Anderson, G.A., Rist, B., Pasa-Tolic, L., Fiehn, O., Smith, R.D. und Aebersold, R. (2000). "Protein identification with a single accurate mass of a cysteine-containing peptide and constrained database searching." Anal Chem **72**(6): 1112-1118.

Goodlett, D. (2001). "Sample preparation for non-gel based proteomics and protein identification." ABRF 2001 - The New biology: Technologies for Resolving Macromolecular Communications, San Diego, CA, USA.

Gray, W.R. (1993). "Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis." Protein Sci **2**(10): 1732-1748.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. und Aebersold, R. (1999). "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." Nat Biotechnol **17**(10): 994-999.

Hall, A. (1999). "The role of glutathione in the regulation of apoptosis." European Journal of Clinical Investigation **29**: 238-245.

Hayes, R.N. und Gross, M.L. (1990). "Collision-induced dissociation." Methods Enzymol **193**(2): 237-263.

Hempe, J.M. und Cousins, R.J. (1991). "Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9671-9674.

Henderson, L.W., Quellhorst, E.A., Baldamus, C.A. und Lysaght, M.J. (1986). Hemofiltration. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer-Verlag.

Henschen, A. (1986). Analysis of Cyst(e)ine Residues, Disulfide Bridges, and Sulfhydryl Groups in Proteins. Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis. B. Wittmann-Liebold. Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag: 244-255.

Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C. und Chait, B.T. (1991). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers." Anal Chem **63**(24): 1193A-1203A.

Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R. und Fritsch, E.F. (1985). "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin." Nature **313**(6005): 806-810.

Jakubke, H.-D. (1996). Peptide. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.

James, P. (1997). "Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics." Q Rev Biophys **30**(4): 279-331.

Jones, M.D., Patterson, S.D. und Lu, H.S. (1998). "Determination of disulfide bonds in highly bridged disulfide-linked peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with postsource decay." Anal Chem **70**(1): 136-143.

Jungblut, P.R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleissner, K.P., Otto, A., Muller, E.C., Sokolowska-Kohler, W., Grabher, G. und Stoffler, G. (1999). "Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases." Electrophoresis **20**(10): 2100-2110.

Jürgens, M., Schrader, M., Raida, M., Forssmann, W.-G. und Schulz-Knappe, P. (1998). "Multi-Dimensional Mapping Of Human Blood Peptides By Mass Spectrometry." Journal of Biological Techniques **9**(4): 24-29.

Jürgens, M. (1999). Multi-Dimensionale Kartierung von Peptiden aus humanem Blutfiltrat mittels massenspektrometrischer Methoden (Doktorarbeit). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Münster, Westfälische Wilhelms-Universität.

Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-301.

Kasuya, H. und Shimizu, T. (1989). "Activated complement components C3a und C4a in cerebrospinal fluid and plasma following subarachnoid hemorrhage." J Neurosurg **71**: 741-746.

Kaufmann, R., Chaurand, P., Kirsch, D. und Spengler, B. (1996). "Post-source decay and delayed extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization-reflectron time-of-flight mass spectrometry. Are there trade-offs?" Rapid Commun Mass Spectrom **10**(10): 1199-208.

Koolman, J. und Röhm, K. (1994). Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.

Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P. und Adermann, K. (2000). "LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity." FEBS Lett **480**(2-3): 147-150.

Krishna, R.G. und Wold, F. (1993). "Post-translational modification of proteins." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **67**: 265-298.

Kuster, B. und Mann, M. (1998). "Identifying proteins and post-translational modifications by mass spectrometry." Curr Opin Struct Biol **8**(3): 393-400.

Lehmann, W.D. (1996). Massenspektrometrie in der Biochemie. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.

Lehrer, R.I. und Ganz, T. (1996). "Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides." Ann N Y Acad Sci **797**: 228-39.

Levin, E.R. (1995). "Endothelins." N Engl J Med **333**(6): 356-363.

Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1997). Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag.

Mc Luckey, S. (1992). "Principles of collision activation in analytical mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom **3**: 599-614.

Metsis, M., Cintra, A., Solfrini, V., Ernfors, P., Bortolotti, F., Morrasutti, D.G., Ostenson, C.G., Efendic, S., Agerberth, B., Mutt, V. und et al. (1992). "Molecular cloning of PEC-60 and expression of its mRNA and peptide in the gastrointestinal tract and immune system." J Biol Chem **267**(28): 19829-19832.

- Ming, D., Markley, J.L. und Hellekant, G. (1995). "Quantification of cysteinyl sulfhydryl residues in peptides and proteins by ESI-MS or MALDI-MS." Biotechniques **18**(5): 808-810.
- Monks, T., Ghersi-Egea, J.-F., Philbert, M., Cooper, A. und Lock, E. (1999). "Symposium Overview: The Role of Glutathione in Neuroprotection and Neurotoxicity." Toxicological Sciences **51**: 161-177.
- Moritz, R.L., Eddes, J.S., Reid, G.E. und Simpson, R.J. (1996). "S-Pyridylethylation of intact polyacrylamide gels and in situ digestion of electrophoretically separated proteins: A rapid mass spectrometric method for identifying cysteine-containing peptides." Electrophoresis **17**: 907-917.
- Mukherjee, A.B., Kundu, G.C., Mantile-Selvaggi, G., Yuan, C.J., Mandal, A.K., Chattopadhyay, S., Zheng, F., Pattabiraman, N. und Zhang, Z. (1999). "Uteroglobin: a novel cytokine?" Cell Mol Life Sci **55**(5): 771-787.
- Murray, K.K. (1999). "Internet Resources for Mass Spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **34**: 1-9.
- Nagano, N., Ota, M. und Nishikawa, K. (1999). "Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins." FEBS Lett **458**(1): 69-71.
- Narazaki, R., Maruyama, T. und Otagiri, M. (1997). "Probing the cysteine 34 residue in human serum albumin using fluorescence techniques." Biochim Biophys Acta **1338**(2): 275-81.
- Neitz, S., Jürgens, M., Kellmann, M., Schulz-Knappe, P. und Schrader, M. (2001). "Screening for disulfide-rich peptides in biological sources by carboxyamidomethylation in combination with differential matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Rap Commun Mass Spectrom **15**(17): 1586-1592.
- Neitz (1998). Präparative Herstellung einer Peptidbank aus humanem Blutfiltrat (Diplomarbeit). Hannover, Universität Hannover.
- Neubauer, G. und Mann, M. (1997). "Parent Ion Scans of Large Molecules." J Mass Spectrom **32**: 94-98.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A. und Vaulont, S. (2001). "Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8780-8785.
- Papayannopoulos, I.A. (1995). "The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides (Review)." Mass Spectrometry Reviews **14**: 49-73.
- Parekh, R.B. und Rohlff, C. (1997). "Post-translational modification of proteins and the discovery of new medicine." Curr Opin Biotechnol **8**(6): 718-723.
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J. und Ganz, T. (2000). "Hepcidin: a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver." J Biol Chem **11**: 7806-7810.



- Paul, W. (1990). "Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen." Angeordnete Chemie **102**: 780-789.
- Paul, W. und Steinwedel, H. (1953). "A new mass spectrometer without a magnetic field." Z. Naturforsch. **8a**: 448-450.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. und Cottrell, J.S. (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." Electrophoresis **20**(18): 3551-67.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. und Loreal, O. (2000). "A new mouse liver specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload." J Biol Chem **11**: 7811-7819.
- Pilon, A. (2000). "Rationale for the development of recombinant human CC10 as a therapeutic for inflammatory and fibrotic disease." Ann N Y Acad Sci **923**: 280-299.
- Pitt, A. (1998). "Application of electrospray mass spectrometry in biology." Natural Product Reports: 59-72.
- Quellhorst, E., Doht, B. und Schünemann, G. (1977). "Hemofiltration: Treatment of renal failure by ultrafiltration and substitution." Journal of Dialysis **1**(6): 529-543.
- Rehm, H. (2000). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Roepstorff, P. und Fohlman, J. (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides [letter]." Biomed Mass Spectrom **11**(11): 601.
- Rucker, R. und McGee, C. (1993). "Chemical modifications of proteins in vivo: selected examples important to cellular regulation." J. Nutr. **123**(6): 977-990.
- Saxena, S., Rybak, S., Davey, R.J., Youle, R. und Ackerman, E. (1992). "Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily." J Biol Chem **267**(30): 21982-21986.
- Schally, A., Redding, T., Bowers, C. und Barrett, J. (1969). "Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone." J Biol Chem **244**(15): 4077-4088.
- Schepky, A., Bensch, K., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W. (1994). "Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: determination of amino acids, peptides and proteins." Biomed Chromatogr **8**(2): 90-94.
- Schulz-Knappe, P., Raida, M., Meyer, M., Quellhorst, E. und Forssmann, W. (1996). "Systematic Isolation Of Circulating Human Peptides: The Concept of Peptide Trapping." European Journal Of Medical Research **1**: 223-226.
- Schulz-Knappe, P., Zucht, H., Heine, G., Jürgens, M., Hess, R. und Schrader, M. (2001). "Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures." Comb Chem High Throughput Screen **4**(2): 207-217.

- Schulz-Knappe, P., Mägert, H., Dewald, M., Meyer, M., Cetin, M., Kubbies, J., Tomczkowski, K., Kirchhoff, K., Raida, M., Adermann, K., Kist, A., Reinecke, M., Sillard, R., Pardigol, A., Uguccioni, M., Baggiolini, M. und Forssmann, W. (1996). "HCC-1, a novel chemokine from human plasma." J Exp Med **183**: 295-299.
- Sechi, S. und Chait, B. (1998). "Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification." Anal Chem **70**(24): 5150-5158.
- Shukla, A. und Futrell, J. (1993). "Collision activation and dissociation of polyatomic ions." Mass Spectrom Rev **12**: 211-255.
- Sillard, R., Jörnvall, H., Carlquist, M. und Mutt, V. (1993). "Chemical assay for cyst(e)ine-rich peptides detects a novel intestinal peptide ZF-1, homologous to a single zinc-finger motif." Eur. J. Biochem. **211**: 377-380.
- Singh, G. und Katyal, S. (2000). "Clara cell proteins." Ann N Y Acad Sci **923**: 43-58.
- Skilling, J. (1989). Classic Maximum Entropy. Maximum Entropy and Bayesian Methods. J. Skilling. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher: 45-52.
- Sliwkowski, M.X. und Levine, R.L. (1985). "Labeling of cysteine-containing peptides with 2-nitro-5-thiobenzoic acid." Anal Biochem **147**(2): 369-373.
- Solouki, T., Emmett, M.R., Guan, S. und Marshall, A.G. (1997). "Detection, number, and sequence location of sulfur-containing amino acids and disulfide bridges in peptides by ultrahigh-resolution MALDI FTICR mass spectrometry." Anal Chem **69**(6): 1163-1168.
- Stark, M., Danielsson, O., Griffiths, W.J., Jörnvall, H. und Johansson, J. (2001). "Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **754**(2): 357-367.
- Stults, J. (1995). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)." Curr Opin Struct Biol **5**: 691-698.
- Sundler, F. und Hakanson, R. (1988). Peptide producing endocrine/paracrine cells in the gastroentero-pancreatic region., Elsevier Science Publishers B.V.
- Svoboda, M., Meister, W. und Vetter, W. (1995). "A Method for Counting Disulfide Bridges in Small Proteins by Reduction with Mercaptoethanol and Electrospray Mass Spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **30**: 1562-1566.
- Swiderek, K., Davis, M. und Lee, T. (1998). "The identification of peptide modifications derived from gel-separated proteins using electrospray triple quadrupole and ion trap analysis." Electrophoresis **19**: 989-997.
- Westman, A., Nilsson, C.L. und Ekman, R. (1998). "Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry Analysis of Proteins in Human Cerebrospinal Fluid." Rapid Communications in Mass Spectrometry **12**: 1092-1098.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L. und Hochstrasser, D.F. (1996a).

“From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis.” Biotechnology (N Y) **14**(1): 61-65.

Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. und Williams, K.L. (1996b). “Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.” Biotechnol Genet Eng Rev **13**: 19-50.

Wilm, M. und Mann, M. (1996). “Analytical properties of the nanospray ion source.” Anal. Chem. **68**: 1-8.

Wilm, M., Neubauer, G. und Mann, M. (1996). “Parent Ion Scans of Unseparated Peptide Mixtures.” Anal. Chem. **68**: 527-53.

Wu, J., Gage, D.A. und Watson, J.T. (1996). “A strategy to locate cysteine residues in proteins by specific chemical cleavage followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.” Anal Biochem **235**(2): 161-174.

Zor, T. und Selinger, Z. (1996). “Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.” Anal Biochem **236**(2): 302-308.

Zucht, H.D., Grabowsky, J., Schrader, M., Liepke, C., Jürgens, M., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W.G. (1998). “Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication.” Eur J Med Res **3**(7): 315-323.

## Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Susanne Neitz
Geboren:	17. August 1968 in Rehren, Niedersachsen
Familienstand:	ledig
Schulbildung:	08/75 – 07/79: Grundschule in Hessisch Oldendorf 08/79 – 07/81: Orientierungsstufe in Hessisch Oldendorf 08/81 – 05/88: <i>Schiller-Gymnasium</i> in Hameln
Allg. Hochschulreife:	am 18.05.1988 in Hameln
Berufsausbildung:	10/88 – 9/90: Ausbildung zur Chemisch-technischen Assistentin an der <i>Bernd Blindow-Schule</i> in Bückeburg
Berufstätigkeit:	01.11.90 – 31.10.92 am <i>Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung</i> in Hannover; Abt. II Analytische Peptidchemie
Studium:	ab WS 92/93 Biologie (Diplom) an der <i>Universität Hannover</i>  04/97 – 01/98 Anfertigung der Diplomarbeit am <i>Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung</i>
Tätigkeiten:	01.11.92 – 31.08.96 als studentische Hilfskraft am <i>Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung</i>  ab 02/98 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Firma <i>BioVisioN AG</i> in Hannover
Dissertation:	ab 04/98 bei der Firma <i>BioVisioN AG</i> in Hannover unter der Betreuung von PD Dr. med. P. Schulz-Knappe

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der von mir angegebenden Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere ausserdem, dass diese Dissertation vorher nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Susanne Neitz

Hannover, im Oktober 2001