

**Proteomanalyse von
endothelialen Vorläuferzellen mit
2-D Gelelektrophorese und Massenspektrometrie**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom Biochemiker Zoltán Czentrár

geboren am 18.08.1978 in Miskolc, Ungarn

Referent: Prof. Dr. Andreas Pich

Korreferent: Prof. Dr. Ingo Just

Tag der Promotion: 29.10.2013

Proteomanalyse von endothelialen Vorläuferzellen mit 2-D Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

Kurzfassung

Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPC) sind in der Lage in Endothelzellen (EC) zu differenzieren und damit zur Gefäßregeneration und/oder Bildung neuer Blutgefäße beizutragen. Sie sind somit positiv an der kardiovaskulären Homöostase beteiligt. Interessanterweise korreliert die Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren mit einer reduzierten funktionellen Kapazität von EPCs, die sich z.B. in einer deutlich reduzierten Fähigkeit zur Neovaskularisierung bei manifester Atherosklerose zeigt. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind wenig untersucht und bislang nicht verstanden. Die Analyse des zellulären Proteoms mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese verbunden mit massenspektrometrischer Analyse stellt eine wertvolle Methode zur Aufklärung von zellulären Zusammenhängen dar, mit denen Proteine identifiziert werden können, die für Diagnose und Therapie von Erkrankungen neue Möglichkeiten eröffnen. Durch Unterschiede in den Protein-Profilen der EPCs von gesunden Probanden und kardiovaskulären Risikopatienten können Proteine identifiziert werden, die besonderen Anteil an der Funktion der EPC haben.

In der folgenden Arbeit wurde eine grundlegende instrumentelle Methode entwickelt, optimiert und validiert, mit der das Proteom nahezu jeder beliebigen biologischen Probe untersucht werden kann. Zunächst wurden die Proteine im zweidimensionalen Gel getrennt, die Proteinspots ausgeschnitten und im Gel mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide extrahiert. Für ihre Analytik wurde ein System bestehend aus Kapillarelektrophorese (CE) und Ionenfallen-Massenspektrometer eingesetzt. Dabei war der Auslass der Kapillarelektrophorese direkt mit der Ionenquelle des Massenspektrometers gekoppelt. Mit dieser Technik wurden Proteinprofile mehrerer Zelllinien (HUVEC, EPC und cALL2) erstellt, validiert und mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen. Das Ionenfallen-Massenspektrometer als Haupt-Messinstrument lieferte hochwertige MS/MS Spektren, die zur Suche in Datenbanken verwendet wurden und sichere Identifizierungen von Proteinen ermöglichten.

Mit der entwickelten Gel-CE-MS/MS Methode war sowohl die Identifikation der Proteine in den Zellen möglich, als auch die Quantifizierung regulierter Proteine in vergleichbaren Zellstadien/Zellformen konnte vorgenommen werden. Diese Quantifizierungs-Technik konnte in dieser Arbeit als erstmals gezeigt werden.

Proteome analysis of endothelial progenitor cells with 2-D gel-electrophoresis and mass spectrometry

Abstract

Circulating endothelial progenitor cells (EPC) are able to differentiate into endothelial cells (EC) and contribute in vascular regeneration and / or formation of new blood vessels. Thus, they are positively involved in the cardiovascular homeostasis. Interestingly, the number of cardiovascular risk factors correlating with a reduced functional capacity of EPCs, e.g. a significantly reduced capacity for neovascularization in case of manifested atherosclerosis. The underlying molecular mechanisms are not well studied and not yet fully understood. The analysis of the cellular proteome by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometric analysis is a valuable tool for the elucidation of cellular contexts. Proteins can be identified for diagnosis and treatment of diseases and these results could open new opportunities. With differences between the protein profiles of EPCs from healthy subjects and cardiovascular risk patients, proteins can be identified that have special role in the function of EPCs.

In the following work, a basic instrumental method has been developed, optimized and validated. With it the proteome of virtually any biological sample can be examined. First, the proteins were separated in two-dimensional gel, the protein spots in the gel were cut out, digested with trypsin and the resulting peptides were extracted. For their analysis a system consisting of capillary electrophoresis (CE) and ion trap mass spectrometer was used. The outlet of the CE capillary was coupled directly to the electrospray ion source of the mass spectrometer. With this technique, protein profiles of several cell lines (HUVEC, EPC and cALL2) were created, validated and compared with results from the literature. The ion trap mass spectrometer as the sensitive main instrument delivered decent quality MS / MS spectra and these were used to search protein databases for unambiguous identifications of proteins.

With the developed Gel-CE-MS/MS method not only the identification of the proteins in the cell lines was possible, but as well as the feasible quantification of regulated proteins in comparable cell stages / cell lines was shown. Using this technique for protein quantification has been shown in this work as the first time.

Schlagworte zum Inhalt:

Kapillarelektrophorese, Massenspektrometrie, Proteomanalyse

Catchphrases to the content:

Capillary electrophoresis, mass spectrometry, proteomic analysis

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2005 bis November 2008 im Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. Andreas Pich, Prof. Dr. Ingo Just und Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe dazu keine weiteren, als die hier aufgeführten Hilfsmittel benutzt und die aus anderen Quellen entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet. Ich habe die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Arbeit verwendet und abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen nicht veröffentlicht.

Zoltán Czentrár

Hannover, den 5. November 2013

Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Pich für seine nie aufhörende Unterstützung über die Jahre hinweg und Herrn Prof. Dr. med. Ingo Just, beide vom Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper vom Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, für die Betreuung während der Entstehung dieser Dissertation.

Für ihre vielseitige Unterstützung, die über technische Laborlogistik hinausging, möchte ich besonders Karin Agternkamp danken. Für fachliche Ratschläge und produktive Diskussionen geht ein herzlicher Dank an Marika Mützelburg. Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie für die immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken.

Für weitführende Kenntnisse und Erfahrungen in Ionenfallen-Massenspektrometrie möchte ich Dank an Andrea Schneider, die unerschütterlich Korrekturen gelesen hat, und ebenso viel auch an Andrea Kiehne aussprechen.

Die höchstmögliche Anerkennung im Laufe der Jahre der Dissertation gilt Anke Terrey für all ihre Geduld und die vielen Kommunikation und Silvia Terrey sowie Gabriele Hartig, die uns jederzeit zur Seite standen und stehen.

Für ihr einzigartiges Engagement geht mein ganz besonderer Dank an Kristina Marx.

Und natürlich auch an ihren Mann, Torben Marx, sowie Gordon van't Slot, Lars Krüger, Gábor Sasváry, Norbert Falucskai, der Honda-Gemeinschaft, der Gilde Legio Noctis und an dieser wertvollsten Stelle auch an Stephanie Jandl, weil sie mir zeigten, dass neben der Arbeit auch ein lebenswertes Leben gibt.

Zum Abschluß möchte ich mich bei meiner Familie in der Nähe und in der Ferne bedanken, die mir die Möglichkeit gab, soweit zu kommen und diese Dissertation beginnen zu können.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	10
2. Einleitung	11
2.1 Endotheliale Vorläuferzellen.....	11
2.2. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	12
2.3 Akute lymphatische Leukämie	13
2.4 Massenspektrometrie und Proteomik	14
2.5 Elektrospray-Ionisation	15
2.5 Sphärischer (3-dimensionaler) Ionenfallen-Massenspektrometer.....	19
2.6. Quantitative Proteomics	21
2.7 Kapillarelektrophorese (CE) ^[35]	26
3. Materialien und Methoden	31
3.1 Verwendete Materialien	31
3.2 Kultivierung der endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus peripherem Blut ^[36]	32
3.3 Kultivierung der MHH-cALL-2 und MHH-cALL-3 Zellen ^[37]	32
3.4 Herstellung von Proteinextrakten.....	33
3.5 Proteinbestimmung nach Bradford ^[38]	33
3.6 Markierung von Proteinen mit dem Isotope Coded Protein Labeling-Kit (ICPL Kit)...	34
3.7 Chloroform / Methanol-Fällung ^[39]	34
3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	35
3.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese	36
3.10 Enzymatische Spaltung von Proteinen in einer Polyacrylamidmatrix	36
3.11 Peptidtrennung mittels Kapillarelektrophorese	37
3.12 Elektrospray-Ionisierung(ESI) und Ionenfallen-Massenspektrometrie	37
3.13 Peptidstandardmix	39
4. Experimente und Ergebnisse	40
4.1 Vorversuche	40
4.1.1 Optimierung der Peptidtrennung in der Kapillarelektrophorese	40
4.1.2 MS Optimierung.....	43
4.2 Proteomanalyse von HUVEC Zellen	52
4.4 Proteomanalyse von cALL2 und cALL3-Zellen.....	64
4.4.1 Vorversuche zur Trennung auf Proteinebene im eindimensionalen Gradientengel	64
4.5 Proteinquantifizierung	70
5. Diskussion	74
7. Ausblick	85
8. Literaturverzeichnis.....	86
9. Anhang	92

1. Zusammenfassung

Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPC) sind in der Lage in Endothelzellen (EC) zu differenzieren und damit zur Gefäßregeneration und/oder Bildung neuer Blutgefäße beizutragen. Sie sind somit positiv an der kardiovaskulären Homöostase beteiligt. Interessanterweise korreliert die Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren mit einer reduzierten funktionellen Kapazität von EPCs, die sich z.B. in einer deutlich reduzierten Fähigkeit zur Neovaskularisierung bei manifester Atherosklerose zeigt. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind wenig untersucht und bislang nicht verstanden. Die Analyse des zellulären Proteoms mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese verbunden mit massenspektrometrischer Analyse stellt eine wertvolle Methode zur Aufklärung von zellulären Zusammenhängen dar, mit denen Proteine identifiziert werden können, die für Diagnose und Therapie von Erkrankungen neue Möglichkeiten eröffnen. Durch Unterschiede in den Protein-Profilen der EPCs von gesunden Probanden und kardiovaskulären Risikopatienten können Proteine identifiziert werden, die besonderen Anteil an der Funktion der EPC haben.

In der folgenden Arbeit wurde eine grundlegende instrumentelle Methode entwickelt, optimiert und validiert, mit der das Proteom nahezu jeder beliebigen biologischen Probe untersucht werden kann. Zunächst wurden die Proteine im zweidimensionalen Gel getrennt, die Proteinspots ausgeschnitten und im Gel mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide extrahiert. Für ihre Analytik wurde ein System bestehend aus Kapillarelektrophorese (CE) und Ionenfallen-Massenspektrometer eingesetzt. Dabei war der Auslass der Kapillarelektrophorese direkt mit der Ionenquelle des Massenspektrometers gekoppelt. Mit dieser Technik wurden Proteinprofile mehrerer Zelllinien (HUVEC, EPC und cALL2) erstellt, validiert und mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen. Das Ionenfallen-Massenspektrometer als Haupt-Messinstrument lieferte hochwertige MS/MS Spektren, die zur Suche in Datenbanken verwendet wurden und sichere Identifizierungen von Proteinen ermöglichten.

Mit der entwickelten Gel-CE-MS/MS Methode war sowohl die Identifikation der Proteine in den Zellen möglich, als auch die Quantifizierung regulierter Proteine in vergleichbaren Zellstadien/Zellformen konnte vorgenommen werden. Diese Quantifizierungs-Technik konnte in dieser Arbeit als erstmals gezeigt werden.

2. Einleitung

2.1 Endotheliale Vorläuferzellen

Endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*: EPCs, Abb. 1.) sind im Blutkreislauf zirkulierende niedrigabundante Zellen. Sie haben die Fähigkeit zu Endothelzellen zu differenzieren, welche die Innenseite der Blutgefäße im Falle einer Verletzung abdichten können. Außerdem können aus den endothelialen Vorläuferzellen neue Blutgefäße *de novo* entstehen. Am häufigsten läuft dieser Prozess *in utero* während der Embryonalentwicklung ab und wird als Vaskulogenese bezeichnet. Die endotheliale Vorläuferzellen wurden deswegen zuerst zu den Angioblasten gezählt, aus denen während der Embryogenese die Blutgefäße hervorgehen^[1,52].

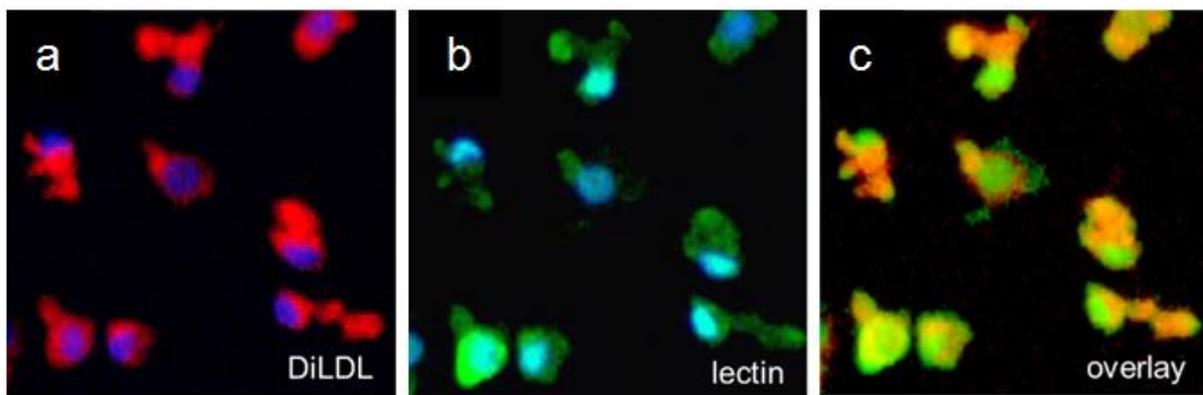


Abb. 1. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kultivierten EPC Zellen. Um EPCs in Zellkultur zu evaluieren wurde die Aufnahme von acetyliertem LDL (a.) mit der gleichzeitigen Anfärbbarkeit für Ulex Lektin (b.) untersucht. Im überlagerten Bild (c.) zeigt die Doppelfärbung eindeutig die EPCs.

EPCs sind Teil der pathologischen Angiogenese wie z.B. Retinopathie und Tumorwachstum. Zwar sind die embryonale Angioblasten bereits seit längerer Zeit bekannt, die adulten EPCs wurden erst in den 1990er Jahren durch Asahara *et al.* charakterisiert^[1]. Sie publizierten, dass eine aus dem Blut von erwachsenen Mäusen aufgereinigte Population von CD34-produzierenden Zellen *in vitro* zu Endothelzellen differenzieren können. Spätere Erkenntnisse in murinen^[2] und humanen^[3] Modellen führten zu der Annahme der Existenz der endothelialen Vorläuferzellen. Sie sind wichtig beim Tumorwachstum und spielen eine kritische Rolle bei Metastasierung und Angiogenese^[4]. Aktuelle Erkenntnisse zeigen außerdem, dass EPCs des Knochenmarkes über das Blut zu Tumoren transportiert werden und sich dort in den Tumorstromas und der Tumervaskulatur wiederfinden^[5]. Außerdem führt die

Entfernung von endothelialen Vorläuferzellen im Knochenmark zu einer deutlichen Abnahme des Tumorwachstums und vaskulären Entwicklung. So spielen EPCs auch in der Tumorbilogie eine bedeutende Rolle^[6]. Wurden hohe Konzentrationen von zirkulierenden EPCs im Blutstrom von Patienten gefunden, erlitten sie weniger wiederholte Herzattacken und hatten bessere Genesungschancen^[7,8]. Endotheliale Vorläuferzellen sind nach einem myocardialen Infarkt mobilisiert und reparieren die während der Herzattacke beschädigten Gefäßwände^[8].

2.2. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

HUVEC sind Zellen aus dem Endothel der Nabelschnurvenen von Neugeborenen und ähnlich den EPCs kleiden sie als einlagige Zellschicht das Blutgefäßsystem luminal aus. Abb. 2 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von HUVECs in Zellkultur. Sie bilden zusammen mit der Basalmembran die *Tunica intima* der Blutgefäße^[9]. Diese fungiert als Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und umgebendem Gewebe und reguliert den Stoff- und Zellaustausch zwischen diesen^[10]. Zu ihren synthetischen Fähigkeiten gehört die Produktion von Bestandteilen der Basalmembran (z.B. Kollagen-IV, Laminin, Fibronectin). Das Endothel ist des Weiteren durch die Bildung biologisch aktiver Substanzen an der Regulation des Gefäßtonus sowie an Koagulation und Fibrinolyse beteiligt^[11]. Es kontrolliert durch Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle die selektive Verteilung von zirkulierenden Zellen wie z.B. Leukozyten. Da HUVEC eine sehr gut untersuchte, und leicht zugängliche Zelllinie darstellen, die ähnliche Funktionen wie EPCs haben, wurde sie als Vergleichszelllinie und als Standard bei den Vorversuchen zur Optimierung der Methoden eingesetzt.

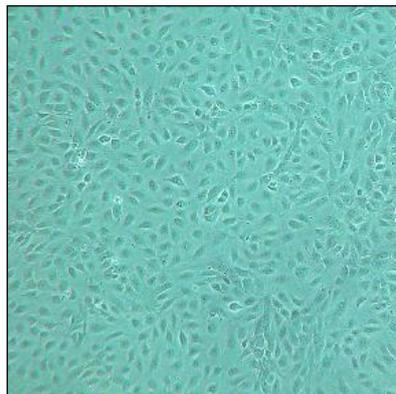


Abb. 2. Lichtmikroskopische Aufnahme von kultivierten HUVEC Zellen (Cell Applications Inc, USA)

2.3 Akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie, kurz ALL, geht von entarteten Vorläuferzellen der Lymphozyten (Abb. 3.) aus und wird mittels Chemotherapie behandelt. Vor 30 Jahren führte die ALL bei der überwiegenden Zahl der Patienten innerhalb von wenigen Wochen zum Tode. Noch heute ist sie bei 50–60 % erkrankter Erwachsenen und bei ca. 20–30 % aller erkrankten Kinder trotz intensiver Chemotherapie nicht heilbar. Erkrankungsursachen sind genetische Veränderungen, die zur malignen Transformation dieser Zelle führen.

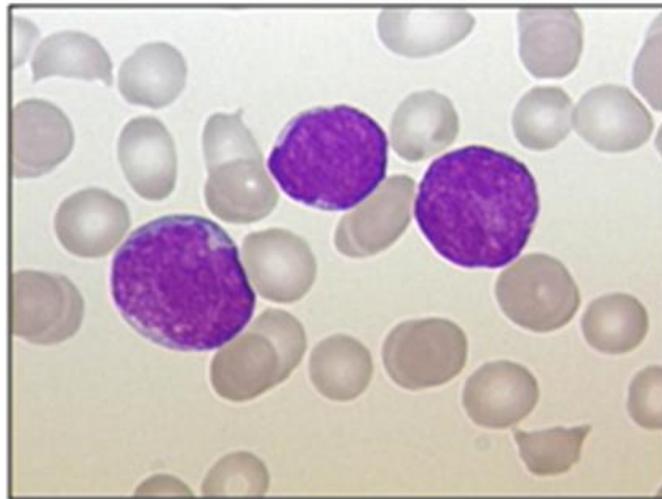
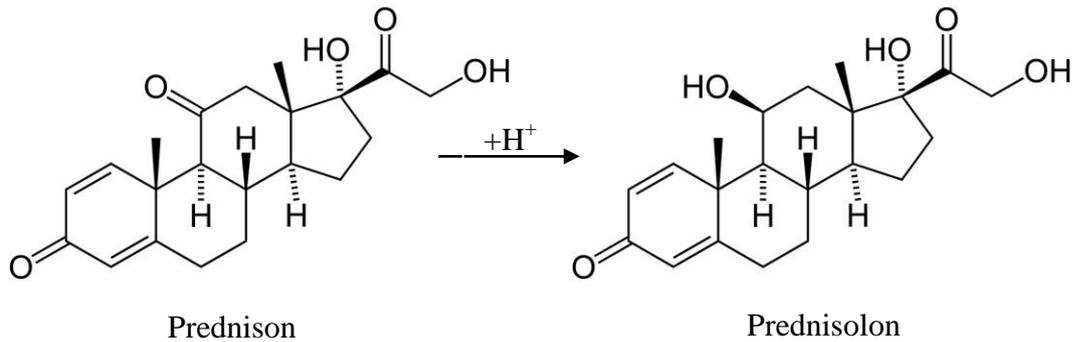


Abb. 3. Blutausstrich eines ALL Patienten. Die Blasten wurden mittels Pappenheim-Färbung (violett) sichtbar gemacht und das Bild bei 100facher Vergrößerung aufgenommen^[12]

Diese genetischen Veränderungen sind im Laufe des Lebens erworben und werden nicht vererbt, da Keimzellen nicht betroffen sind. Die genaue Kausalkette, die zum Auftreten der Erkrankung führt, ist bisher nicht bekannt. Zwar gibt es Risikofaktoren für das Entstehen von Leukämien (ionisierende Strahlung, chemische Mutagene etc.), aber bei den allermeisten Patienten kann man keine spezifische Ursache finden^[53]. Zur Behandlung der ALL können verschiedene Chemotherapie-Verfahren eingesetzt werden, die Behandlung läuft dabei nach folgendem Schema ab^[54]:

Induktionstherapie (u. U. als „Doppel-Induktion“) → Konsolidierungstherapie → Reinduktionstherapie → Erhaltungstherapie

In der Induktionsphase werden neben Zytostatika auch Kortikosteroide wie Dexamethason und Prednison eingesetzt. Letzteres ist ein künstliches Kortikosteroid und eine Vorstufe der aktiven Substanz, Prednisolon, welches in der Leber metabolisiert wird.



Die Induktionsphase dauert 4 bis 6 Wochen. Sie hat das Ziel, die ALL so weit zurückzudrängen, dass sie am Ende der Induktionsphase nicht mehr nachweisbar ist. Die Behandlung ist deswegen so intensiv, weil man den Blasten keine Zeit geben möchte Resistenzen zu entwickeln und deswegen eine möglichst rasche Reduktion der Tumorlast erzielen will. Natürlich sind damit nicht unerhebliche Nebenwirkungen und eine Prednison-Abhängigkeit verbunden. Ein Teil der Patienten jedoch spricht nicht auf die Behandlung von Prednison an und muss mit anderen Therapiemitteln behandelt werden. Bei Kindern und insbesondere wenn die ALL sich schnell ausbreitet, geht damit wertvolle Zeit verloren. Um dieses Problem charakterisieren zu können, wurden die folgenden zwei Zelllinien etabliert^[13]: MHH-cALL2 (DSMZ ACC 341) als sog. *poor responder* (PPR) und MHH-cALL3 (DSMZ ACC 339) als *good responder* (PGR) Zellen. Das Proteom dieser Zelllinien wurde im Rahmen dieser Dissertation untersucht.

2.4 Massenspektrometrie und Proteomik

In den letzten 20 Jahren sind zwei Bereiche der Bioanalyse in den Mittelpunkt der Forschung gerückt: die Genomforschung und die Proteomforschung. Die Genomforschung beschäftigt sich mit dem Genom, der Gesamtheit der vererbaren Information einer Zelle oder eines Lebewesens und die Wechselwirkung der darin enthaltenen Gene. Die Proteomforschung hingegen umfasst die Gesamtheit aller in einer Zelle oder einem Lebewesen usw. unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegende Proteine^[14]. Die Gene enthalten den Konstruktionsplan des zellulären Systems, Proteine sind verantwortlich für die Umsetzung und Regulation dieses Plans. Während das Genom eher konstant ist, verändert sich das Proteom dynamisch mit der Zeit, variiert von Zelle zu Zelle und wird von biochemischen Interaktionen ununterbrochen modifiziert. Genomanalysen sind seit längerer Zeit etabliert und die Genome einer Vielzahl von Organismen wurden bereits sequenziert und

annotiert^[55]. Die Herausforderung ist heute die Analyse des Proteoms, weil es ein besseres Verständnis über die Zelle, das Gewebe oder den Organismus liefern kann. Proteomanalysen beschränken sind nicht nur auf eine Beschreibung der Proteinzusammensetzung einer gegebenen Probe, sondern können auch benutzt werden, um qualitative und quantitative Veränderungen der zellulären Proteinmuster unter bestimmten Bedingungen zu charakterisieren und zu identifizieren. Neben einer Reihe von Methoden zur Proteinidentifikation ist die Massenspektrometrie (MS) zur Zeit die effizienteste. Werden die Proteine vor der massenspektrometischen Analyse proteolytisch in ihre Peptide zerlegt, spricht man von *bottom-up proteomics*^[15]. Meistens ist es notwendig, die Probenkomplexität vor der Analyse zu verringern. Dies kann sowohl auf der Protein- als auch auf der Peptidebene oder auf beiden erfolgen. Proteine können hierbei mit einem geeigneten Verfahren wie Gelelektrophorese, Free-Flow-Elektrophorese^[16] oder chromatographisch separiert werden. Der Proteinextrakt kann auch ohne Zwischenschritt verdaut werden und die so entstandenen Peptide werden mit einer chromatographischen Methode wie z.B. reversed phase Chromatographie oder einer Elektrophorese wie z.B. Kapillarelektrophorese, (CE) voneinander separiert^[17].

Als Analysemethode für Biomoleküle, wie Peptide, wurde die MS erst Ende der 1980er Jahre nach der Entwicklung der milden Elektrospray-Ionisation (ESI)^[18] und der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)^[19, 20] attraktiv. Diese Techniken ermöglichen den schonenden Übergang großer Biomoleküle in die Gasphase und ihre anschließende Ionisierung.

2.5 Elektrospray-Ionisation

Das ESI-Verfahren gehört zu den Ionisationsverfahren, bei denen die schonende Erzeugung der Ionen unter Atmosphärendruck (*atmospheric pressure ionisation API*) stattfindet. Da es kaum zu unerwünschter Fragmentierung des Analytmoleküls führt, wird sie bevorzugt zur Analyse von Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden, Oligonukleotiden usw. eingesetzt. Außerdem ermöglicht die ESI die online Kopplung mit einem vorgeschalteten Trennsystem (HPLC, CE) um die Probenkomplexität zu verringern. Die Probenlösung wird durch eine Kapillare geleitet, welche sich in einem sog. Sprayer befindet. Mit Hilfe eines inerten Träger-(Nebuliser-) Gases wird ein Spray erzeugt, welches die Verdampfung des Lösungsmittels unterstützt. Lösungsmitteltropfen bewegen sich im elektrischen Feld aufgrund der Potentialdifferenz zum unter Spannung stehenden Kapillareingang des Massenspektrometers

und werden allmählich aufgrund der Verdampfung, die durch ein Trockengas unterstützt wird, immer kleiner. (Abb. 4). Als Lösungsmittel für Peptide eignen sich polare Verbindungen, wie Wasser, Acetonitril, Methanol, Isopropanol u.ä.

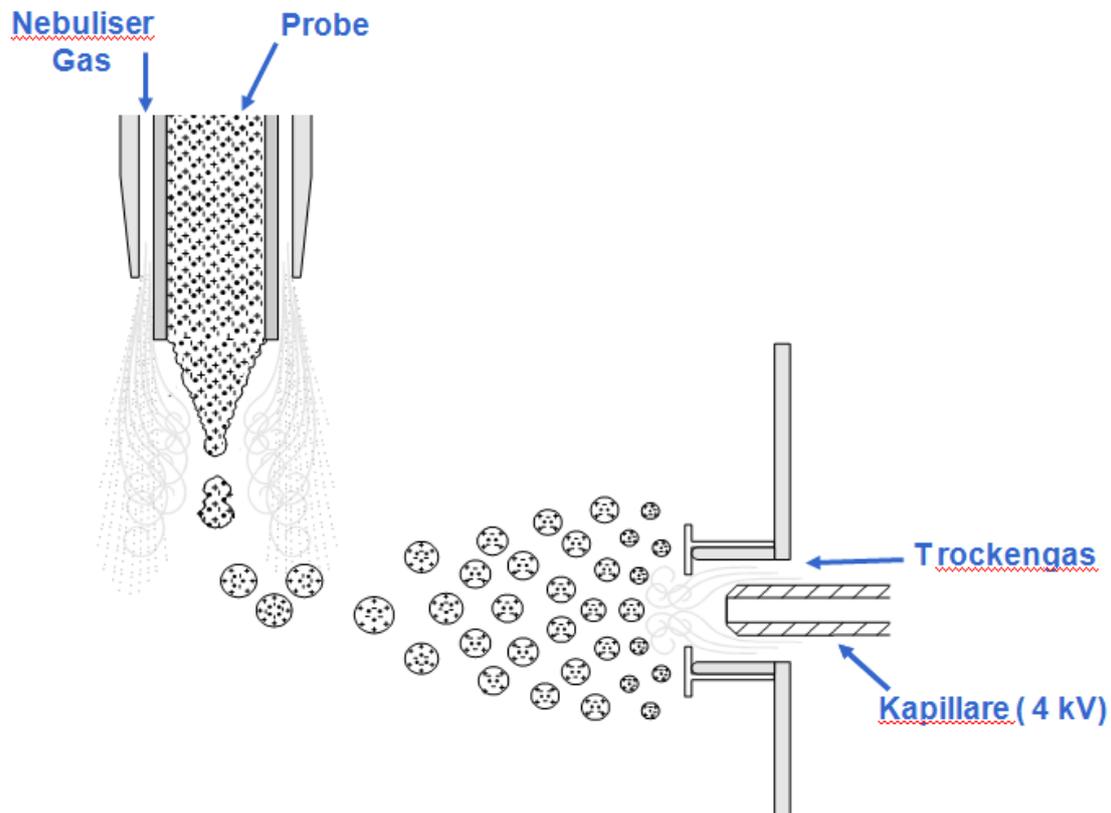


Abb. 4. Schematische Darstellung einer orthogonalen Elektrospray-Quelle. Das aus der Kapillare im Spraykopf mittig herausströmende und die Analytione enthaltene Lösungsmittel wird durch das umströmende Nebuliser-Gas zerstäubt. Die entstehenden geladenen Tröpfchen bewegen sich im elektrischen Feld zu dem Kapillareingang^[21].

Somit vergrößert sich die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfenoberfläche. Wenn der Tropfen kleiner wird als das sogenannte Rayleigh-Limit, zerfallen sie in noch kleinere Tröpfchen wegen der Abstoßung von gleichartigen Ladungen (dieser Vorgang ist auch als Coulomb-Explosion bekannt). (Abb. 5)^[22].

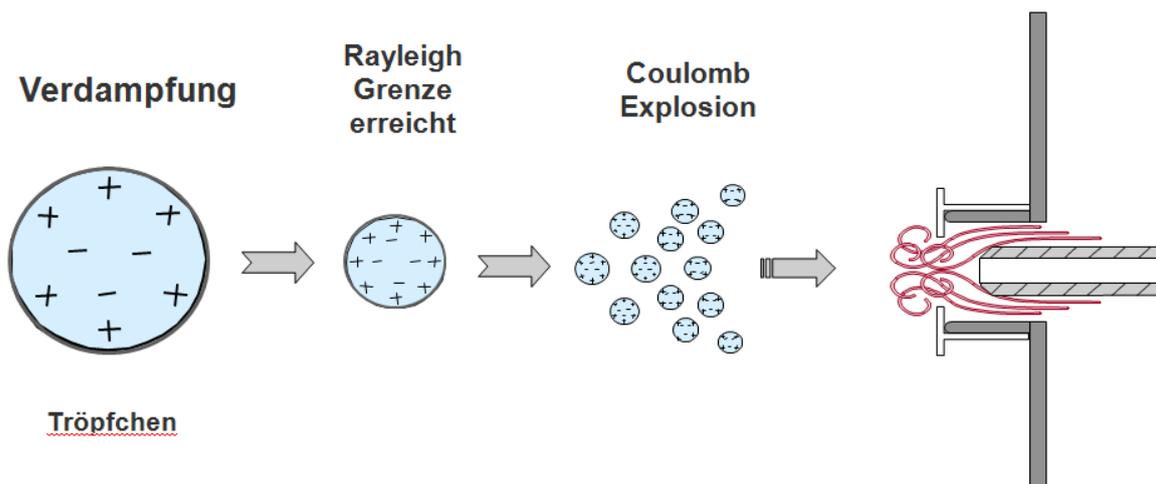


Abb. 5. Elektrospray Prozess. Während das Lösungsmittel verdampft, verkleinert sich das Volumen der Tröpfchen bis die Rayleigh-Grenze erreicht wird. Unter dieser Grenze wird die Abstoßung auf der Tröpfchenoberfläche zwischen den gleichmäßig geladenen Ionen so stark, dass es explosionsartig in kleinere Tochtertröpfchen zerfällt^[21].

Für die Bildung dieser Ionen in der Gasphase existieren mehrere Modellvorstellungen. Das *charge residue model* (CRM, „Modell des geladenen Rückstands“) geht davon aus, dass letztlich Tropfen von etwa 1 nm Durchmesser übrigbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten^[23] (Abb. 6). Beim *ion evaporation model* (IEM, Ionenemissionsmodell) wird angenommen, dass bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden^[24].

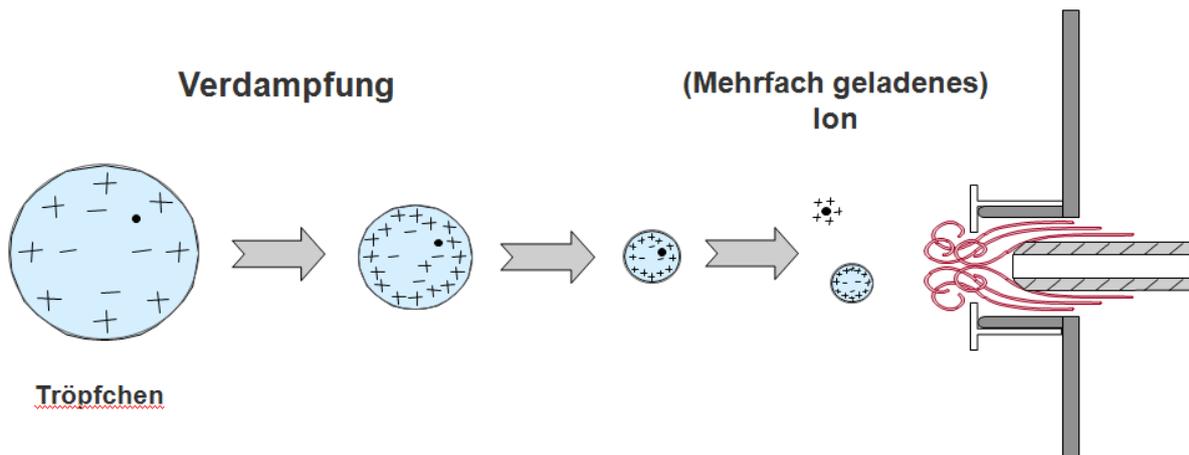
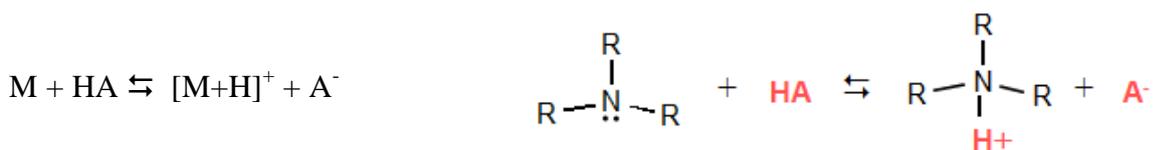
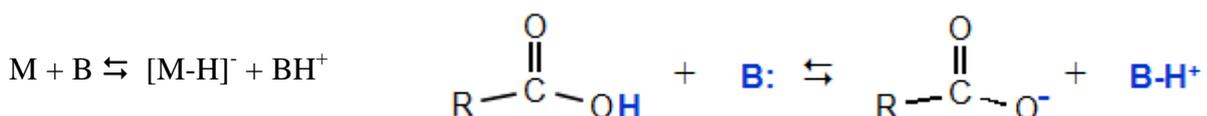


Abb. 6. Elektrospray-ionisierungsprozess. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels entstehen nach dem "Modell des geladenen Rückstandes" einzelne "nackte" Ionen. Charakteristisch für die ES Ionisierung ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen^[21].

Die Art der Spannung, welche am Kapillareingang angelegt wird, bestimmt die Ladung der erzeugten Ionen (eine negative Spannung erzeugt positive Ionen und umgekehrt). Charakteristisch für die ESI ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen und eine Adduktbildung mit Bestandteilen der Probenmatrix oder des Eluenten oder Puffers ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ usw.). Analyten mit basischem Charakter, wie z.B. Aminogruppen tragende Komponenten, werden meistens im positiven Modus ionisiert. Sie nehmen von einem sauren Lösungsmittel ein Proton auf. So wirkt sich die Anwesenheit von Säuren wie Ameisensäure (*formic acid*, FA) oder Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*, TFA) begünstigend auf die Ionisierung aus:



Analyten mit eher sauren Eigenschaften (Karbon- und Sulfonsäuren, Phenole) werden bevorzugt im negativen Modus ionisiert. Sie verlieren ein Proton an die Base im Lösungsmittel und werden dadurch negativ geladen:



2.5 Sphärischer (3-dimensionaler) Ionenfallen-Massenspektrometer

Das Ionenfallen-Massenspektrometer besteht aus vier Haupteinheiten (Abb. 7.) In der Elektrospray-Ionenquelle werden die Analytionen gebildet und dann über eine Transfereinheit aus mehreren Oktopolen und Ionenlinsen, in der die Ionen weiter beschleunigt und fokussiert werden, zu dem Massenanalysator, einer 3-dimensionale Ionenfalle, geleitet. An diesen schließt sich ein Detektor an, in welchem die Ionen detektiert und in elektrische Signale umwandelt werden.

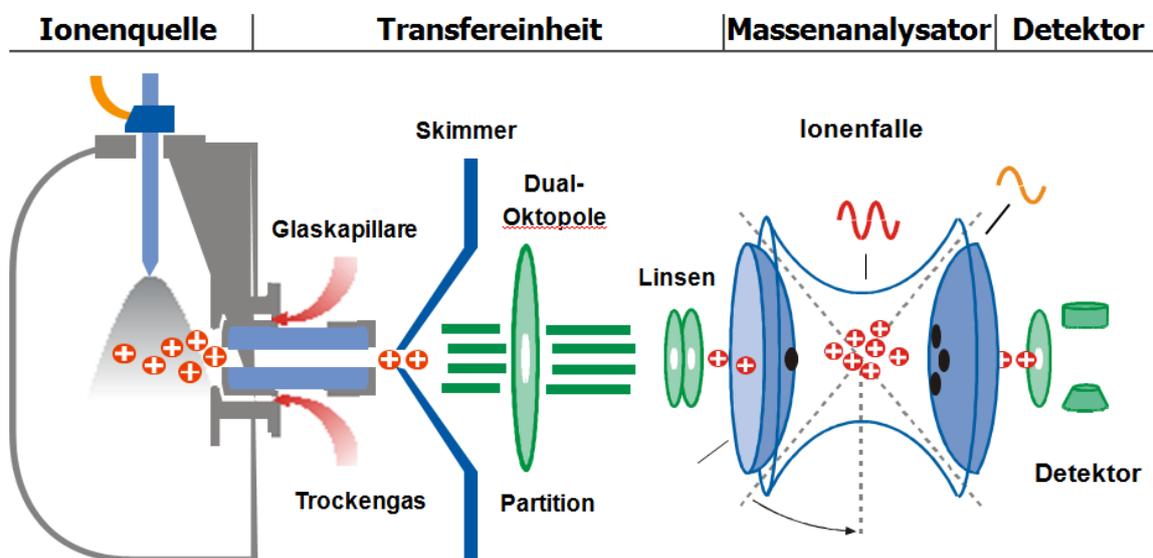


Abb. 7. Schematischer Aufbau eines dreidimensionalen Ionenfallen Massenspektrometers mit Elektrospray-Ionenquelle^[21].

In einem Ionenfallen-Massenspektrometer werden die Ionen durch elektromagnetische Felder innerhalb der Falle in einem definierten Volumen von ca. 1mm Durchmesser gehalten und können so analysiert (isoliert, fragmentiert usw.) werden.

Dabei wird an die Ringelektrode eine Spannung mit einer festen Frequenz von 781 kHz gelegt und auf eine der Endkappen ein Drittel dieser Frequenz. Bei Variieren der Amplitude dieser Spannungen können selektiv Ionen aus der Falle geworfen oder definierte Massenbereiche isoliert werden. (Abb. 8.)

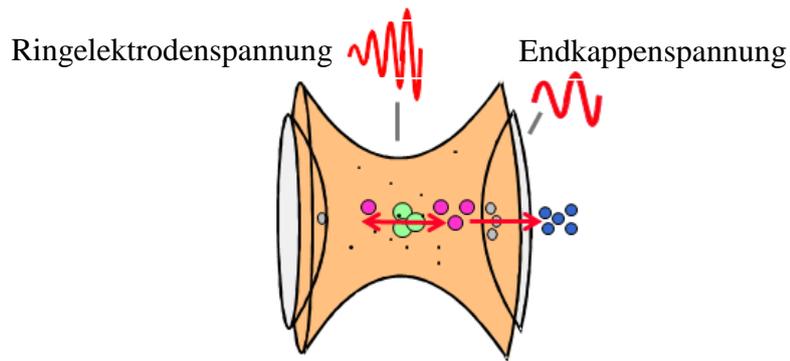


Abb. 8. Prinzip der Ionenfalle. Durch Erhöhen („ramping“) der Amplitude der Ringelektrode- sowie der Endkappenspannung können selektiv die in der Ionenfalle gespeicherten Ionen ihrer Masse nach diese verlassen und zum Detektor gelangen^[21].

Mit der massenspezifischen Anregung einzelner Ionen gefolgt von deren Kollision mit dem in der Falle vorhandenen Heliumgas (5×10^{-6} mbar) können die Ionen fragmentiert werden (*collision induced dissociation (CID)*). Dabei es ist nicht zwingend erforderlich, dass diese Ionen vorher isoliert werden. Eine Eigenschaft der Ionenfalle ist, dass aufgrund der massenspezifischen Anregung im MS/MS ausschließlich Primärfragmente entstehen (Abb. 9).

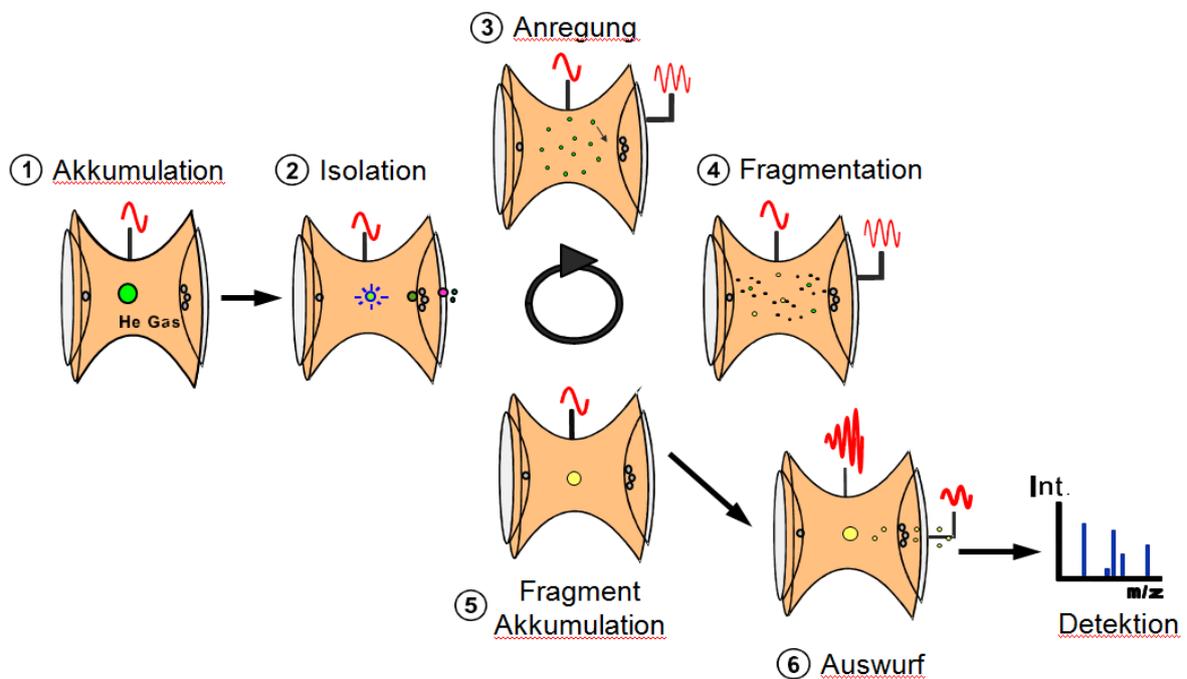


Abb. 9. Schematischer Ablauf der MS/MS Fragmentierung in einer 3D Ionenfalle. Nach Akkumulation der Ionen erfolgt die Isolation der gewünschten Masse in einem definierten Massenfenster. Die isolierten Ionen werden spezifisch angeregt und sie fragmentieren durch Kollision mit Heliumgas. Die entstandenen

Primärfragmente werden erneut in der Mitte der Falle akkumuliert und können gescannt oder weiter einem neuen MSn Zyklus zugeführt werden^[21].

Die Art der in MS/MS Spektrum beobachteten Peptidfragmentionen hängt von der primären Aminosäuresequenz, der inneren Energie der Peptide, der Art der Aktivierung und vom Ladungszustand ab. Die Nomenklatur der Fragmentionen wurde zuerst von Roepstorff und Fohlman in 1984 vorgestellt^[25] und in 1987 von Johnson *et al.* nachträglich modifiziert^[26]. Werden tryptisch verdaute Peptide in der Ionenfalle im CID Modus fragmentiert, entstehen hauptsächlich sogenannte b- und y- Ionen (Abb. 10.). Diese Sequenzionen ermöglichen eine Datenbanksuche in der alle Peptide der Datenbank theoretisch zerlegt und dann mit den gemessenen Fragmentmassen verglichen werden.

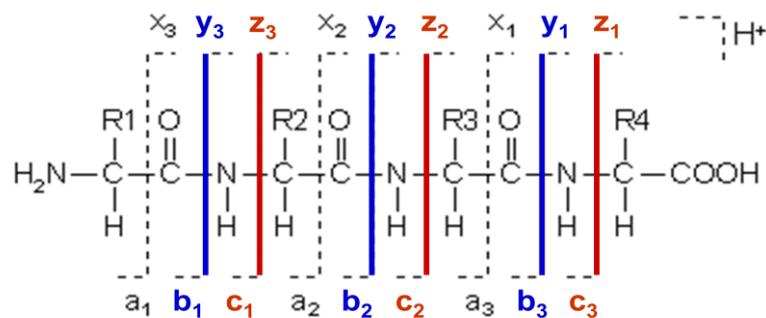


Abb. 10: Schematische Darstellung eines Tripeptids. Bei MS/MS Fragmentierung entstehen aus einem Peptidmolekül immer jeweils zwei, miteinander korrespondierende b- und y-Fragmente^[25].

Für Bottom-up Proteomics wird das Massenspektrometer im positiven Modus betrieben, da Peptide basische Eigenschaften besitzen. Um die Aminosäure-Sequenz der Peptide bestimmen zu können, werden sie im MS/MS-Modus fragmentiert und die erhaltene Information in Proteindatenbanken gesucht. Es existieren mehrere Datenbanken (NCBI, SwissProt), welche Proteinsequenzen enthalten. Diese können mit Software-Suchmaschinen, wie Mascot, X! Tandem oder OMSSA durchsucht werden. Die gewonnenen Ergebnisse werden statistisch mit Algorithmen ausgewertet. Somit können den Massenspektren eindeutige Aminosäuresequenzen und damit Proteine zugeordnet werden.

2.6. Quantitative Proteomics

Neben der Identifizierung kann auch eine Quantifizierung intakter Proteine oder ihrer Fragmente im Massenspektrometer durchgeführt werden, womit neue Einblicke in

Zellmechanismen erhalten werden können. Dazu werden Vergleiche zwischen den Proteomen unterschiedlicher Proben durchgeführt, die z.B. erkranktem oder gesundem Gewebe entnommen wurden. Somit können potentielle Biomarker für die Diagnose, oder Therapie bestimmter Krankheiten gefunden werden ^[14, 27-29] In diesen Studien werden Vergleiche von Proteinprofilen zwischen Referenz und Kontrollbedingungen aufgestellt. Unterschiede in den Profilen liefern dann Hinweise auf physiologische Unterschiede und möglicherweise auf die Ursache der Erkrankung.

Entsprechende Experimente können auch mittels cDNA Microarray-Analysen durchgeführt werden. In diesen Untersuchungen wird fast immer die Menge einer bestimmten cDNA als Surrogat-Marker für die Proteinabundanz verwendet. Aber diese Ergebnisse korrelieren oft nicht mit der Proteinabundanz und können auch nicht die Plastizität des Proteoms in Hinblick auf post-translationale Modifikationen abbilden. Zudem können Proteine aus der Zelle in den extrazellulären Raum aktiv hinaus transportiert werden^[30,31]. Gegenwärtig sind mehrere Verfahren anerkannt, um unterschiedliche globale Proteinprofile quantitativ miteinander zu vergleichen: Proteinarray-Messungen^[32], zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2DE) gekoppelt mit MS-basierter Identifizierung der Proteine^[33] oder aber die Quantifizierung im Massenspektrometer nach Einsatz von Protein-Markierungsmethoden. Letztere basieren auf dem Einsatz von stabilen leichten bzw. schweren Isotopen womit eine Zuordnung der Proteine zu einer bestimmten Probe erfolgen kann. Unterschiedlich behandelte Zellen können gemischt werden und die Detektion der Proteine im MS ermöglicht die eindeutige Zuordnung und eine relative Quantifizierung. Obwohl 2DE-MS sich früh erfolgreich durchgesetzt hat, sind quantitative Vergleiche nur unter erheblichen Aufwand wegen der geringen Reproduzierbarkeit der 2D Gele möglich. Außerdem lassen sich bestimmte Proteingruppen wie Membranproteine, sehr saure bzw. basische Proteine, sehr kleine sowie sehr große Proteine auf demselben 2D Gel nur schwer analysieren^[33]. Um einige dieser Nachteile zu umgehen, wurden gelfreie Methoden entwickelt. Je nach Fragestellung werden auch labelfreie Proteinquantifizierungsmethoden verwendet. Bei dieser Quantifizierung werden nach Akquisition mehrerer technischer Replikate die absoluten Intensitäten der Peptidmassensignale miteinander verglichen und statistisch ausgewertet. Voraussetzung sind hierfür reproduzierbare Retentionszeiten bei der Peptidtrennung.

2.6.1 Isotope-coded protein label (ICPL) Verfahren

Bei der MS-basierten Quantifizierung mittels stabiler Isotope wird die Probe A (oder Zustand A) mit einem Reagenz markiert, das nur leichte stabile Isotope enthält und die Probe B (oder Zustand B) mit einem Reagenz markiert, das schwere stabile Isotope aufweist (meist vom ^{13}C -Typ). Die unterschiedlich markierten Proben haben identische chemische Eigenschaften und unterscheiden sich lediglich in ihrer Masse. Daher können sie vermischt und ihre Komplexität mit einer geeigneten Methode auf Protein- und/oder Peptidebene verringert werden. Dazu eignen sich z.B. Gelelektrophorese (1D oder 2D), Free-flow-Elektrophorese (FFE), CE oder Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (HPLC). Danach können sie im Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert werden. Mit unterschiedlichen Isotopen markierte Peptide unterscheiden sich im Massenspektrum um exakt die Masse der unterschiedlichen leichten bzw. schweren Isotopmarkierung, alle anderen physikochemischen Eigenschaften bleiben identisch. Daher ist die Intensitätsdifferenz der beiden Signale direkt proportional zu den Peptidmengen und es kann relativ zueinander quantifiziert werden.

Beim ICPL Verfahren werden freie Lysinreste sowie das N-terminale Proteinende mit dem Reagenz markiert^[34]. Das ICPL Reagenz enthält eine mit einem N-Hydroxylsuccinimid veresterte Nikotinsäure, welche mit der Aminogruppe reagiert. Die Nikotinsäure wird so modifiziert, dass sie entweder leichte oder schwere Kohlenstoffisotope enthält. Die Massendifferenz zwischen den beiden Reagenzen beträgt 6.02 Da. (Abb. 11).

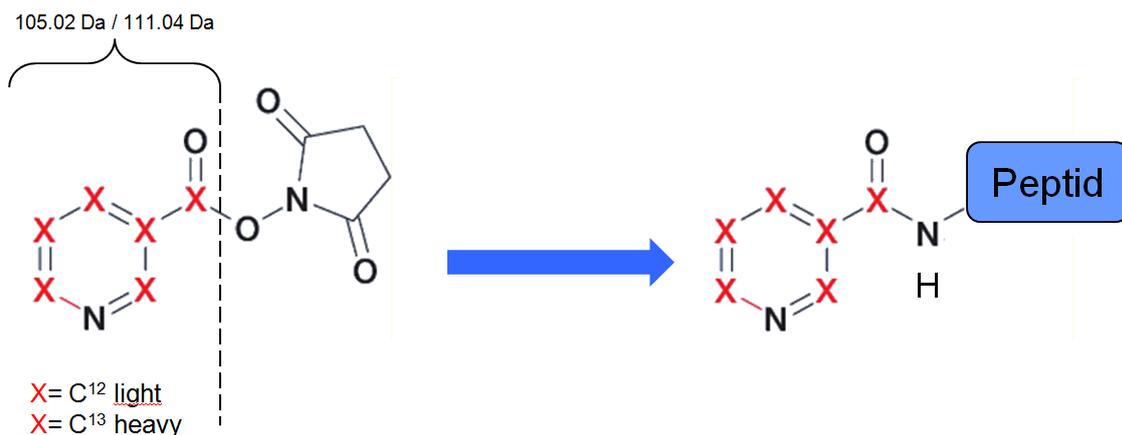


Abb. 11. Chemische Zusammensetzung des ICPL Reagenz. Das Reagenz enthält einen N-hydroxylsuccinimid Teil, welcher mit freien Lysinen sowie dem N-Terminus des Proteins unter Bildung eines NHS-Ester reagiert. Die Masse der so markierten Peptide wird um 105.02 Da oder 111.04 Da erhöht, ihre Massendifferenz beträgt 6.02 Da. Die MS-Signalintensität wird für die relative Quantifizierung verwendet^[34].

Proteine z.B. aus zwei zu untersuchenden Zelllinien werden extrahiert und die Cystein-disulfidbrücken reduziert und alkyliert. Die freien Aminogruppen aller Proteine sowie ihr N-terminales Ende werden mit dem leichten oder mit dem schweren ICPL Reagenz markiert. Nach dem Vereinen beider Proteinmischungen kann ein beliebiges Proteintrennverfahren angewandt werden, um die Probenkomplexität bereits auf der Proteinebene zu verringern. Die getrennten Proteine werden dann enzymatisch mit Trypsin verdaut und die so entstehenden Peptide können mittels RP-HPLC oder CE voneinander getrennt und mit einem direkt verbundenem Massenspektrometers analysiert werden (Abb. 12). Die Quantifizierung erfolgt bei ICPL Experimenten auf MS Ebene, da die Peptide unterschiedliche Massen besitzen (man spricht hier von einer nicht-isobaren Markierung) Die Identifizierung der Peptide erfolgt dann anhand von MS/MS-Spektren mit anschließender Datenbanksuche.

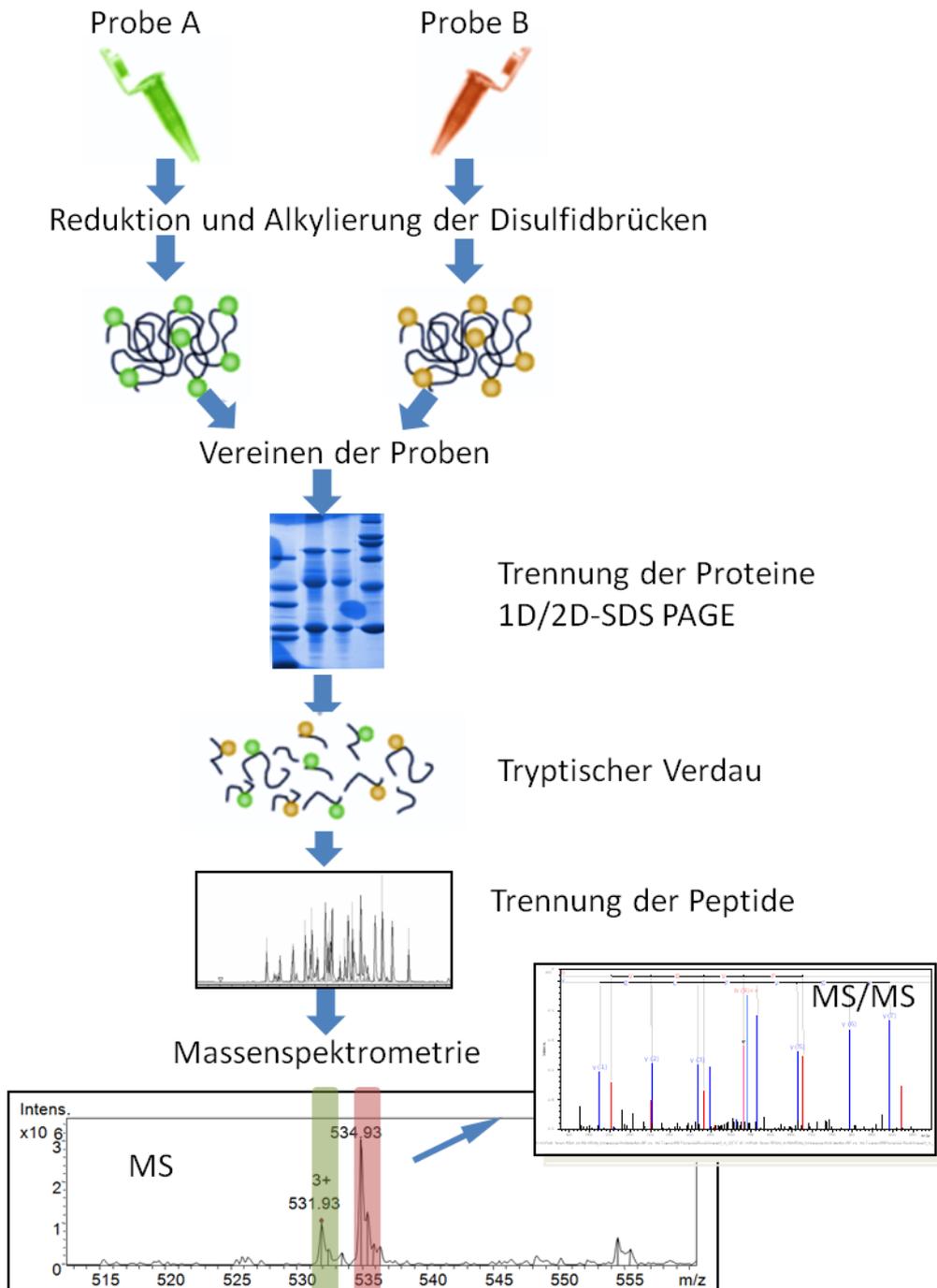


Abb. 12: Verlauf der Analyse ICPL markierter Proteine

2.7 Kapillarelektrophorese (CE) [35]

Die kapillarelektrophoretische Trennung von Ionen beruht auf ihren unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld. Diese Geschwindigkeit ist abhängig von Geometrie und Ladung dieser Ionen sowie der Temperatur, dem pH-Wert und der Viskosität des Lösungsmittels und der elektrischen Feldstärke. Auf ein geladenes Teilchen wirken somit mehrere Kräfte (Abb.13).

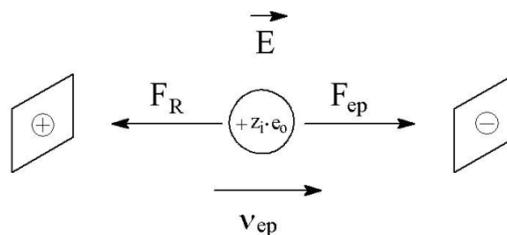


Abb. 13. Einfluss der Beschleunigungs- und Reibungskraft auf ein geladenes Teilchen: F_{ep} : Beschleunigungskraft; F_R : Reibungskraft; E : Feldstärke; z_i : Ladungszahl des Teilchens; e_0 : elektrische Elementarladung; v_{ep} : elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit.

Die Beschleunigungskraft F_{ep} berechnet sich nach folgender Gleichung (z_i : Ladungszahl des Teilchens, e_0 : elektrische Elementarladung, E : Feldstärke):

$$F_{ep} = z_i \cdot e_0 \cdot E$$

Die auf die bewegten Teilchen ausgeübte Reibungskraft F_R kann unter der Annahme von kugelförmigen Ionen in dem laminaren Fluss in der Kapillare näherungsweise durch das Gesetz von Stokes beschrieben werden (η : Viskosität, r_i : Stockesscher Radius des Ions, v_{ep} : elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit)

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_{ep}$$

Das Ion wird solange beschleunigt, bis es zu einem Kräftegleichgewicht zwischen der Beschleunigungskraft F_{ep} und der Reibungskraft F_R kommt. In diesem Gleichgewicht bewegen sich die Ionen mit einer konstanten elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} ,

welche zum angelegten elektrischen Feld direkt proportional ist (μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität, E : Feldstärke):

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E$$

Die elektrophoretische Mobilität stellt für eine ionische Spezies eine Konstante dar und repräsentiert die Wanderungsgeschwindigkeit bei einer angelegten Feldstärke von 1 V/m. Die elektrophoretischen Mobilitäten der Kationen erhalten ein positives, die der Anionen ein negatives Vorzeichen. Somit ergibt sich durch Einsetzen von F_{ep} und F_R (v_{ep} : elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit, μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität, E : Feldstärke, z_i : Ladungszahl des Teilchens, e_0 : elektrische Elementarladung, η : Viskosität, r_i : Stockesscher Radius des Ions):

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i}$$

Daraus lässt sich die Gleichung für die elektrophoretische Mobilität aufstellen:

$$\mu_{ep} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i}$$

Da diese Gleichung allerdings nur für sphärische Teilchen in unendlich verdünnten Lösungen gilt, ist die direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität nicht möglich. In einer realen Elektrolytlösung endlicher Ionenkonzentration baut sich um das Ion eine Wolke aus Gegenionen auf. Diese verringert die effektive Ladung des Ions und verlangsamt das Ion, d.h. es bewegt sich langsamer, als es seiner Ladung entsprechen würde. Dies wird auch als elektrophoretischer Effekt bezeichnet

Für die Trennung in der CE gibt es noch einen weiteren wichtigen elektrokinetischen Effekt, die Elektroosmose. Darunter versteht man die Bewegung einer Elektrolytlösung relativ zu einer geladenen Oberfläche durch das angelegte elektrische Feld.

Die verwendeten Kapillaren bei der CE sind *fused-silica* Kapillaren, an deren Oberfläche Silanolgruppen vorliegen. Diese Silanolgruppen sind je nach pH-Wert der Elektrolytlösung mehr oder weniger stark dissoziiert. Die Oberfläche der Kapillare wird daher als negativ geladen betrachtet. Zwischen der stationären festen Phase (die Oberfläche der *fused-silica*

Kapillare) und der beweglichen flüssigen Phase (Elektrolyt) bildet sich aufgrund des elektrischen Feldes eine elektrische Doppelschicht aus. Mit größer werdender Entfernung zwischen der negativen Kapillarwand und positiv geladenen Peptiden verringert sich die Coulombsche Wechselwirkung zwischen ihnen. Es bildet sich ein extrem flaches, stempelförmiges Strömungsprofil aus, welches zu einer sehr geringen Dispersion der Probenzonen und daher zu schmalen Peaks und hohen Effizienzen führt.

Bei der druckgetriebenen Strömung in der Chromatographie (wie z.B. HPLC) kommt es zur Ausbildung eines parabolischen Strömungsprofils, welches zu einer deutlich stärkeren Dispersion der Probenzonen und damit zu breiteren Peaks und Effizienzverlusten führt. Im Vergleich dazu trägt im idealen Fall bei der Kapillarelektrophorese nur die Axialdiffusion zur Bandenverbreiterung bei (Abb. 14).



Abb. 14. a.) Strömungsprofile in CE und HPLC. Stempelförmiges Strömungsprofil bei der CE. b.) parabolisches Strömungsprofil von hydrodynamischen Flüssen, wie z.B. HPLC.

Die Injektion der Probe kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Bei der hydrodynamischen Injektion erfolgt dies durch das Anlegen eines Druckes am Kapillareneingang, eines Vakuums am Kapillarenausgang oder eines hydrostatischen Druckes. Da es bei der CE-MS Kopplung kein Auslass-Gefäß gibt, wird die Probe durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß und Kapillareingang aufgegeben, wobei der Druck im Probengefäß erhöht wird.

Bei der elektrokinetischen Injektion hingegen nutzt man die Tatsache aus, dass das elektrische Feld in der Kapillare eine elektrophoretische und eine elektroosmotische Bewegung erzeugt. Wenn das Inlet-Kapillarende in das Probengefäß eintaucht und für eine definierte Zeit eine

Spannung angelegt wird, migrieren die geladenen Probenkomponenten in die Kapillare. Hierbei muss man sich allerdings bei Mehrfachinjektionen aus demselben Probengefäß der Abnahme der Probenkonzentration bewusst sein.

In der CE werden verschiedene Trenntechniken verwendet, wie die Kapillarzonenelektrophorese (CZE), isoelektrische Fokussierung (CIEF) und Isotachophorese (ITP). Bei der CZE erfolgt die Probenauftragung als möglichst schmales Band und nach Anlegen des elektrischen Feldes bewegt sich jede Komponente der Probe aufgrund ihrer Mobilität. Im Idealfall bilden sich reine Zonen mit nur einer Komponente aus, die Auftrennung erfolgt aufgrund der Ladung und der Mobilität der Analytione. (Abb.15)

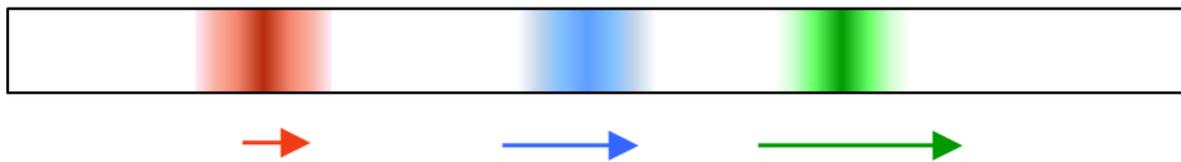


Abb. 15. Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese. Bei der Kapillarzonenelektrophorese CZE bilden sich Zonen mit einer Komponente. Die Zonen bewegen sich aufgrund der Ladung und Mobilität der enthaltenen Analytione unterschiedlich.

Bei der CIEF wird die Kapillare mit einem Elektrolyt gefüllt, der in der Lage ist, über die gesamte Trennstrecke einen stabilen pH-Gradienten auszubilden. Die Analytione ordnen sich an Positionen im Gradienten ein, an denen der pH-Wert des Puffers ihren isoelektrischen Punkten gleich ist und da hier ihre elektrische Nettoladung null ist, wandern nicht weiter. (Abb. 16) Diese Analytione werden dann unter Anlegen eines Druckes aus der Kapillare gespült. Die Kapillarenden tauchen in Gefäße mit unterschiedlichem pH-Wert ein, wobei der niedrige pH-Wert bei der Anoden-, der hohe pH-Wert bei der Kathodenseite liegt. Dies ist aufgrund des fehlenden Auslaßgefäßes in der CE-MS nicht durchführbar.



Abb. 16. Isoelektrische Fokussierung. Bei der isoelektrischen Fokussierung bilden die Analytionen in einem stabilen pH-Gradienten an der Stelle, wo ihr isoelektrischer Punkt dem pH-Gradienten gleich ist, fokussierte, stabile und schmale Zonen.

Bei der Trennung von Peptiden verwendet man bevorzugt die Isotachophorese („stacking Methode“). Bei der ITP werden zwei unterschiedliche Elektrolyte, Leitelektrolyt und Folgeelektrolyt, eingesetzt. Der Leitelektrolyt enthält Ionen hoher, der Folgeelektrolyt Ionen mit geringer Mobilität. Beide Elektrolyte begrenzen den Mobilitätsbereich der Analyse, weil sich nur Probeionen mit dieser Methode trennen lassen, deren Mobilität zwischen denen der Ionen von Leit- und Folgeelektrolyt liegen. Der Analyt wird vor Beginn der Trennung zwischen die beiden Systemelektrolyte geladen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Ionen kurzzeitig mit dem für sie spezifischen Mobilitäten, bis sie sich in schmalen Zonen angeordnet haben, wobei jede Zone nur Ionen gleicher Mobilität enthält. Der aufgrund der Elektrolytanordnung vorliegende, stufenförmige Feldstärkegradient führt nach Erreichen des stationären Zustandes der Trennung zu einer Wanderung aller Ionen mit gleicher Geschwindigkeit, die sich nach der des Leitelektrolyten richtet (Abb. 17).



Abb. 17. Isotachophorese. Bei der Isotachophorese werden zwei unterschiedliche Elektrolyte, Leit- und Folgeelektrolyt, eingesetzt. Zwischen ihnen befinden sich die Probenionen, welche sich aufgrund der zwischen den zwei Elektrolyten aufgebauten stabilen Feldstärkegradienten in schmale Zonen einordnen und hier stabilisiert werden. Die Zonen bewegen sich ohne sich zu vermischen mit der gleichen Geschwindigkeit durch die Kapillare.

Im Gegensatz zu den beiden anderen bereits erwähnten kapillarelektrophoretischen Techniken lassen sich mit dieser Methode in einer Analyse nur Ionen einer Ladungsart trennen, was bei der Peptidtrennung keine Probleme bereitet, so dass die ITP für Peptidanalysen in der CE-MS am besten geeignet ist.

3. Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

Für Zellkulturarbeiten wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) der Invitrogen Cooperation (Berlin, Deutschland) eingesetzt. Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA), Penicillin/Streptomycin (P/S), Fetales Kälberserum (FCS) und Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) wurden von der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) und Lymphocyte Separation Medium (LSM) von PAA (Pasching, Österreich) bezogen. Fibronectin wurde von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und Endothelial Growth Medium (EGM) von Cambrex, US) erhalten. Von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) wurden Aceton, Acetonitril, Chloroform, Ethanol, Isopropanol und Methanol jeweils mit HPLC-Reinheitsgrad sowie Ammoniak (25%) und Salzsäure (30%) erworben. Trifluoressigsäure (Reinheit 99%) war von der Firma J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland). Der Isotope-Coded Protein Label (ICPL™) Kit wurde von der Firma Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) geliefert. Standardproteine, Rinderserumalbumin und Ovalbumin sowie CHAPS (>98% Reinheit) waren von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland).

Chemikalien für die SDS-PAGE waren von Serva (Heidelberg, Deutschland), die Acrylamid 4k-Lösung (40%) war von der Firma Applichem (Darmstadt, Deutschland). Natriumhydroxid, Ammoniumhydrogencarbonat, Coomassie Brilliant Blue, Dithiothreitol und alle andere Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.A von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (München, Deutschland) bezogen.

Alle wässrigen Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Millipore, Schwalbach, Deutschland).

Für allgemeine Laborarbeiten wurden Geräte der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet: Heizblock Thermomixer comfort, Pipetten/Pipettenspitzen, elektronische Pipettierhilfe sowie SpeedVac Concentrator 5301, Centrifuge 5417C und Kühlzentrifuge 5415R. Außerdem wurden die Zentrifugen Biofuge Primo R und Biofuge pico, Heraeus (Kendro, Hanau) benutzt.

3.2 Kultivierung der endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus peripherem Blut ^[36]

Kulturflaschen zur EPC Kultivierung wurden vorbereitet, indem sie mit einer Fibronectin-Lösung von 200 µl pro *well* einer 24-well-Platte, 400µl pro *well* einer 12-well-Platte, 750µl pro *well* einer 6-well-Platte, 1,5 ml pro 6 cm-Schale, 2 ml pro 10 cm-Schale für 45 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C beschichtet wurden. Die Fibronectinbeschichtung sorgt für eine gleichmäßige Haftung der Endothelzellen auf dem Plattenboden.

Frisch entnommenes Vollblut wurde mit Na-Citrat als Antikoagulans versehen und 1:1 mit 2% fetalem Kälberserum (FCS) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Die PBS-Lösung bestand aus 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Phosphat (pH 7,4). Zentrifugenröhrchen wurden mit 20 mL Ficoll gefüllt und mit 25 mL verdünntem Blut vorsichtig überschichtet. Die Röhrchen wurden 10 Minuten bei 800 g, ohne Bremse und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Interphase wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 2% FCS in PBS auf 40 mL aufgefüllt, dann bei 300 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert und das Pellet in 2% FCS in PBS resuspendiert, der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Suspension zuletzt bei 200 g für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend das Pellet in 10 mL endothelialem Wachstumsmedium (EGM) aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Fibronectinlösung wurde von den Schalen vorsichtig entfernt, ohne sie austrocknen zu lassen und die Zellen wurden nach Bedarf ausplattiert (1×10^6 Zellen pro cm^2). Die Kulturen wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre kultiviert und nach 4 Tagen geerntet.

3.3 Kultivierung der MHH-cALL-2 und MHH-cALL-3 Zellen ^[37]

Die MHH-cALL-2 und MHH-cALL-3 Zellen wurden im RPMI 1640 Medium, das 20% FCS enthielt bei 37 °C in einer 5%igen CO_2 - Atmosphäre in 75 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen hatten eine Verdopplungszeit von ca. 100 Stunden und konnten nach 3-4 Tagen im Verhältnis 1:2 gesplittet werden, so dass eine maximale Zelldichte von 3×10^6 Zellen/mL nicht überschritten wurde. Die Zellen wurden zum Einfrieren mit 70% RPMI 1640 Medium, 20% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und mit 5×10^6 Zellen/mL in Aliquoten bei -80°C eingefroren.

3.4 Herstellung von Proteinextrakten

Überschüssiges Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden mit 3 x 5 mL PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 mL Lysis-Puffer (6 M Harnstoff, 2 mM DTT und 50 mM Ammoniumbicarbonat (pH 7,5)) abgeschabt, in ein 1,5 mL-Eppendorf-Gefäß überführt und für 2 Minuten gemischt. Nachdem die Proben für 20 Minuten bei 25 °C und 1000 rpm im Thermomixer geschüttelt wurden, wurden sie mit einem Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) homogenisiert und für 30 Minuten bei 4 °C und 75.000g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand nach Bradford bestimmt. Das Zelllysat wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.5 Proteinbestimmung nach Bradford ^[38]

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Komplexbildung im sauren Milieu von Proteinen mit dem blauen Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblaus G250 von 465 zu 595 nm. Der Komplex entsteht durch die unspezifische Bindung des Farbstoffes an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine, z.B. Arginin, Lysin, Histidin und Tryptophan.

Die Proben für die Bradford-Bestimmung werden folgendermaßen vorbereitet:

2-5 µL	Protein-Lösung (Verdünnung 1:5 oder 1:10)
200 µL	Bradford-Reagenz
	0,06 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250
	3 % (v/v) HClO ₄
800 µL	ddH ₂ O

Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben in Halbmikroküvetten (Sarstedt, Deutschland) überführt und im Photometer (Bio-Rad SmartSpecTM 3000, München, Deutschland) bei 595nm Wellenlänge gemessen. Dabei wurde eine Eichkurve verwendet, die mit BSA von 0 – 20 µg Protein erstellt worden war. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.6 Markierung von Proteinen mit dem Isotope Coded Protein Labeling-Kit (ICPL Kit)

Der ICPL-Kit (Serva GmbH, Heidelberg) wurde nach den Angaben des Herstellers^[30] verwendet. Für eine effiziente Markierung wurde mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/mL gearbeitet. Das Probenvolumen betrug maximal 20 µL. Die Proteinlösung wurde mit 0,5 µL „Reduction Solution“ versetzt und 30 Minuten bei 60 °C reduziert. Inzwischen wurde das „Alkylation Reagent“ in 200 µL „Solution Buffer“ gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit je 0,5 µL der Alkylierungslösung versetzt, in Alufolie eingewickelt und 30 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 mL „Stop Solution 1“ und 15-minütiger Inkubation bei 25 °C gestoppt.

Für die Proteinmarkierung wurde eine Probe mit 3 µL der „leichten“ Isotop-Lösung und die andere Probe mit 3 µL der „schweren“ Isotop-Lösung versetzt. Um Oxidationen zu vermeiden, wurden die Reagenzgefäße mit Stickstoff begast und 10 Sekunden gut gemischt. Nach 1 Minute im Ultraschallbad und Zentrifugation für 2 Minuten bei 10.000 g wurden die Proben 2 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µL „Stop Solution 2“ und 20 Minuten Inkubation bei 25 °C gestoppt. Nach der Vereinigung der Proben wurde 2 µL 2 M NaOH zugegeben, um mögliche Veresterungsprodukte zu zerstören. Nach 20 Minuten wurde die Lösung durch Zugabe von 2 µL 2 M HCl neutralisiert. Anschließend wurde eine Aceton-Fällung durchgeführt. Dazu wurde zu der neutralisierten Probenlösung das gleiche Volumen Wasser und anschließend ein 5facher Überschuss an Aceton (-20°C) zugegeben und über Nacht im Tiefkühlfach bei -20°C belassen. Am nächsten Tag konnten die ausgefallenen Proteine bei 20.000 g und 4 °C für 30 Min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 100 µL eiskaltem 80%igem Aceton überschichtet, kurz geschwenkt und dann für 5 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Das präzipitierte Protein wurde bei -20 °C aufbewahrt oder direkt für die weiteren Versuche eingesetzt.

3.7 Chloroform / Methanol-Fällung^[39]

Zur Proteinlösung wurden 4 Volumen Methanol und 1 Volumen Chloroform gegeben, die Probe wurde geschüttelt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge Pico, Heareus) wurde die obere Phase abgenommen und die untere Phase mit drei Volumen Methanol versetzt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Das präzipitierte Protein kann entweder trocken eingefroren

werden oder im entsprechenden Puffer aufgenommen und für weitere Analysen verwendet werden.

3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Um Proteine zu trennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit dem Laemmli Puffersystem eingesetzt^[40].

Trenn- und Sammelgele wurden nach den in Tabelle 1 beschriebenen Vorgaben hergestellt. Für die Elektrophorese wurde die Proteinlösung in 20 µL Laemmli Probenpuffer gelöst (0,625M Tris (pH 6,8), 20% SDS, 20 % Glycerin und 0,2% (w/v) Bromphenolblau, vor der Benutzung werden frisch 10% 1M DTT zugeben) und zur Denaturierung für 10 Minuten bei 95° C inkubiert. Je nach Reaktionsbedingungen wurden die Proteine durch Zugabe von 1-4 µL 40% Acrylamid und 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur modifiziert, um freie Cysteinreste zu alkylieren. Proteine wurden mit folgenden Spannungen getrennt: 60 V für 5 Minuten, 100 V für 25 Minuten und 200 V für ca. 2 Stunden. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau R-250 in 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure gefärbt und in 20 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt, bis der Hintergrund farblos war.

Gelzusammensetzung	5 %	7,5 %	15 %
30%:0,8% (w/v)			
Acryl/Bisacrylamid [mL]	1,67	2,5	5
0,5 M Tris/HCl pH 6,8 [mL]	2,5	-	-
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 [mL]	-	2,5	2,5
ddH ₂ O [mL]	5,69	4,85	2,5
10 % SDS [µL]	100	100	100
10 % APS [µL]	50	50	50
TEMED [µL]	10	5	5

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgele

Die Dokumentation von Gelen wurde mit der Kodak Image Station 440 CF (Eastman Kodak, Rochester, USA) durchgeführt.

3.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Hierzu wurden 18 cm Gelstreifen (Immobiline DryStrips, GE Healthcare) mit einem immobilisierten nichtlinearen pH-Bereich 3-10 über Nacht nach Angaben des Herstellers im Rehydrierungspuffer inkubiert. Danach wurden bis zu 250 µg Protein auf einen Gelstreifen aufgetragen, die mit dem IPGphor isoelektrischem Fokussiersystem (GE Healthcare) bei einer Stromstärke von 0,05 mA pro IPG Streifen bei 60 kVh und 20 °C getrennt wurden.

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstreifen im Equilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 30% Glycerol, 2% SDS and 0.01% Bromphenolblau) mit 0,1% DTT für 15 Minuten equilibriert. Der Puffer wurde entfernt und der gleiche Puffer, dem 4,8% Jodacetamid anstelle von DTT zugesetzt worden war, wurde auf den Gelstreifen gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Die behandelten Streifen wurden auf ein 10%iges SDS Acrylamidgel platziert und mit 0,5% (w/v) Agarose fixiert. In der zweiten Dimension wurden die Proteine mit dem EttanDALTsix vertical electrophoresis system (GE Healthcare) getrennt. Der Lauf wurde bei 10 °C solange durchgeführt, bis das Bromphenolblau gerade aus dem Gel gelaufen war. Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliantblau (s.o.) gefärbt und fixiert.

3.10 Enzymatische Spaltung von Proteinen in einer Polyacrylamidmatrix

Nach elektrophoretischer Trennung und Coomassie-Färbung können Proteine direkt in der Polyacrylamidmatrix gespalten werden. Dafür wurden die zu analysierende Banden mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und zunächst zweimal in 250 µL 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen, danach in 100 µL 50% Acetonitril, 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei 37 °C und 300 rpm entfärbt. Ggf. wurde dieser Schritt 2-3 mal wiederholt. Anschließend wurden die Gelstücke mit 100 µL 100% Acetonitril 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, das restliche Acetonitril wurde in der SpeedVac entfernt. Für die enzymatische Spaltung wurden 10 ng/µL Trypsin (Trypsin Gold, Promega, Mannheim, Deutschland) in 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit 10 % Acetonitril angesetzt. Pro Gelstück wurden ca. 20 µL Trypsin-Lösung zugegeben. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde die überschüssige Trypsin-Lösung entfernt, die Gelstücke mit 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit 10 % Acetonitril bedeckt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Peptidextraktion wurden die Gelstücke zunächst mit 10 % Acetonitril und

0,5 % TFA für 10 Minuten, dann mit 10 % Acetonitril und 0,2 % TFA für 30 min inkubiert. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach jeder Inkubation wurden die Überstände abgenommen und vereinigt. Anschließend wurde die Lösung in der SpeedVac getrocknet. Die Peptide wurden entweder bei -20 °C gelagert oder für die direkte Analyse in 5 µL 10 % (v/v) Acetonitril, 0,2 % (v/v) TFA für die CE-Trennung gelöst.

3.11 Peptidtrennung mittels Kapillarelektrophorese

Für die Trennung der Peptide wurde eine 85 cm lange, (ID 75µm) nicht beschichtete Quarzglas-Kapillare (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) verwendet, die in das P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System der Firma Beckman Coulter (USA) eingebaut wurde. Vor Benutzung wurde die Kapillare mit 100 mM NaOH für mindestens 15 Minuten bei 20 psi equilibriert, dann wurde mit Wasser (10 min 20 psi) das restliche NaOH aus der Kapillare entfernt und anschließend mit dem CE Puffer (0,5 M Ameisensäure, 10% Acetonitril) gefüllt und ausgiebig gespült. Hierbei war besonders darauf zu achten, dass kein NaOH in das Massenspektrometer gelangte.

Die Trennung der Peptide erfolgte mit einer isotachophoretischen „Stacking“-Methode^[41]: Es wurden 100 nl 1,5 M NH₃, gefolgt von 220 nl Probe und 100 nl Ameisensäure (1 M) mit Druck in die Kapillare gefüllt und dann die Trennung mit 10-30kV durchgeführt. Bei 30kV baute sich eine Stromstärke von ca. 25 µA in der Kapillare auf, welche sich während des Laufs bis auf 50-70 µA erhöhte und nach dem „stacking“ bei ca. 45 µA konstant blieb. Somit konnte ein relativ hohes Probenvolumen eingefüllt und eine Trennung der Peptide in ca. 30 min erreicht werden.

3.12 Elektrospray-Ionisierung(ESI) und Ionenfallen-Massenspektrometrie

Der Ausgang der Kapillare wurde an die ESI-Quelle des Ionenfallen-Massenspektrometers (Esquire 3000^{plus}, Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)) mit Hilfe eines coaxialen CE-Spraykopfes (Agilent Technologies, (Santa Clara, USA)) angeschlossen. Die Kapillare befand sich in einer Stahlnadel und ragte an der Spitze einen halben Kapillardurchmesser hervor. Als „sheath-liquid“ wurde ein Isopropanol-Wasser Gemisch (50/50) verwendet, das von einer Spritzenpumpe (Cole-Parmer) mit einem Fluß von 0,2 ml/h gefördert wurde und in der Umhüllung der Kapillare bis zum Kapillarende transportiert und dort gemeinsam mit dem

Eluat der Kapillare versprüht wurde. Das Elektrospray wurde von einem konstanten Stickstoff-Nebuliser-Gasstrom (5 L/min) stabilisiert. Die Ionisierungsspannung der Quelle wurde auf 4500V eingestellt und das Trockengas auf 250 °C mit einem Druck von 5 psi. Die Spektren wurden mit einer Scangeschwindigkeit von 13.000 m/z per Sekunde gesammelt. Im positiven Ionenmodus wurden Massenspektren zwischen 50-2.000 m/z aufgezeichnet. Bei ausreichender Signalstärke (Peakintensität über 40.000 counts) wurden die intensivsten Massen für eine MS/MS Messung in der Ionenfalle isoliert und fragmentiert. Um die Anzahl der MS/MS Spektren zu erhöhen, wurden aus einem MS Spektrum immer nur zwei Precursormassen ausgewählt, welche dann für 1 Minute von weiteren Analysen automatisch ausgeschlossen wurden (*active exclusion*). Für die Kalibrierung des Massendetektors wurde ein Tuning Mix verwendet (Agilent, USA), welcher stabile Massen enthielt (m/z 622.03, 922.01, 1521.97, 2121.93, 2721.89). Für die Kalibrierung wurde der Tuning Mix mit einer Acetonitrillösung (90% AcN, 10% H₂O) 1:20 verdünnt.

Die Aufnahme und Auswertung der gewonnenen MS-Daten erfolgte mit den Software-Paketen EsquireControl (Version 5.1), DataAnalysis (Version 3.0) und BioTools (Version 3.0) (Bruker Daltonik). Für die Proteinidentifikation wurde die Mascot-Software (Version 2.1) mit einer implementierten MSDB Datenbank (Matrix Science, London, UK) verwendet. Alle Proteine mit einem Mascot Score über 40 und mehr als einem zugeordneten Peptid wurden als identifiziert angesehen. Die Falsch-Positiv-Grenze wurde mittels einer random decoy MSDB Datenbank bestimmt und lag bei Score 40. Es wurde vor und nach jeder täglichen Messreihe eine standardmäßig verdaute BSA-Probe (3,2 pMol) als Qualitätskontrolle gemessen.

3.13 Peptidstandardmix

Der Peptidstandard (Part-No. #206195, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) enthielt sieben bekannten Peptide und wurde für die Kalibration der Massenpositionen bei *time-of-flight* Massenspektrometern verwendet, aber auch um chromatographische Trennmethoden zu testen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Peptidstandard

Peptidname	[M+H]⁺ monoisotopische Masse
Angiotensin I	1046.54
Angiotensin II	1296.68
Substance P	1347.74
Bombesin	1619.82
ACTH clip 1-17	2093.09
ACTH clip 18-39	2465.20
Somatostatin 28	3147.47

4. Experimente und Ergebnisse

4.1 Vorversuche

In dieser Arbeit sollte ein Analysesystem bestehend aus Kapillarelektrophorese (CE) und Ionenfallen-Massenspektrometer mit Elektrosprayionisierung (ESI-IT-MS) etabliert werden, das optimal für die Proteomanalyse geeignet ist. Diese kaum verbreitete Kombination (CE-MS) einer hochauflösenden Trenntechnik mit einem MS/MS-fähigen Massenspektrometer wurde dann zur Untersuchung unterschiedlicher biologischer Systeme eingesetzt. Proteine wurden aus den Proben extrahiert und zunächst mittels ein- bzw. zwei-dimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese (1D bzw. 2D PAGE) voneinander getrennt. Daran schloss sich ein tryptischer Verdau der Proteine und die Trennung und Analyse der Peptide in CE und ESI-IT-MS an. Zunächst wurden die experimentellen Bedingungen in der CE und in dem Massenspektrometer für die Proteinidentifizierung optimiert.

4.1.1 Optimierung der Peptidtrennung in der Kapillarelektrophorese

Zum Testen der Trenneigenschaften der Kapillarelektrophorese wurden entweder einzelne Peptide, der Bruker Peptidstandard (s. 3.13) oder aber ein selbst hergestellter tryptischer BSA-Verdau eingesetzt. Als Parameter wurde zuerst die Länge der CE Trennkapillare optimiert. Die Mindestlänge der Trennkapillare betrug aufgrund der Positionierung der beiden Instrumente 70 cm. In eine längere Kapillare kann ein höheres Probenvolumen geladen werden. Wird sie aber zu lang, werden die Diffusionseffekte verstärkt und die resultierende Peaks werden breiter. Als Optimum wurde eine Kapillarlänge von 85 cm bestimmt, mit der alle folgenden Experimente durchgeführt wurden. Von den eingesetzten Kapillaren standen Durchmesser von 50, 75 und 100 μm zur Verfügung. Die Kapillare mit 75 μm Durchmesser war optimal für die Peptidtrennung geeignet, da mit einem größtmöglichen Beladungsvolumen die beste Trennschärfe erzielt wurde.

Die Trennung in der Kapillarelektrophorese kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die isotachophoretische „*stacking*“-Trennmethode (s. 3.11) verbesserte die Trennleistung und Kapazität der CE beträchtlich (Abb. 18) gegenüber der Trennung mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE, siehe 2.7). Dabei wurde das Prinzip der Isotachophorese genutzt. Als

Leitelektrolyt diente eine 1M Ammoniaklösung. So konnte das 10fache Probenvolumen (bis zu 218nl bei 75µm Durchmesser und 85cm Länge) in die Kapillare geladen werden.

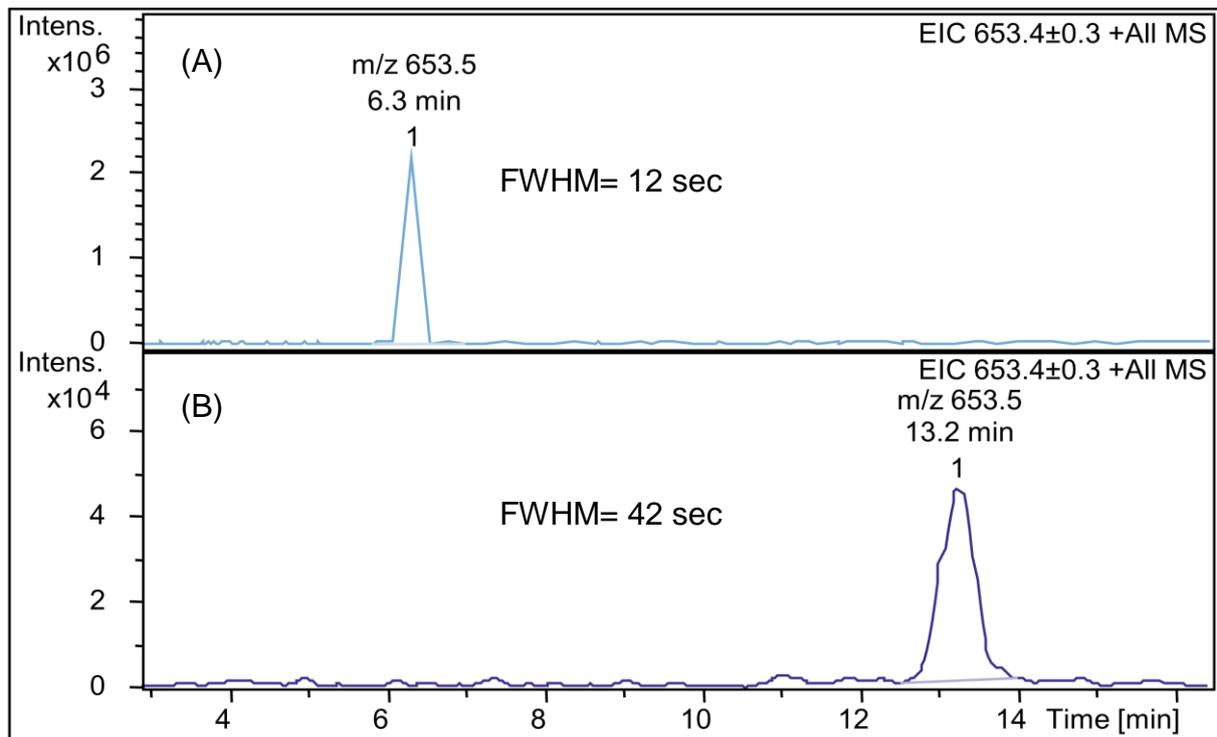


Abb. 18: Effekte des Stacking-Methode auf die Peptidtrennung. Ein Peptid der Masse 653.4 m/z wurde in der CE bei 30 kV Trennungsspannung ohne (A) bzw. mit „stacking Schritt“ (B) getrennt. Die Kapillare war an ein ESI-Ionenfallen-MS angeschlossen und das EIC der Masse 653.4 m/z ist dargestellt.

Als Beispiel ist hier das *extracted ion chromatogram* (EIC) eines Peptides der Masse 653.4 m/z aus dem BSA Verdau dargestellt, welcher einmal mit und einmal ohne *stacking* getrennt wurde. Mit der *stacking* Methode verringerte sich der FWHM Wert („full width at half maximum“: Peakhöhe / Peakbreite in halber Höhe) um den Faktor 3,5.

Bis zu 10% der Kapillare konnten mit Probe gefüllt werden, ein größeres Probenvolumen verschlechterte die Peptidtrennung in der CE erheblich (Abb. 19) Zusätzlich konnte durch die effektivere Peptidtrennung, schärferer Peaks und höhere Signalintensitäten eine bessere MS-Messung erfolgen, die insgesamt in einem höheren Mascot Protein Score resultierte.

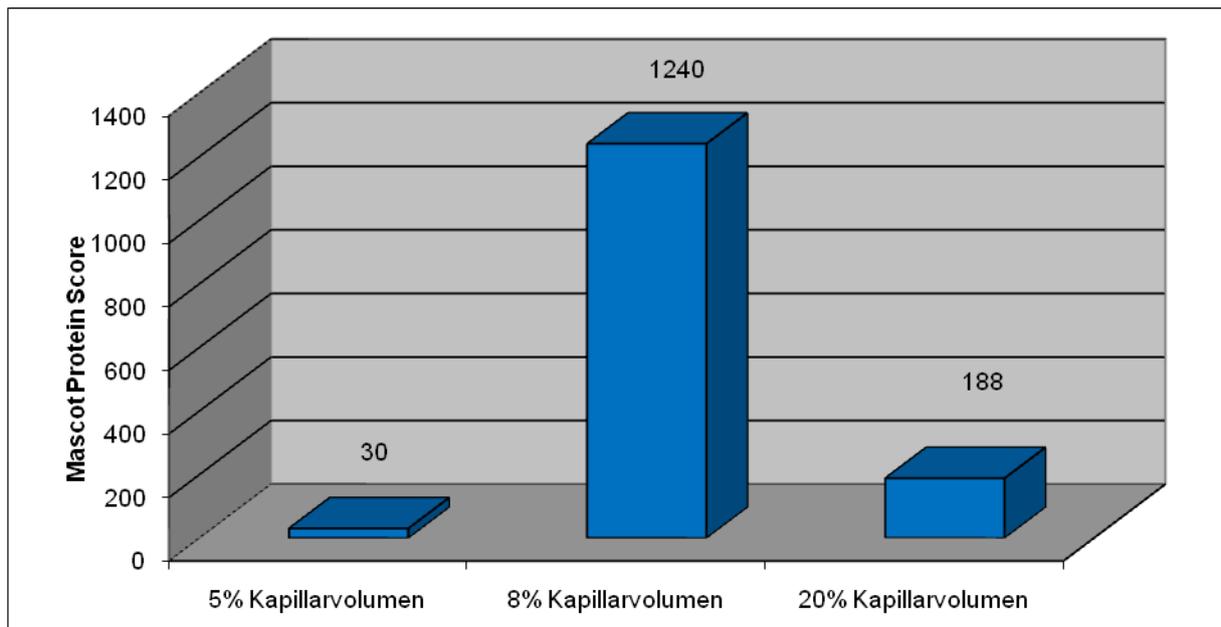


Abb. 19: Effekt der Kapillarfüllung auf die Identifizierungsrate eines Standardproteins. Tryptisch verdautes BSA wurde bei unterschiedlich beladener Kapillare in der CE mittels *stacking*-Methode getrennt und die Peptide wurden im Ionenfallen-Massenspektrometer unter Standard-Bedingungen analysiert. Die Daten wurden mit der MSDB Proteinsequenzdatenbank verglichen. Der Mascot Protein Score ist in Abhängigkeit des Probenvolumens in der Kapillare angegeben.

Weiterhin wurde die Trennungsspannung in der Kapillarelektrophorese optimiert. Dabei wurde nicht nur auf eine optimale Trennung in der CE geachtet, sondern auch die Analysegeschwindigkeit des Massenspektrometers berücksichtigt. Eine niedrigere angelegte Spannung (10kV) resultierte in einem niedrigeren Stromfluß durch die Kapillare und die Peptide eluierten langsamer, d.h. die Peptidpeaks wurden breiter. Dies gab dem Massenspektrometer mehr Zeit, um mehrere Spektren eines Peaks aufzunehmen. Allerdings waren so die Peptide nicht optimal voneinander getrennt und die Peptidpeaks überlappten sich. Eine Erhöhung der Trennungsspannung auf 30 kV (Gerätemaximum) führte zu einem höheren Stromfluß und schärferen Peptidpeaks. Die Ionenfalle ist schnell genug, um alle Peptide zu identifizieren (Abb. 20.). Daher wurde in allen folgenden Experimenten mit der maximal möglichen Spannung von 30 kV zur Trennung gearbeitet. Weiterer Vorteil war die auf ein Drittel verkürzte Messzeit von 30 Minuten, inklusive der Regeneration der Kapillare, gegenüber 90 Minuten beim Einsatz von 10 kV Trennungsspannung.

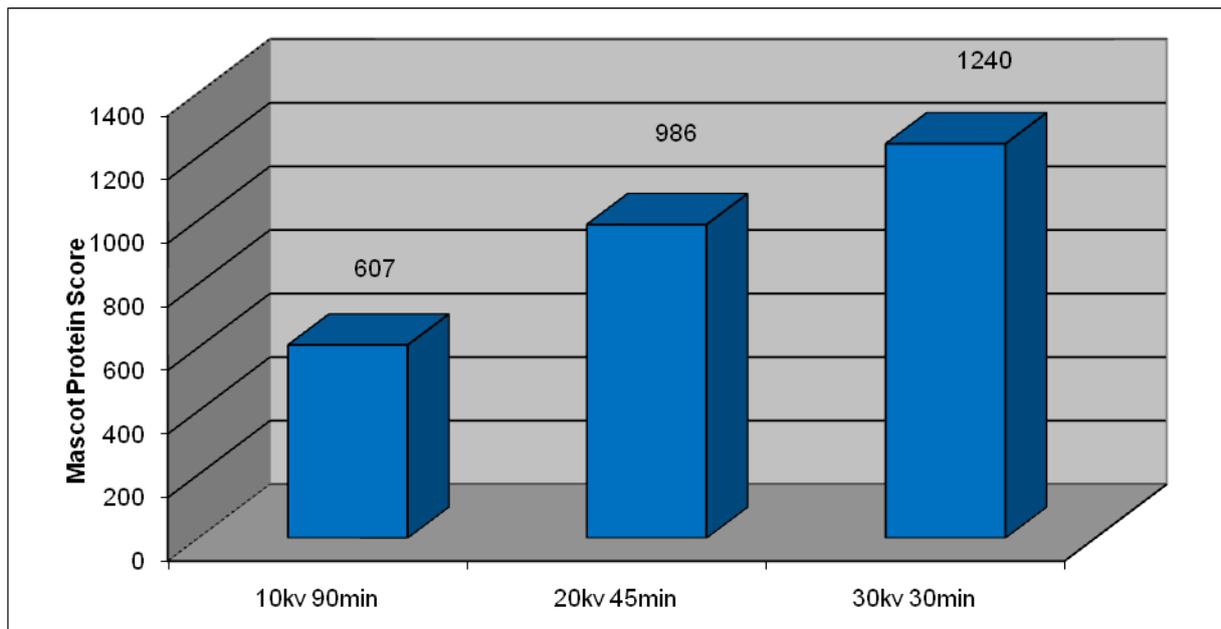


Abb. 20: Einfluß der Trennungsspannung auf die Qualität der Identifizierung eines Standardproteins. Tryptisch verdautes BSA wurde bei unterschiedlichen Spannungen in der CE mittels *stacking*-Methode getrennt und die Peptide wurden im Ionenfallen-Massenspektrometer unter Standard-Bedingungen analysiert. Die Daten wurden mit der MSDB Proteinsequenzdatenbank verglichen. Der Mascot Protein Score ist in Abhängigkeit der Trennungsspannung angegeben.

Durch das Kühlsystem der Kapillare war es möglich, die Temperatur in der Kapillare konstant einzustellen. Lediglich der Teil, der sich im Spraykopf des Massenspektrometers befand, konnte nicht temperiert werden und seine Temperatur erhöhte sich auf ca. 40°C. Vorversuche zeigten, dass eine möglichst niedrige Kapillartemperatur zu geringeren Diffusionseffekten und somit zu schärferen Peptidpeaks führte. Die niedrigstmögliche Temperatureinstellung des Kapillarelektrophoresegerätes war 15 °C und wurde in allen nachfolgenden Experimenten angewendet.

4.1.2 MS Optimierung

Für die Ionenquelle des Massenspektrometers wurde ein CE-ESI-Spraykopf der Fa. Agilent verwendet. Die Kapillare wurde so justiert, dass sie ca. 0,5 mm aus der im Spraykopf befindlichen Stahlnadel hervorragte. Die *sheath*-Flüssigkeit bestand aus einem Isopropanol/Wasser (50 : 50) Gemisch und diente der Unterstützung eines optimalen Sprays. Eine CE liefert Flussraten von ca. 2 nl/min, womit kein stabiles Spray eingestellt werden kann. Durch Zusatz von 1% Ameisensäure in der *sheath*-Flüssigkeit wird die Auswahl an verfügbaren Ladungen im Elektrospray erhöht und die Ionisierung der Peptide konnte damit

leicht verbessert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Ameisensäure zu einer starken Korrosion in der Förderspritze und somit zu intensiven Kontaminationssignalen im Massenspektrum führte. Da der Vorteil des Ameisensäure-Zusatzes sich nicht auf der Ebene der Identifizierungsqualität zeigte, wurde darauf in den hier beschriebenen Experimenten verzichtet (Abb. 21). Anhand der Messergebnisse wurde 0,2 ml/h als optimale Flußrate bestimmt.

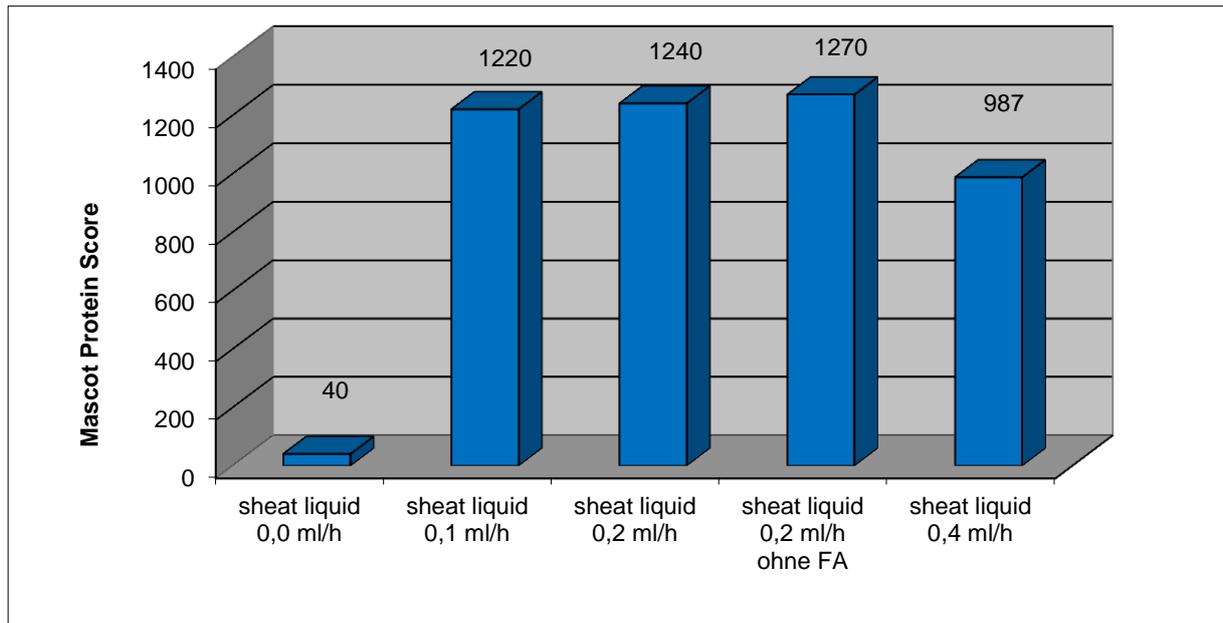


Abb. 21: Einfluß der Sheath-Flüssigkeit bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten und Ameisensäure-Konzentration auf die Identifizierungsrate eines Standardproteins. Tryptisch verdautes BSA wurde bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten (0,1- 0,4 mL/h) der *Sheath*-Flüssigkeit mit und ohne Ameisensäure in der CE mittels *stacking*-Methode getrennt und die Peptide wurden im Ionenfallen-Massenspektrometer unter Standard-Bedingungen analysiert. Die Daten wurden mit der MSDB Proteinsequenzdatenbank verglichen. Der Mascot Protein Score ist in Abhängigkeit der Flußrate angegeben.

Entscheidend für die Peptididentifizierung neben der Generierung der Ionen in der Ionenquelle ist der Transfer der gebildeten Peptidionen in die Ionenfalle. Das Trockengas wurde in Hinsicht auf Temperatur und Druck optimiert, um das in die Glaskapillare eintretende Lösungsmittel zu entfernen. Ebenso wurden die Geräteeinstellungen an der Kapillarspannung, den Oktopolen, dem Skimmer und alle weiteren notwendigen Parameter für den vollständigen Transfer der Peptidionen optimiert. Als Beispiel ist der Einfluss der Kapillarspannung auf die Qualität der Analyse eines Peptidgemisches gezeigt (Abb. 22). Demnach ergab die Spannung von 4500V die besten Resultate.

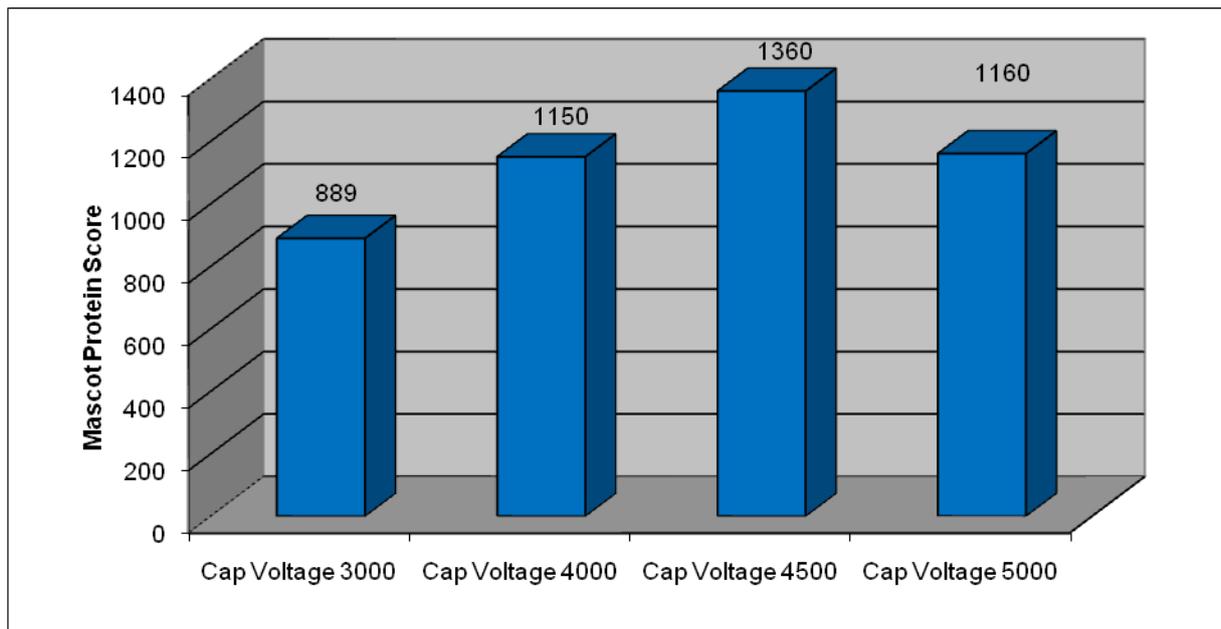


Abb. 22: Einfluss der Kapillarspannung auf die Identifizierungsrate eines Standardproteins. Tryptisch verdautes BSA wurde in der CE mittels *stacking*-Methode getrennt und die Peptide wurden im Ionenfallen-Massenspektrometer unter AutoMS2-Bedingungen analysiert. Die Daten wurden mit der MSDB Proteinsequenzdatenbank verglichen. Der Mascot Protein Score ist in Abhängigkeit der Kapillarspannung angegeben.

Ebenso konnten mehrere Einstellungen für die Ionenfalle selbst optimiert werden. Als Beispiel wird hier der Effekt der unterschiedlichen *Ion Charge Control* Werte gezeigt. Bei diesem Parameter handelt es sich um eine automatisierte Regelung der Akkumulationszeit der Ionen in der Ionenfalle. Bei einem zu niedrigen ICC Wert werden weniger Ionen in die Falle geladen und durch die nicht ausreichende Statistik liefert der Detektor eine unzureichende Qualität der Signale. Eine zu hohe Einstellung führt jedoch zu einer Überladung der Ionenfalle. Hohe Peakbreiten, Verschiebung der Massenposition in höhere m/z Werte und der komplette Verlust der Isotopenauflösung sind die daraus resultierende Effekte. Eine mittlere Einstellung (ICC = 40 000 für das Esquire3000^{plus}) zeigte optimale Ergebnisse (Abb. 23.).

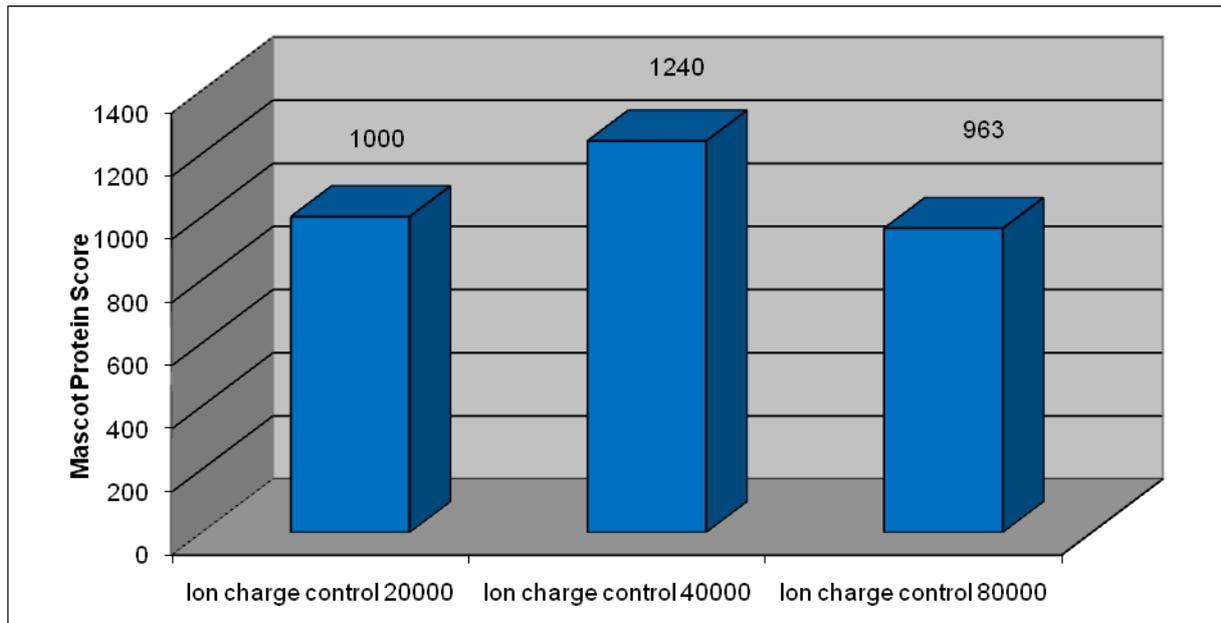


Abb. 23: Effekt der Füllung der Ionenfalle auf die Identifizierungsrate eines Standardproteins. Tryptisch verdautes BSA wurde in der CE mittels stacking-Methode getrennt und die Peptide wurden im Ionenfallen-Massenspektrometer unter Standard-Bedingungen analysiert. Die Daten wurden mit der MSDB Proteinsequenzdatenbank verglichen. Der Mascot Protein Score ist in Abhängigkeit des eingestellten ICC Target-Wertes angegeben.

Aus dem MS Spektrum wurden automatisch diejenigen Signale für die MS/MS Messung herangezogen, deren Intensitäten oberhalb eines bestimmten Intensitätswertes lagen, mindestens doppelt geladen waren und sich nicht auf der aktuellen *active exclusion list* befanden. Die *active exclusion list* ist eine dynamische Liste, auf die automatisch bereits für MS/MS ausgewählte Precursor Massen geschrieben werden. Dies bewirkt, dass in den MS Spektren auch diejenige Signale einer MS/MS Fragmentierung unterzogen werden, deren Intensität nicht zu den zwei intensivsten in dem jeweiligen MS Spektrum gehören. So werden auch niedrigabundante Signale oder eventuelle überlappende Peptidpeaks analysiert. Die Parameter in der Steuersoftware des Massenspektrometers wurden so gewählt, dass nach zwei MS/MS Messungen einer Precursormasse (jeweils 2 MS/MS Spektren wurden dazu gemessen, gemittelt und gespeichert) für ein Zeitfenster von einer Minute von der erneuten Messung ausgeschlossen wurde.

Aus jedem MS Spektrum konnten mehrere Massen in der Ionenfalle isoliert und nacheinander im MS/MS-Modus analysiert werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass jeder Isolierungs- und Fragmentierungsschritt die Zeit verlängert, bis erneut ein MS Spektrum aufgenommen wird (ca. 700 ms bei einem Scanbereich von 100-3000 m/z und einer Scangeschwindigkeit von 13 000 m/z/sec, zusätzlich den instrumentell bedingten Isolations-

und Fragmentierungszeiten (70 ms und 40 ms). Bei einer Precursormasse pro MS Spektrum wurden überlappende und koeluiierende Peptide nicht vollständig detektiert. Optimale Messungen wurden jedoch erzielt, wenn pro Spektrum zwei Vorläufermassen ausgewählt wurden (Abb. 24). Die Auswahl von mehr als zwei Massen pro Spektrum brachte keine Verbesserung mehr (Daten nicht gezeigt). Der Schwellenwert wurde auf eine Intensität der MS-Signale zur Auswahl für MS/MS-Messungen von 40.000 counts eingestellt. Der Bereich unter 400 m/z, welcher hauptsächlich Hintergrund- und Verunreinigungsmassen enthielt, wurde von der Precursor-Selektion ausgeschlossen.

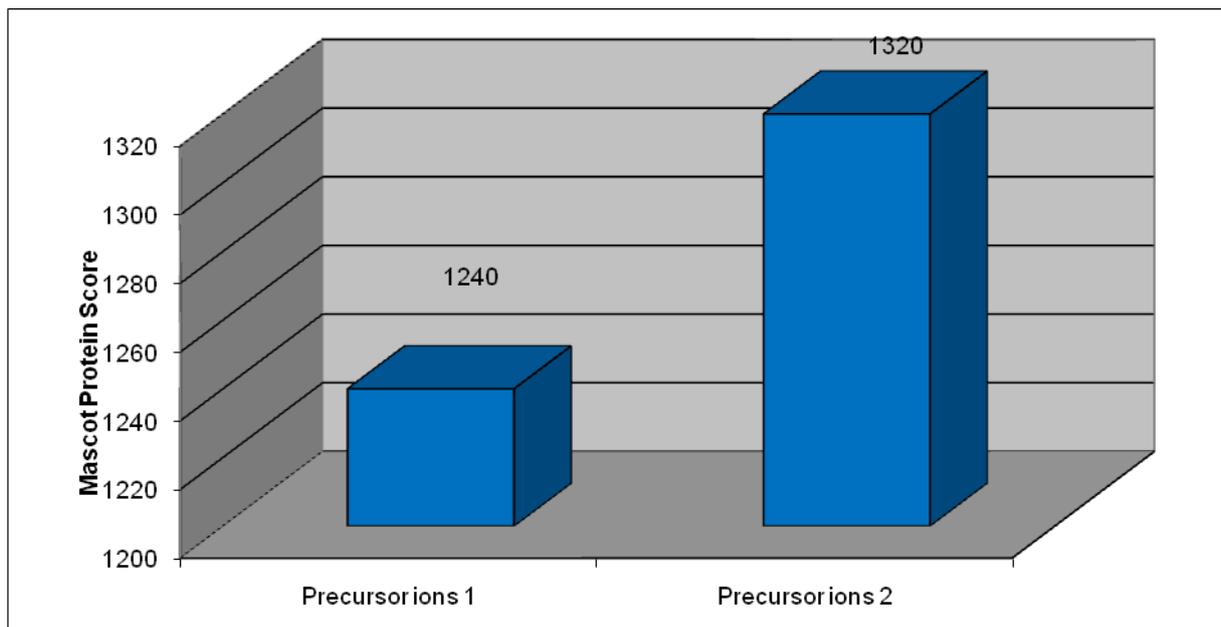


Abb. 24: Effekt der Anzahl der Vorläufermassen im MS-Modus auf die Identifizierung. Tryptisch verdautes BSA wurde der CE mittels stacking-Methode getrennt und die Peptide wurden im Ionenfallen-Massenspektrometer unter Standard-Bedingungen analysiert. Die Daten wurden mit der MSDB Proteinsequenzdatenbank verglichen. Der Mascot Score ist in Abhängigkeit von der Vorläufermassenanzahl angegeben.

Die MS Spektrum-Information, welche u.a. die genaue Masse der Peptide liefert, wird bei einem ESI-Ionenfallengerät mit ± 0.3 Da Genauigkeit ermittelt. Falls das Peptidsignal im Spektrum doppelt geladen war, beträgt die Massengenauigkeit des Peptides somit ± 0.6 Da. Dies ist für die eindeutige Identifizierung der Peptide auf keinen Fall ausreichend. Daher ist es notwendig, in einer MS/MS-Fragmentierung die Aminosäuresequenz zu bestimmen. Die Ionenfallen-Technologie bietet darüber hinaus die Möglichkeit der MS^n -Messungen, wobei n bei der Esquire3000^{plus} im AutoMSn Modus von 2-5 eingestellt werden kann. Eine $MS^{n>2}$ Messung verbesserte die Peptidmessungen nicht weiter, da bereits im MS/MS-Modus ausreichend Information zur Aminosäuresequenzbestimmung erhalten wurden und jeder weitere MS^n Arbeitszyklus die Messzeit verlängerte (Abb. 25).

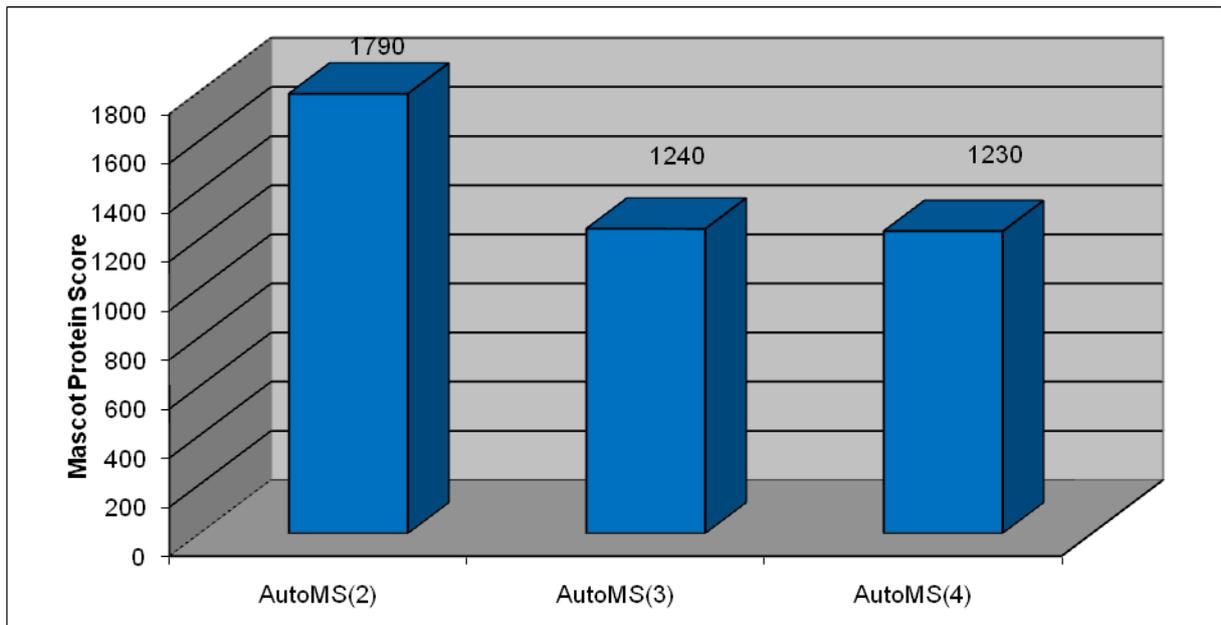


Abb. 25: Effekt der MSⁿ-Stufe auf die Identifizierungsrate eines Standardproteins. Tryptisch verdautes BSA wurde in der CE mittels stacking-Methode getrennt und die Peptide wurden im Ionenfallen-Massenspektrometer unter Standard-Bedingungen analysiert. Die Daten wurden mit der MSDB Proteinsequenzdatenbank verglichen. Der Mascot Protein Score ist in Abhängigkeit der MSⁿ-Stufe angegeben. Die Benennung „Auto“ wurde hier gewählt, da es sich um Intensität- und Datenabhängige Fragmentierungszyklen handelt, so daß die ausgewählte MSⁿ Maximalstufe nicht zwangsläufig immer erreicht wurde.

Für die CID-Fragmentierung der Precursormassen wurden Fragmentierungsamplituden von 1,00V bis 5,00V getestet, mit einem Optimum bei 3,50V. (Daten nicht gezeigt)

Mit den so optimierten Bedingungen für die CE-Ionenfallen-MS-Kopplung wurden 50 fMol / Peptid eines Standard-Peptidgemisches analysiert (Abb. 26). Alle Peptide konnten eindeutig mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Die identifizierten Ionenspezies sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Nachweisgrenze eines Peptides aus dem Standardgemisch lag bei 20 fMol (Daten nicht gezeigt)..

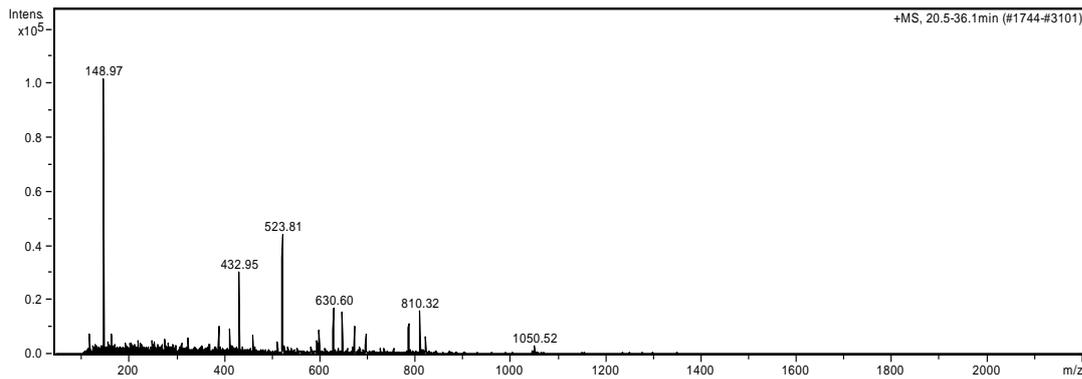


Abb. 26: MS Spektrum des Standardpeptidgemisches. Ein Standardpeptidgemisch mit den in Tabelle 2 aufgelisteten Massen wurde in der Kapillarelektrophorese getrennt und im IT-MS analysiert.

Tabelle 3: identifizierte Massen des Peptidstandardmixes (CE-ESI, 30kV, 75µm).

Peptid	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+4H] ⁴⁺	[M+5H] ⁵⁺
Angiotensin II	1046,54	523,77			
Angiotensin I	1296,68	648,84	432,89		
Substance P	1347,73	674,37			
Bombesin		810,41			
ACTH clip 1-17		1047,04	698,36		
ACTH clip 18-39		1233,10	822,40		
Somatostatin 28			1049,82	787,62	630,29

Mit den optimierten Bedingungen konnte der routinemäßig zur Gerätevalidierung eingesetzte 70fmol BSA-Verdau ideal gemessen werden, so dass Mascot Protein Scores von ca. 500 (± 100) und auf MS/MS basierende Aminosäuresequenzabdeckungen des Proteins um 50% erzielt wurden.

Ein ausgewählter CE-MS-Lauf von BSA, der unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurde ist in der Abb. 27-29 gezeigt. Zunächst wurde über den CE-Lauf die EIC der dem BSA zugeordneten Peptide gezeigt (Abb. 27). Sie verteilen sich exzellent über den gesamten CE-Lauf von ca. 40 min. Ein ausgewähltes zweifach positiv geladenes Peptidsignal und das dazu gehörende MS/MS-Spektrum sind in Abb. 28 gezeigt. In Abb. 29 sind die Angaben der Datenbanksuche zusammengefasst, wie sie von der Mascot-Suchmaschine ausgegeben werden. Der Gesamt-Score und die Sequenzabdeckung stehen bei dieser Art der Abbildung im Vordergrund.

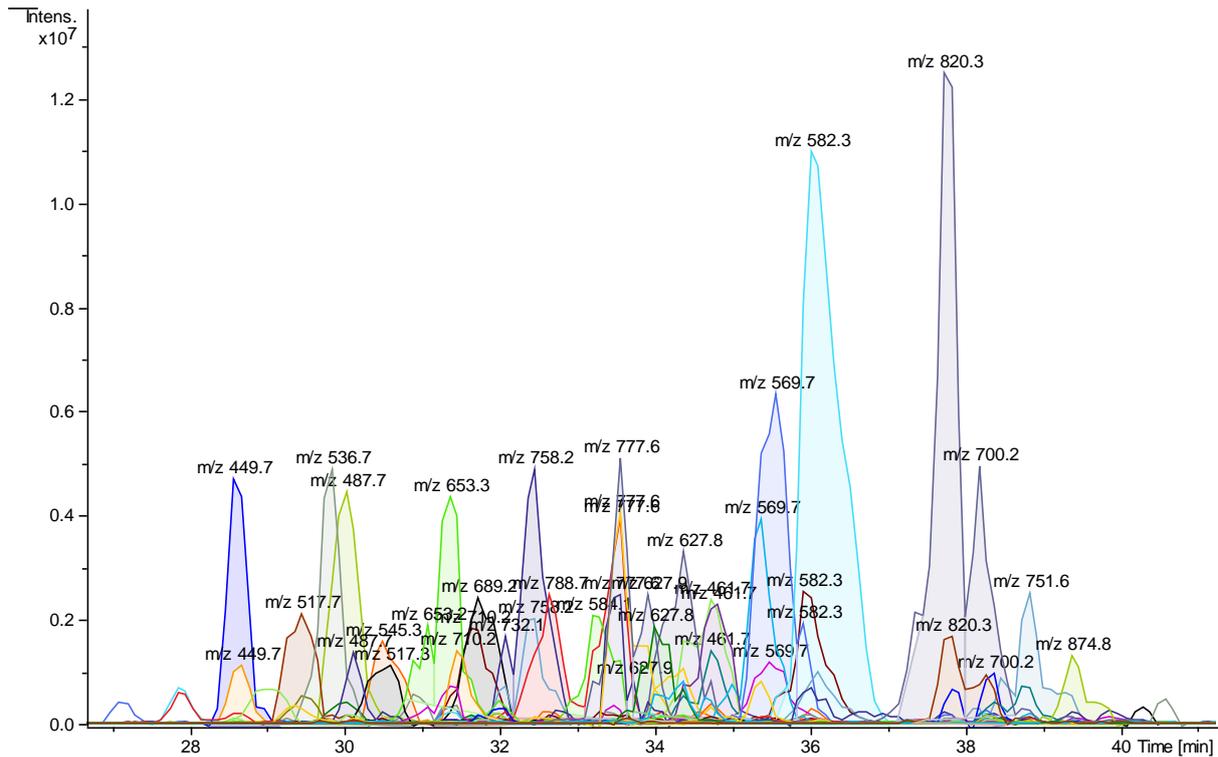


Abb. 19: Extracted Ion Chromatogramme aller identifizierten Peptide von BSA (70fmol injiziert). Die einzelne Spuren zeigen die von Mascot gefundene Peptidmassen mit einer Massentoleranz von ± 0.3 Da.

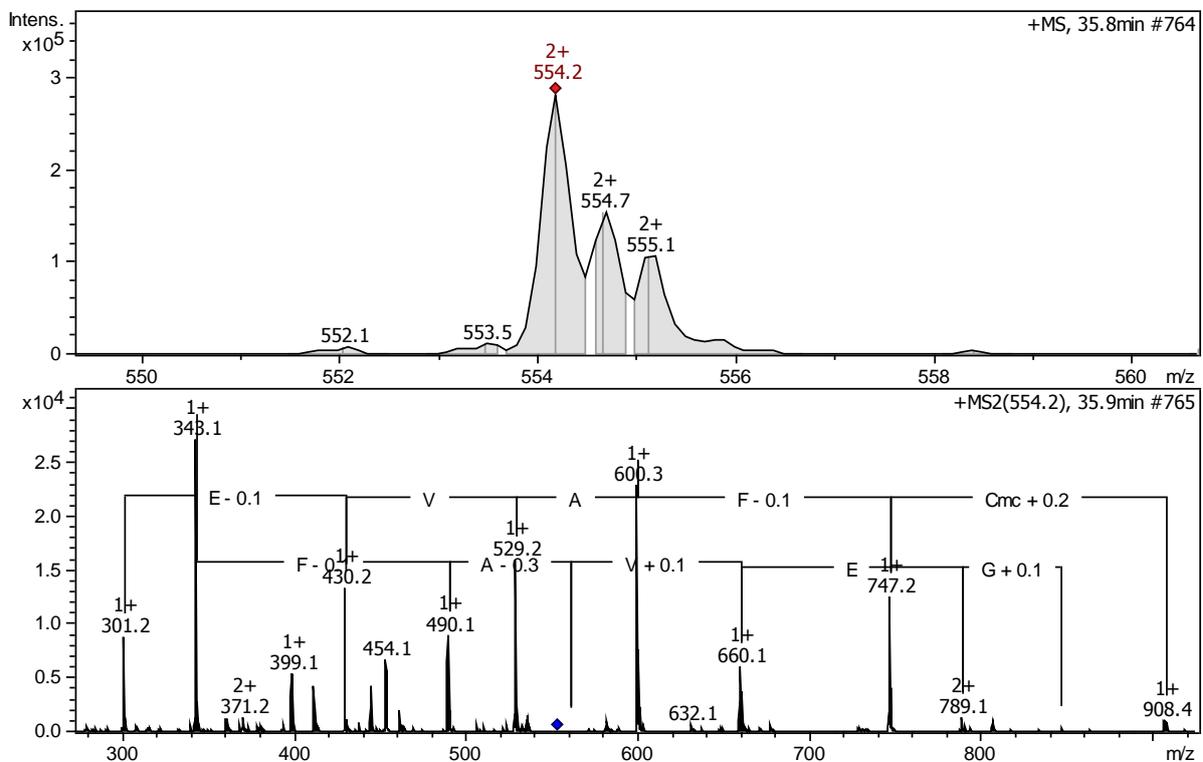


Abb. 208: MS und MS/MS Spektrum eines exemplarisch ausgewählten tryptischen Peptides von BSA. Das obere MS Spektrum zeigt die doppelt geladene intakte Peptid-Precursormasse bei 554.2 m/z. Das untere MS/MS Spektrum wurde manuell annotiert und zeigt die einzelnen Aminosäurefragmente.

{MATRIX} Mascot Search Results *{SCIENCE}*

Protein View

Match to: ALBU_BOVIN Score: 416

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4

Found in search of ProteinAnalysisResults_25.13-42.77.mgf

Nominal mass (M_r): 71244; Calculated pI value: 5.82

Taxonomy: [Bos taurus](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 54%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC
201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
```

Abb. 21: Mascot Ergebnisseite von der standardisierten BSA -Probe. In der schwarzen Gesamtsequenz des Proteins wurden die gefundenen tryptischen Peptide rot dargestellt. Die erreichte Sequenzabdeckung beträgt 54%.

4.2 Proteomanalyse von HUVEC Zellen

Nach der Optimierung der CE-Ionenfallen-MS-Kopplung sollten nun biologische Proben umfassend analysiert werden. Zuerst wurden Vorversuche an HUVEC-Zellen, also bereits in der Literatur etablierten Zelllinien^[42] durchgeführt. Danach sollte das Proteom der EPC analysiert werden und vergleichend zum HUVEC-Proteom betrachtet werden. In der Literatur wurde bereits 2003 die Analyse des HUVEC-Proteoms mit einem 2D-Gel durchgeführt. Anschließend wurde zur Proteinidentifikation ein MALDI-TOF Massenspektrometer mit *Peptide Mass Fingerprint*- (PMF) Analysen verwendet. Da hierbei keine qualitativ hochwertigen MS/MS- Messungen durchgeführt werden konnten, mit der deutlich bessere Resultate (zusätzliche Aminosäuresequenzabdeckung der Proteine) erzielt werden, veröffentlichten dieselben Autoren zwei Jahre später eine weitere Arbeit, in der mit der die im 2D-Gel getrennten Protein mit einer LC-Quadropol-TOF Gerätekopplung untersucht wurden^[43]. Da die in meinen Arbeiten eingesetzte Ionenfalle gute MS/MS Spektren liefert, sollten zuerst diese in der Literatur beschriebenen Experimente mit reproduziert oder gar verbessert werden. Statt der LC wurde zur Peptidtrennung die CE eingesetzt. Nach der Kultivierung der HUVEC-Zellen wurden die Proteine daraus extrahiert und 250 µg des Proteinextraktes mittels Zweidimensionale-Gelelektrophorese getrennt. (Abb. 30), um dann die einzelnen Proteine mit der etablierten CE-MS-Technik zu identifizieren.

Alle sichtbaren Proteinspots wurden ausgestochen, tryptisch verdaut und der etablierten CE-MS-Analytik unterzogen. Von den 306 sichtbaren Spots auf dem 2D-Gel der HUVEC-Proteinextrakte konnten insgesamt 113 Proteine identifiziert werden. Nach Entfernen der Mehrfachidentifizierungen ergaben sich 85 verschiedene Proteine. (siehe Anhang 1). Bei den mehrfach identifizierten Proteinen handelt es sich wahrscheinlich um post-translational fragmentierte oder modifizierte Proteine. In den Arbeiten von Bruneel *et al.* 2003 und 2005 wurden 40 bzw. 109 verschiedene Proteine nachgewiesen.

3 ← pH → 7

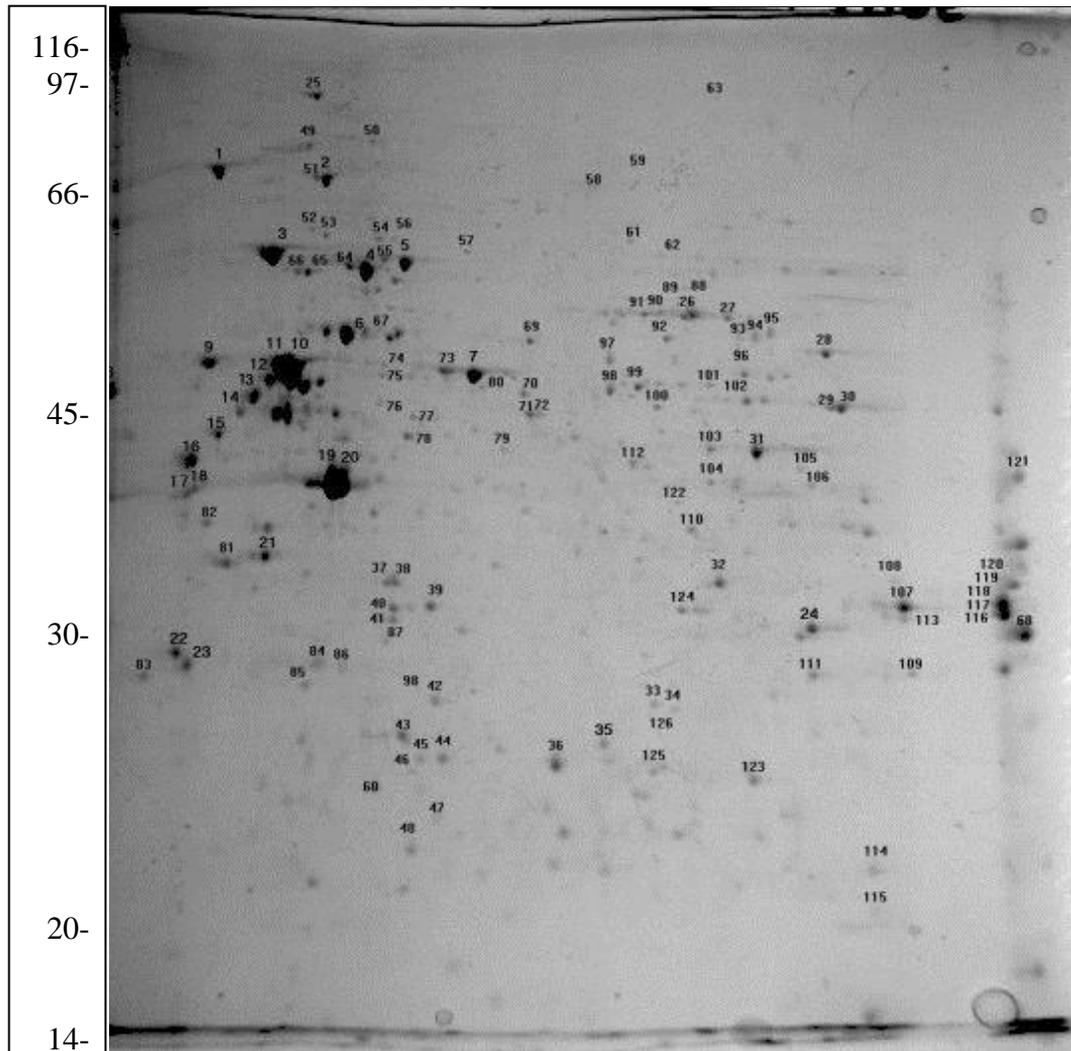


Abb. 30: 2D-Gel der Proteinextrakte aus HUVEC Zellen. Proteine aus HUVEC (250 µg) wurden in einem zweidimensionalen Gel getrennt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Die Massen von Markerproteinen sind an der linken Seite markiert. Die IEF wurde im Bereich vom pH 3 (linke Seite) bis pH 10 (rechte Seite) durchgeführt.

Die Verteilung der Proteine auf Abb. 31 zeigt, dass für 32% der gefundenen Proteine Mascot Scores zwischen 100-200 ermittelt wurden. Über dem Identifikationsminimum von 40 bis 100 befanden sich 22% der Treffer, über einem Mascot Score von 200 waren die restlichen 46% der Proteine mit nach oben hin abnehmender Tendenz verteilt. Mit dem höchsten Score von 760 konnte das Protein „Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP/p97)“ gefunden werden, welches bei der Proteindegradation und Zellzyklusregulation beteiligt ist und möglicherweise eine Rolle bei Differenzierung und Retrodifferenzierung von myelomonotischen Zellen spielt^[44]. Bei den Proteinen für die ein Mascot Score zwischen 40 und 100 gefunden wurde, handelte es sich entweder um kleinere Proteine, wie Histone, oder um niedrigabundante Proteine, welche nur mit zwei Peptiden identifiziert werden konnten.

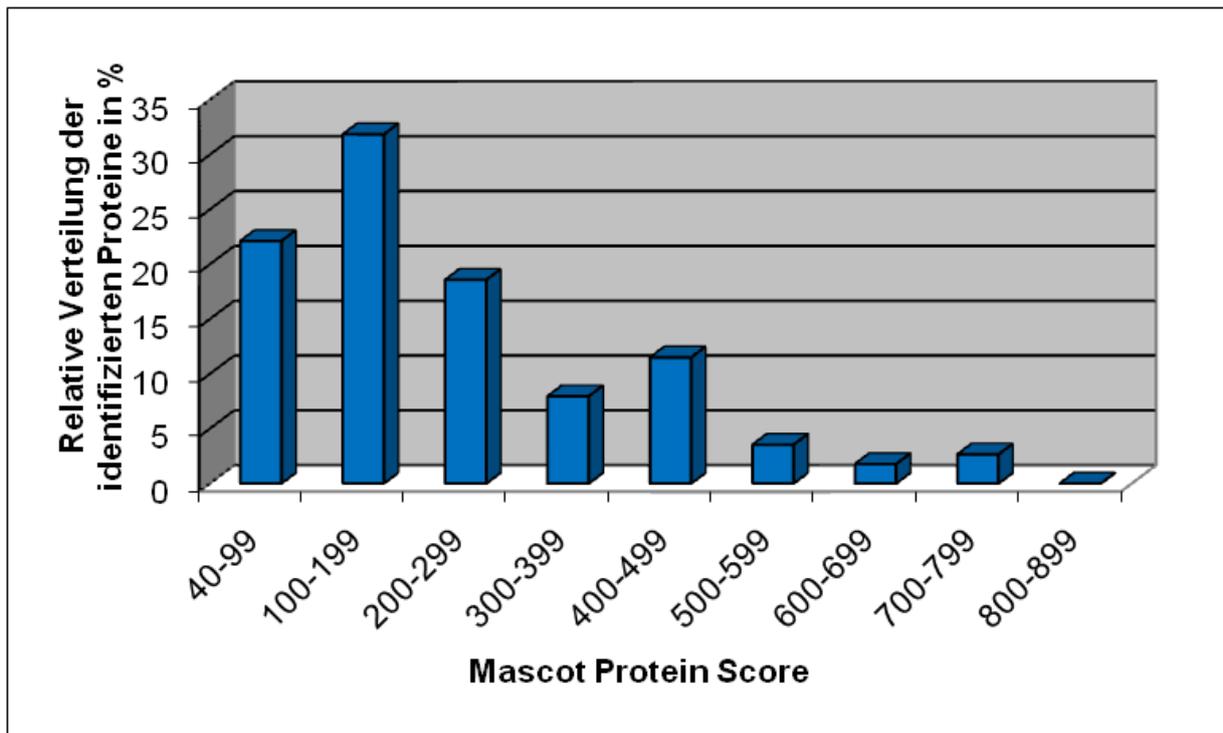


Abb. 31: Mascot-Score-Verteilung der identifizierten Proteine in HUVEC Zellen. Die untere Identifikationsgrenze lag bei Mascot Score 40, ermittelt durch randomisierte (*decoy*) Datenbanksuchen, der höchste Score wurde mit 760 erreicht.

In Abb. 32 wurden die Proteine nach ihren Molekulargewichten sortiert. Kleinere Proteine unter 10 kDa laufen während der Elektrophorese aus dem 2D Gel heraus. Das kleinste gefundene Protein war die ATP Synthetase D mit einem Molekulargewicht von 18.4 kDa. Ein Maximum der Verteilung zeigt sich bei 30-40 kDa (insgesamt 25%). Große Proteine über 80 kDa, wie z.B. Tyrosine-protein kinase ITK/TSK, wurden nur wenige gefunden (lediglich 7%). Das größte identifizierte Protein war VCP/p97 mit 89.8 kDa. VCP/p97 wurde auch mit dem höchsten Score identifiziert, da während des tryptischen Verdaus aus einem größeren Protein mehr Peptide entstehen als aus kleineren Proteinen, findet man generell höhere Mascot Scores für größere Proteine. Der Mascot Score korreliert zudem nicht zwingend mit der Abundanz des betreffenden Proteins in den Zellen. In der Regel findet man aber höhere Sequenzabdeckungen für abundante Proteine und somit auch höhere Mascot Scores.

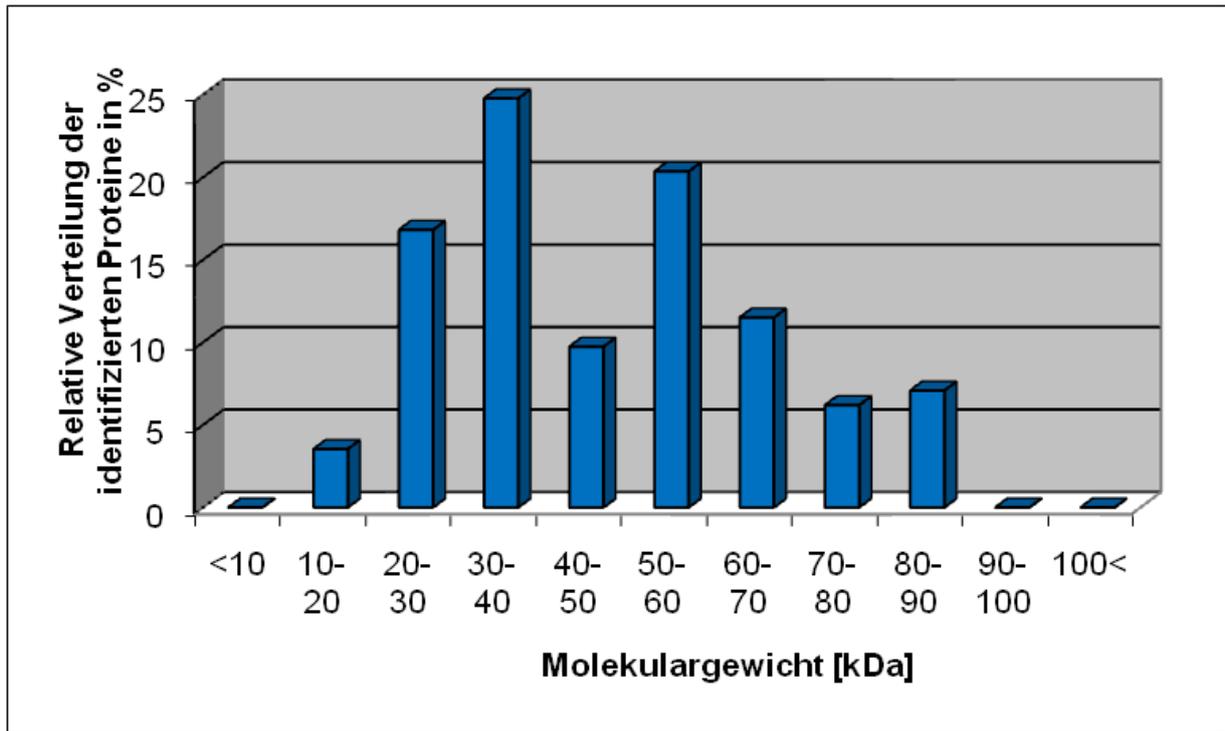


Abb. 22: Verteilung des Molekulargewichtes der identifizierten Proteine in HUVEC Zellen.

Abb. 33 zeigt die Verteilung der gefundenen Proteine nach ihrer biologischen Funktion. Der Anteil an hypothetischen Proteinen von 1 % ist darauf zurückzuführen, dass sie nur anhand von Genom-Sequenzierung identifiziert wurden, ihre Identität aber bisher nicht mit anderen Methoden geklärt wurde. Den zweitgeringsten Anteil bilden die Membranproteine, welche in einem 2D Gel wegen ihrer hydrophoben und oft basischen Eigenschaften nicht fokussiert werden können und sich der Auftrennung entziehen.

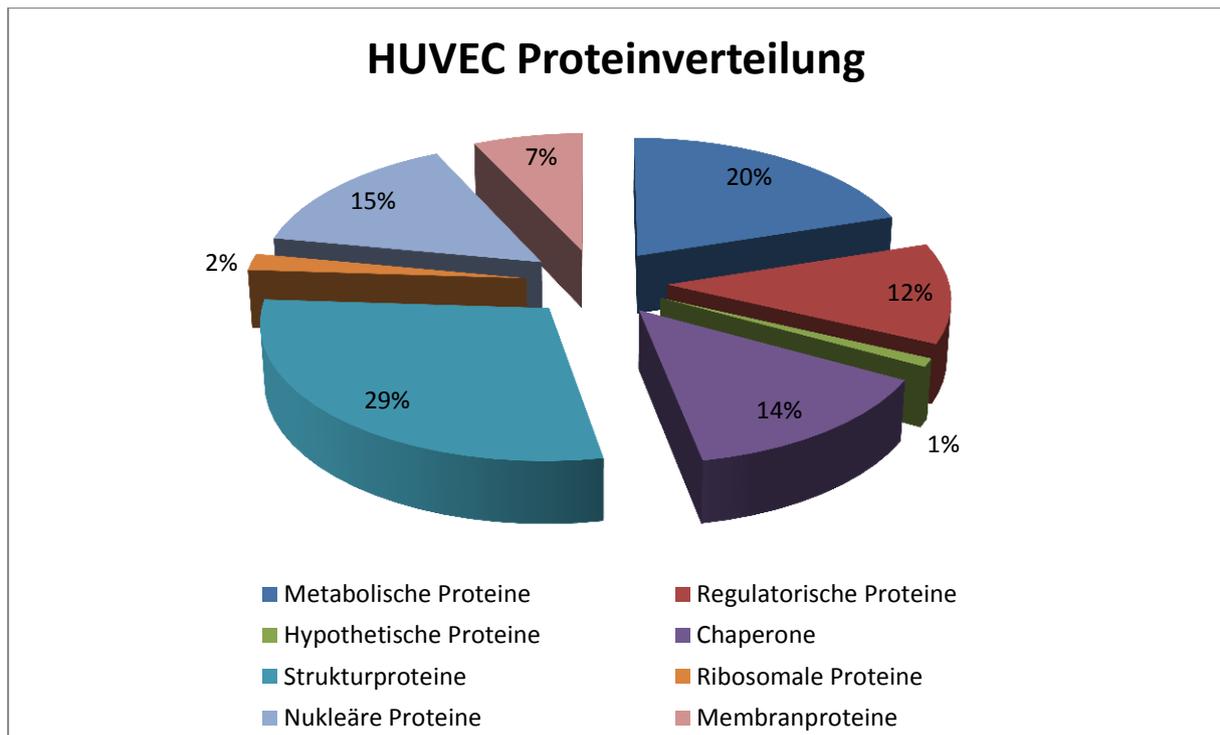


Abb. 23: Verteilung der identifizierten Proteine in HUVEC-Zellen. 85 identifizierte Proteine wurden nach ihrer Lokalisation und Funktion in der Zelle dargestellt. Am meisten fanden sich Struktur- und metabolische Proteine wieder, die geringe Anzahl der Membranproteine ist auf das zweidimensionale Gelsystem zurückzuführen.

Den höchsten Anteil hatten Proteine mit struktureller (29 %) und metabolischer (20%) Funktion in der Zelle. Diese Proteine kommen abundant in der Zelle vor, so dass sie auf dem 2D Gel als intensive Spots erscheinen. Einige dieser Proteine konnten als Isoformen oder Degradationsprodukte in mehreren 2D Gelspots gefunden werden. Abb. 34 zeigt einen Ausschnitt aus dem 2D Gel des HUVEC Zellextraktes in dem Bereich von 40-50 kDa und den pH 4 bis 5. In den mit Pfeilen markierten Gelspots konnte das Protein Vimentin mittels CE-MS identifiziert werden. Die Verschiebung der Spots zu immer saureren pH und zu einem kleineren Molekulargewicht deutet auf eine Degradation des Vimentins hin.

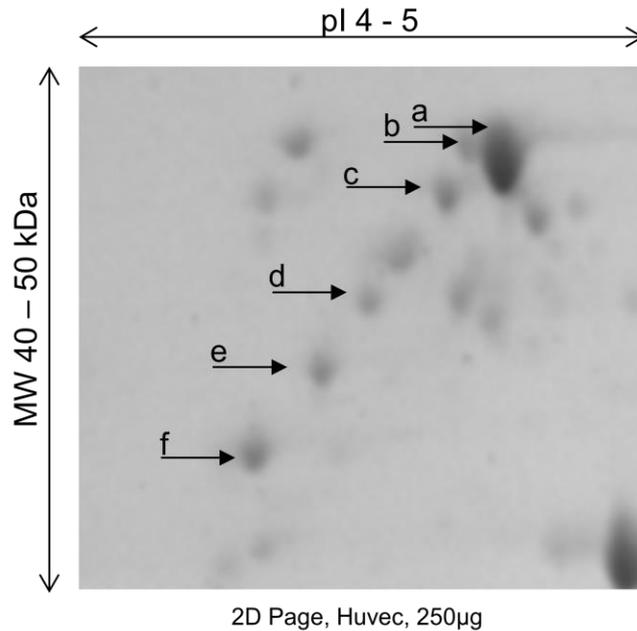


Abb. 34: Ausschnitt aus dem 2D Gel des HUVEC Zellextraktes. In den mit Pfeilen markierten Proteinspots konnte mit CE-MS das hochabundante Strukturprotein Vimentin gefunden werden.

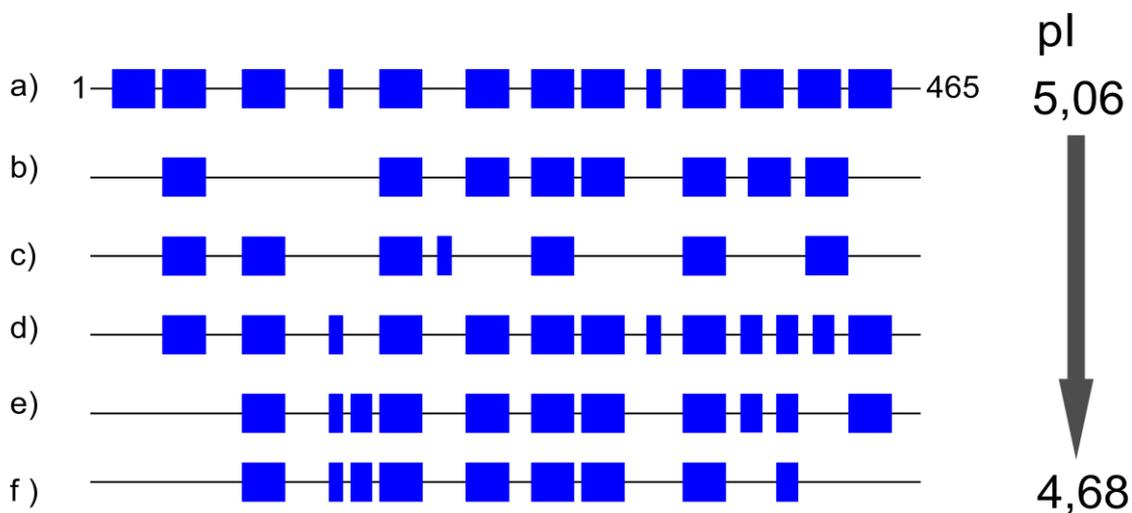


Abb. 35: Sequenzabdeckung des Vimentins in den unterschiedlichen Gelspots Die blauen Rechtecke zeigen (ihre Breiten sind nicht maßstabsgerecht) die mit MS/MS identifizierte tryptische Peptide und visualisieren die Aminosäuresequenzabdeckung des Vimentins von Position 1-465. Der berechnete pI-Wert ist auf der rechten Seite gezeigt.

Die Sequenzabdeckung der MS-Analysen der Vimentin-Species ist in Abb 35 gezeigt. Basierend auf der Position des jeweils ersten detektierten Peptides vom C- und N-terminalen Ende wurden mit dem „Compute pI/MW Tool“ (http://web.expasy.org/compute_pi/) die annähernde pI-Werte des entsprechenden Bereiches von Vimentins theoretisch bestimmt.

Vimentin im Spot a) hätte so einen pI Wert von 5.06, im Spot f) nur noch pI 4.68. Das N-terminale Ende vom Vimentin wird stärker abgebaut und da dort vermehrt basische Aminosäuren lokalisiert sind, verschiebt sich der pI-Wert in den sauren Bereich. Dieser Effekt erklärt die auf dem 2D Gel sichtbare Verschiebung der Vimentin-Spezies nach dem saurerem Bereich des Gels, wobei auch das Molekulargewicht des Proteins abnimmt.

Diese Ergebnisse sind mit den im Jahre 2003 publizierten Ergebnissen von Bruneel *et al.*^[42] vergleichbar. Auf dem 2D Gel (IEF 180mm, pH 4-7, SDS PAGE 8-18%) konnten in dieser Arbeit nach Coomassie Brilliantblau-Färbung 459 Proteinspots detektiert werden, von denen 45 identifiziert wurden. Einige Proteine kamen in mehreren Spots vor und es wurden 40 verschiedene Proteine identifiziert.

Die Schnittmenge der gefundenen Proteine beider Arbeiten beträgt 19 Proteine. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um hochabundante Proteine wie Actin, HSP70, Annexin usw. (Abb. 36)

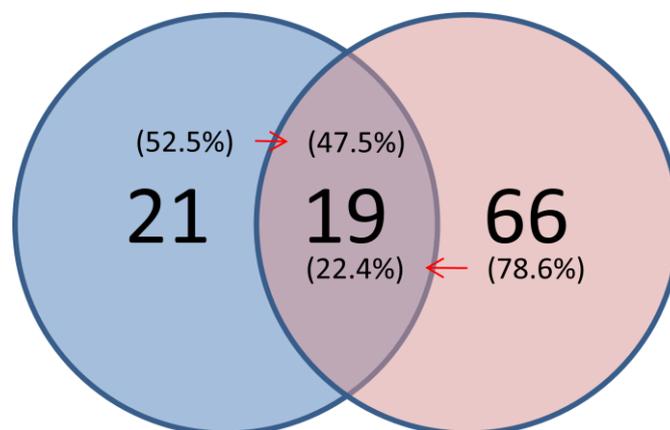


Abb. 36: Identifizierte Proteine in HUVEC-Zellen. Die identifizierten Proteine der vorliegenden Arbeit wurden mit den von Bruneel et al (2003) beschriebenen verglichen. Rot: in dieser Arbeit identifizierte Proteine, blau: von Bruneel et al identifizierte proteine

Die Verteilung der Proteine aus HUVEC Zellen im Hinblick auf ihre biologische Funktion ist den Ergebnissen aus dieser Arbeit vergleichbar. Den größten Anteil nehmen die metabolischen und die Strukturproteine ein. In den restlichen 51% finden sich Chaperone, regulatorische und ribosomale Proteine. Membranproteine wurden nicht gefunden, da sie sich aufgrund ihre Hydrophobizität auf einem IEF Streifen von pH 4-7 nicht fokussieren lassen. Der hohe Anteil an hypothetischen Proteinen ist auf den Stand der Proteindatenbanken im Jahre 2003 zurückzuführen.

4.3 Proteomanalyse von EPC Zellen

Analog zu den HUVEC Zellen wurde das Proteom von EPC-Zellen analysiert. Nach Kultivierung der Zellen wurden die Proteine extrahiert und dann mittels zweidimensionaler-Gelelektrophorese getrennt (Abb. 37). Anschließend wurden die einzelnen Proteine mit CE-MS/MS identifiziert. Alle sichtbaren Proteinspots wurden nach absteigender Intensität der Coomassie-Färbung sortiert ausgestochen, tryptisch verdaut und der MS-Analytik unterzogen. Von den 371 sichtbaren Spots auf dem 2D-Gel der EPC-Proteinextrakte konnten in insgesamt 132 Spots 143 Proteine identifiziert werden. Nach Entfernen der Mehrfachidentifizierungen ergaben sich 81 verschiedene Proteine (Anhang 2).

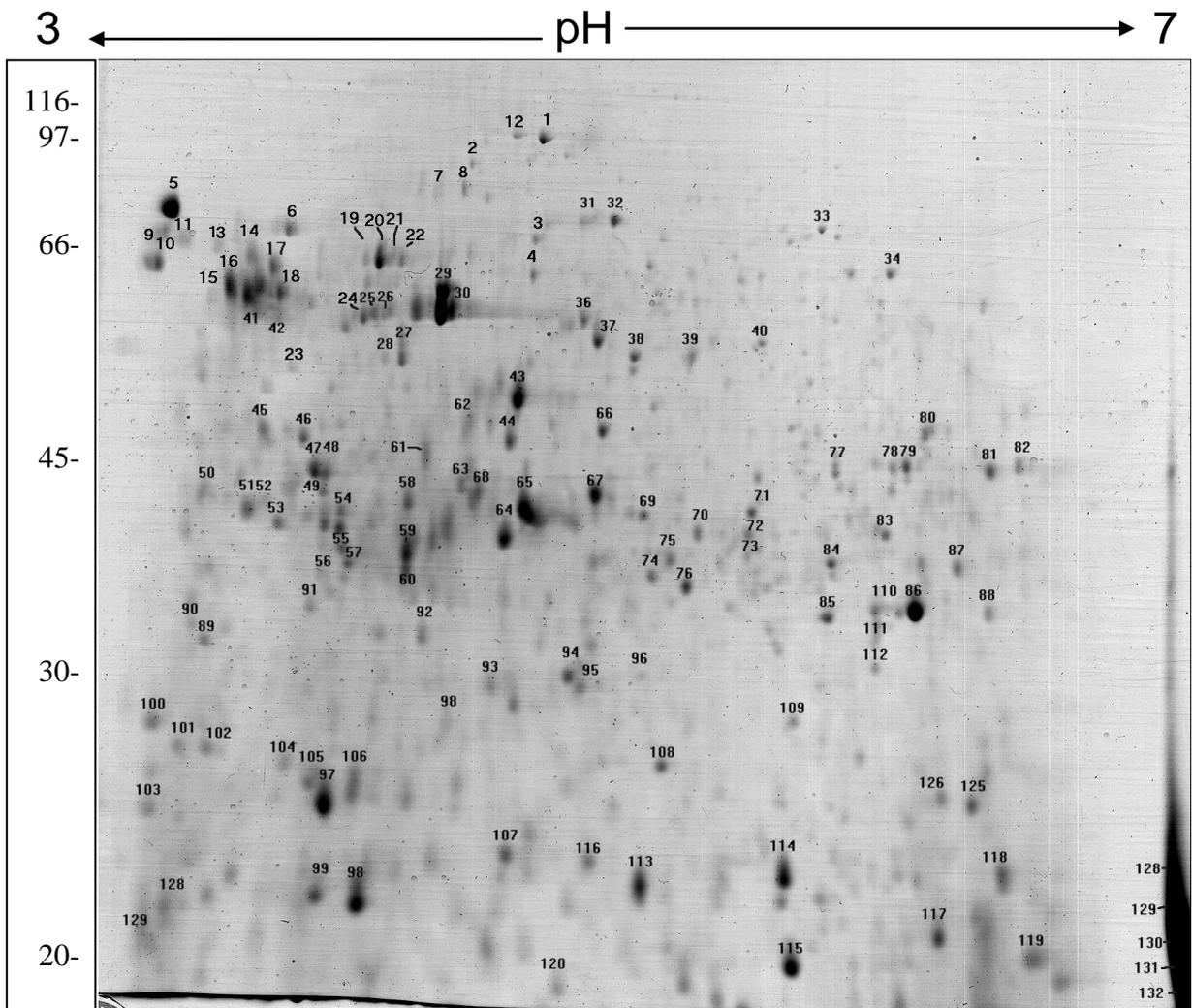


Abb. 37: 2D-Gel der Proteinextrakte aus EPC Zellen. Proteine aus humanen EPC (1 mg) wurden in einem zweidimensionalen Gel getrennt und mit Coomassie Blue® gefärbt. Die Massen von Markerproteinen sind an der linken Seite gezeigt. Die IEF wurde im Bereich vom pH 3 (linke Seite) bis pH 10 (rechte Seite) durchgeführt.

Die identifizierten Proteine wurden anhand ihrer Funktionen in der Zelle sortiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der HUVEC-Experimente wurden am meisten metabolische und regulatorische Proteine, gefolgt von Strukturproteinen identifiziert (Abb. 38).

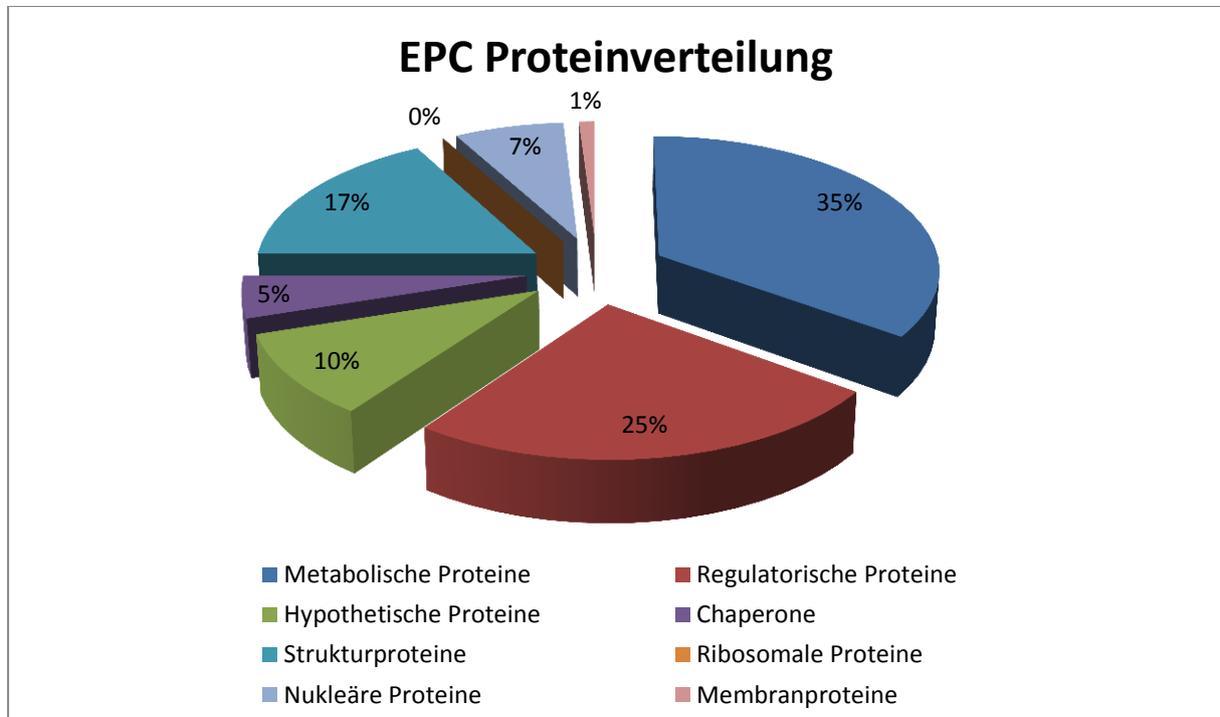


Abb. 38: Verteilung der identifizierten Proteine in EPC-Zellen. 81 identifizierte Proteine wurden nach ihrer biologischen Funktion in der Zelle dargestellt. Am meisten fanden sich metabolische und regulatorische Proteine wieder.

Für ca. 60% der identifizierten Proteine wurde ein Proteinscore zwischen 40-100 bestimmt (Abb. 39). Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten für die HUVEC Zellen. In dieser Gruppe finden sich eher kleinere Proteine wie Calprotectin MRP14 (MW 16.3 kDa, Spot Nr. 116, Mascot Score 42) oder Glutathion Peroxidase (MW 27.7 kDa, Spot Nr. 96, Mascot Score 66). Proteine mit einem höheren Molekulargewicht, die in weniger intensiven Proteinspots identifiziert wurden, wie Alpha-Enolase (MW 56.8 kDa, Spot Nr. 34, Mascot Score 197) hatten mittlere Werte für die Mascot Proteinscores. Nur hoch abundante Proteine wie Vimentin erreichten höchste Mascot Scores (MW 54kDa, Spots Nr. 13-18, 41-42, 51-52, 90, Mascot Score 544).

Interessanterweise enthält Spot Nr. 117 Hämoglobin (Mascot Score 273). Es ist bekannt, dass humane endotheliale Zellen zellfreies Hämoglobin aufnehmen können^[42,46]. Da die EPCs aus humanem Vollblut gewonnen werden, könnte es sich allerdings auch um eine Kontamination handeln.

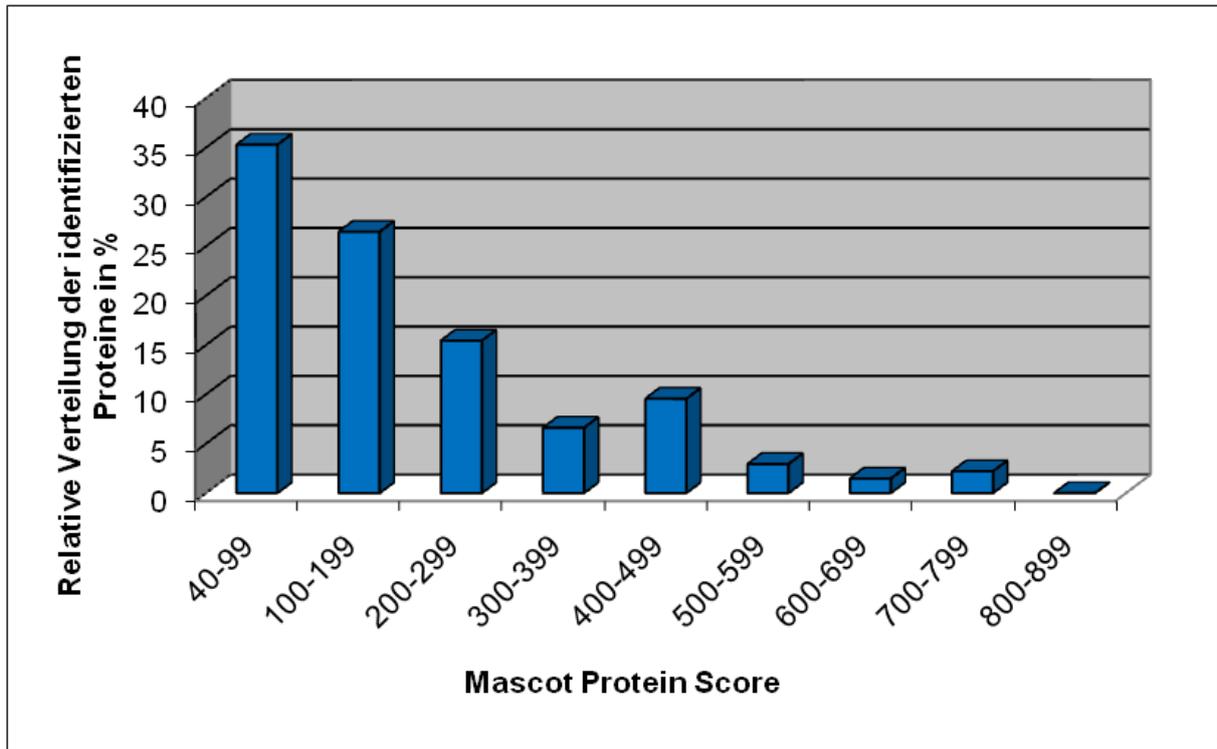


Abb. 39: Mascot-Score-Verteilung der identifizierten Proteine in EPC Zellen. Die untere Identifikationsgrenze ($p < 0,05$) lag bei Proteinscore 40, ermittelt durch randomisierte Decoy-Datenbanksuchen.

Sortiert man die Proteine nach ihren Molekulargewichten (Abb. 40) wird die hohe Identifikationsrate der Histone (H2A, H2B, H4) bei 10-20 kDa ersichtlich. Da diese wegen ihrer geringen Größe lediglich mit 2-3 Peptiden pro Protein identifiziert wurden, liegen die Mascot Scores im Bereich von 40-100. Ein zweites Maximum zeigt sich bei 50 kDa, große Proteine über 80 kDa wurden wenige identifiziert. Kleine Proteine unter 10kDa verließen das Gel während der Elektrophorese und waren somit nicht detektierbar.

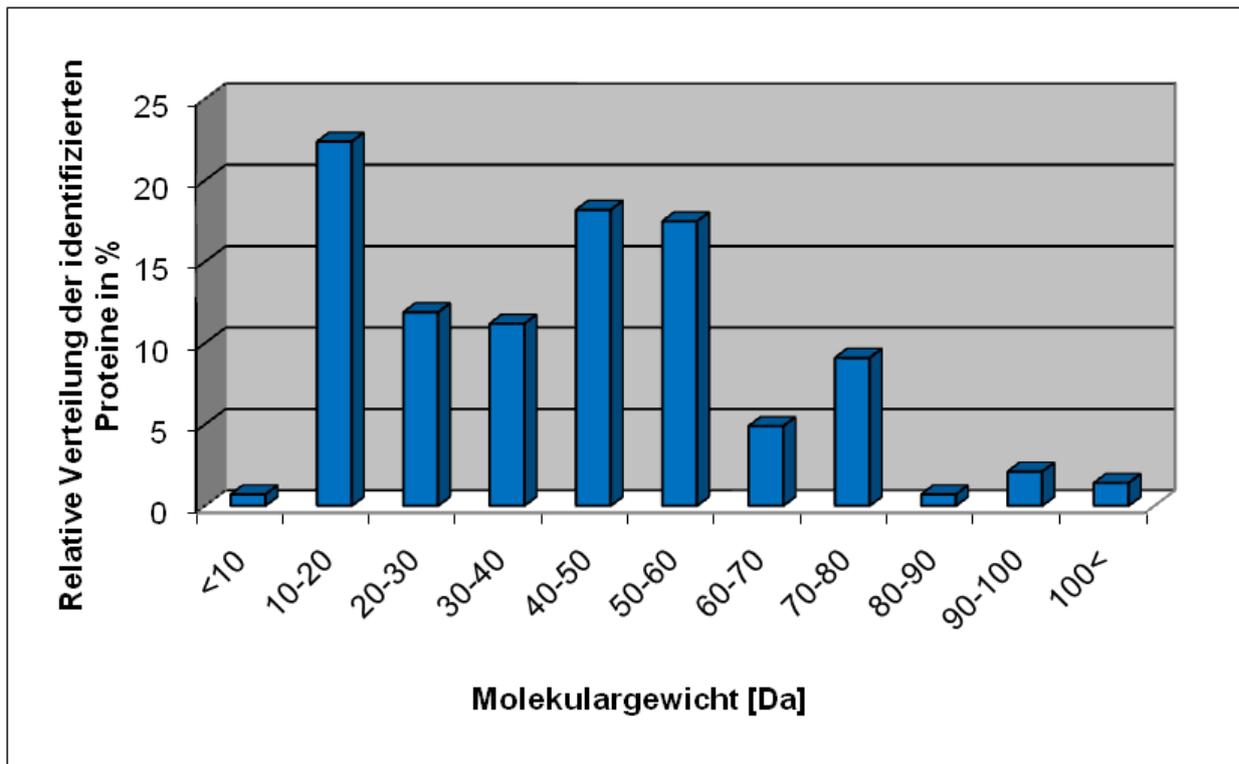


Abb. 40: Verteilung des Molekulargewichtes der identifizierten Proteine in EPC Zellen.

Der graphische Vergleich der absoluten Anzahl der Proteine unterschiedlicher Funktionsgruppen zwischen den Ergebnissen der HUVECs und EPCs (Abb. 41) zeigt die möglicherweise erhöhten Expressionslevel der metabolischen und regulatorischen Proteine bei EPCs im Vergleich zu den ruhenden HUVEC Zellen, welche eher eine höhere Expression der Strukturproteine sowie der Chaperone aufwiesen. Außerdem wurden in den EPCs acht hypothetische Proteine gefunden, welche in den Datenbanken noch nicht weiter charakterisiert worden sind (z.B. Q2KHP4), aber auf Transkriptionsebene nachgewiesen wurden. In HUVECs fand sich lediglich ein hypothetisches Protein (A0N4V7).

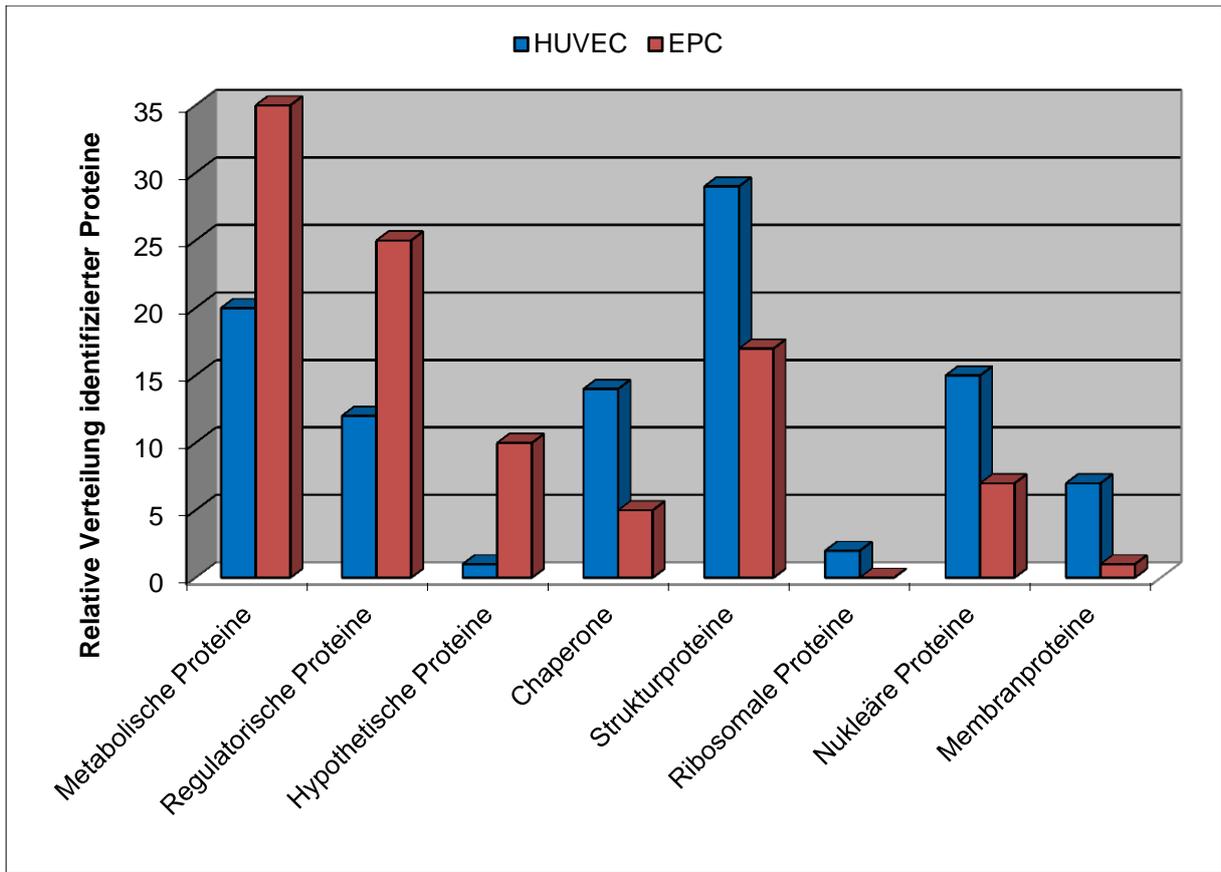


Abb. 41: Vergleich der Proteinverteilung zwischen HUVEC (blau) und EPC (rot)

4.4 Proteomanalyse von cALL2 und cALL3-Zellen

4.4.1 Vorversuche zur Trennung auf Proteinebene im eindimensionalen Gradientengel

Bei den eingesetzten Zelllinien cALL2 und cALL3 handelt es sich um humane B-Zell-Tumorzellen, die den sogenannten „poor“ und „good“ „respondern“ bei einer Prednison-Therapie entsprechen (s. Einleitung 2.3). Diese Zellen sollten einer Proteomanalyse unterzogen werden, um anhand möglicher Unterschiede Hinweise für die Ursache des unterschiedlichen Ansprechens auf die Prednison-Therapie zu finden.

Hierzu wurden Proteine aus den jeweiligen Zellen extrahiert und dann im eindimensionalen Gradientengel getrennt. Die Gelspur wurde in möglichst viele kleine Stücke zerteilt, die enthaltene Proteine mit Trypsin verdaut und die Peptide in der CE-MS-Kopplung getrennt und analysiert werden. Der Unterschied bei diesen Experimenten zu den vorherigen war die Verwendung von 1D statt 2D Gelen, um sowohl Membranproteine als auch stark basische und saure Proteine zu finden. In Vorversuchen wurden zuerst die Parameter Beladungsmenge, Komplexität der Proben und Extraktion der Proteine aus der Gelspur optimiert. Es wurden auf einem 5-15% SDS Gradient Gel 100 µg, 250µg und 490µg eines Proteinextraktes aus cALL2 Zellen aufgetragen und jeweils vier identische Areale für die tryptische Enzymspaltung ausgewählt (Abb. 42). Die anschließende Analyse der Proteine in der CE-MS-Kopplung ergab eine steigende Anzahl der identifizierbaren Proteine bei höheren Proteinnengen (Tabelle 3). Eine ca. 5fach höhere Proteinkonzentration in den Proben sorgte also für deutlich intensivere Signale im Massenspektrum und führte zu einer etwa 2,5fach höhere Anzahl an identifizierten Proteinen.

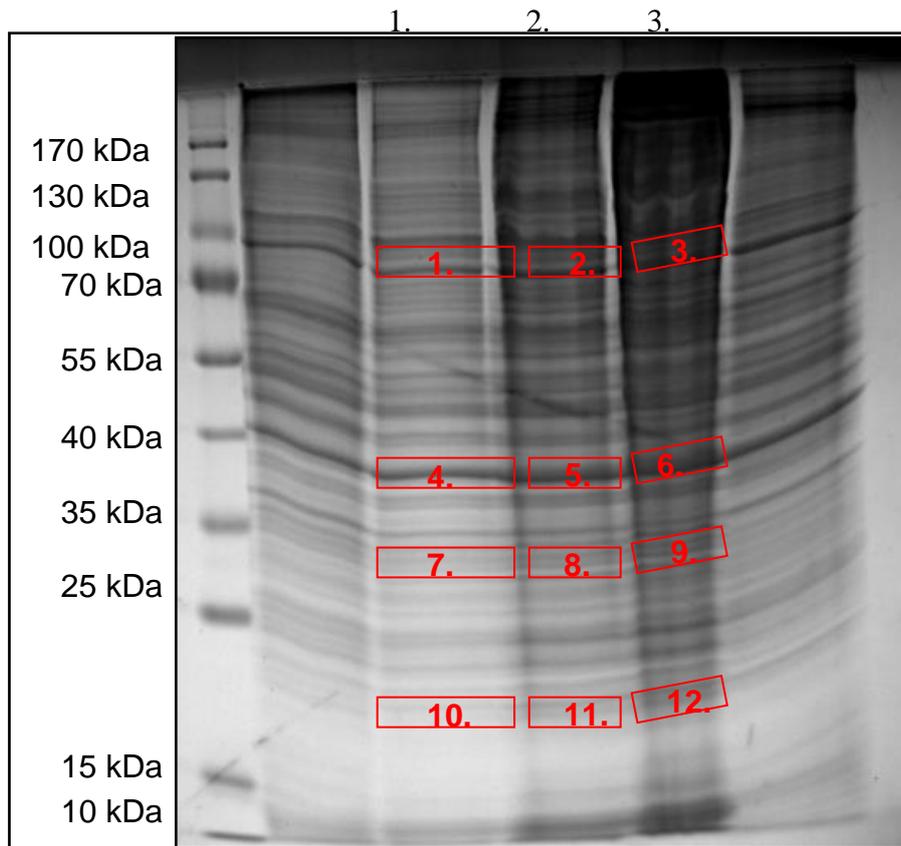


Abb. 42: 1D-Gradientengel der Proteinextrakte aus cALL2-Zellen. Proteine aus cALL2-Zellen (100µg(1), 250µg(2) und 490µg(3)) wurden in einem eindimensionalen Gel (5-15% Gradient) getrennt und mit Coomassie Blue® gefärbt. Die Massen von Markerproteinen sind an der linken Seite gezeigt. Die angezeigte Größe der ausgeschnittenen Gelbanden entspricht etwa den tatsächlichen Stückchen.

Tabelle 3: Anzahl identifizierter Proteine pro Ausschnitt in den Teststreifen jeder Gelspur in Abb. 45.

MG-Bereich	100µg	250µg	490µg
100kDa	1	2	2
40kDa	2	2	2
35kDa	1	3	4
20kDa	1	3	4
Gesamtanzahl Proteine	5	10	12

Weiterhin wurde untersucht, ob mit der Erzeugung von kleineren und damit deutlich mehr Gelstückchen, vor dem tryptischen Verdau, mehr identifizierbare Proteine erhielt. So wurden auf einem 5-15% SDS Gradient Gel in fünf Spuren jeweils 490 µg eines Proteinextraktes aus

cALL2 Zellen aufgetragen. Es wurde ein 8 mm breites Areal auf dem Gel in den Spuren bestimmt, welches in 1, 3, 6, 10 oder 14 (die kleinste technisch handhabbare Größe) Gelstreifen geschnitten wurde (Abb. 43). Die darauf folgende tryptische Spaltung und Analyse in der CE-MS-Kopplung ergab, dass Proteine aus den kleineren Stückchen aufgrund der verringerten Proteinkomplexität besser im Massenspektrometer identifizierbar waren (Tabelle 4). Die optimale Breite der Stücke betrug somit ca. 0,8 mm, eine weitere Verkleinerung war technisch nur noch schwer durchführbar und brachte keine besseren Ergebnisse mehr.

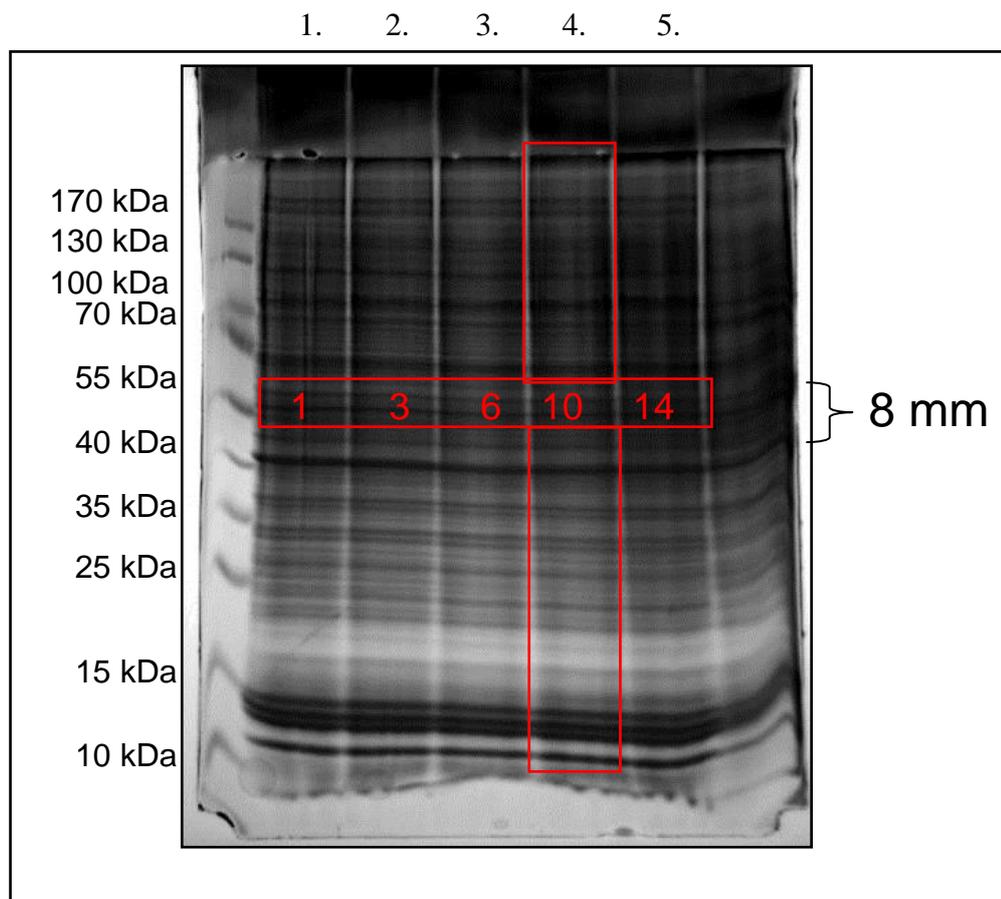


Abb. 43: Im Eindimensionalen Gradientengel getrennte Proteinextrakte aus cALL2-Zellen. 490µg Proteine aus cALL2 wurden in jeder Spur in einem eindimensionalen Gel (5-15% Gradient) getrennt und mit Coomassie Blue® gefärbt. Die Massen von Markerproteinen sind an der linken Seite gezeigt. Das mittlere Areal wurde in die auf dem Bild gezeigte Stückzahl geschnitten. Spur 4 (154 Stücke) wurde zusätzlich analysiert. Die angezeigte Größe der ausgeschnittenen Gelbanden entspricht etwa den tatsächlichen Stückchen.

Tabelle 4: Anzahl identifizierter Proteine pro Ausschnitt in den Teststreifen jeder Gelspur in Abb. 46.

Stückelung der Gelbande	1	3	6	10	14
Proteine insgesamt	5	13	31	44	43
Unterschiedliche Proteine	5	7	10	14	14
Protein/Gelstreifen	1	4,3	5,1	4,4	3,1

Als Folge wurde anschließend Spur 4 in insgesamt 154 Streifen geschnitten, um eine maximale Proteinidentifikationsrate zu erzielen. So konnten in Spur 4 des 1D-Gradientengels 271 Proteine identifiziert werden. Da einige Proteine im mehreren Banden vorkamen, ergaben sich nach Entfernen der Duplikate 109 unterschiedliche Proteine (Anhang 3).

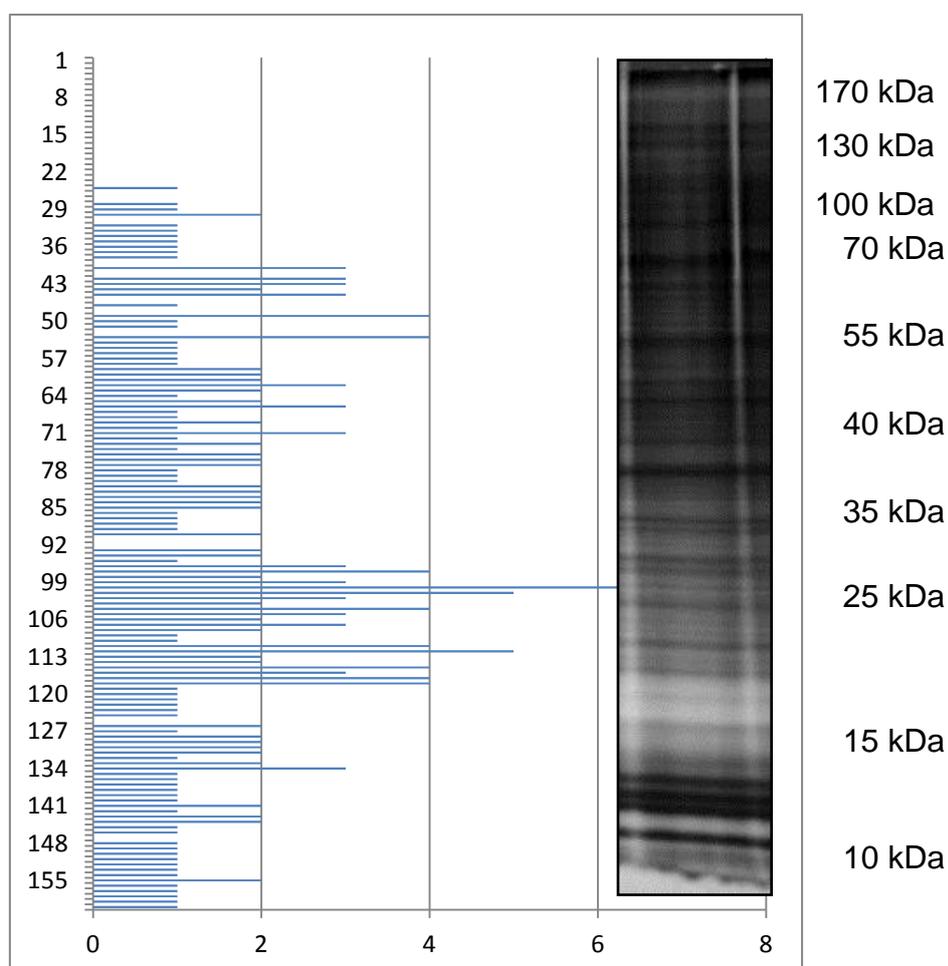


Abb. 44: Anzahl der identifizierten Proteine pro Gelstückchen. Die Nummer der Gelstücke sind im Vertikalen angegeben, die absolute Anzahl der Proteine im Horizontalen. Das Bild ist beinahe maßstabsgerecht an den Balken angepasst, wobei man technisch bedingte Schwankungen bei der Breite der Gelstückchen berücksichtigen muss.

Um die Qualität der Proteinidentifikation zu überprüfen, kann der gefundene Mascot Score herangezogen werden (Abb. 45). Hier wird der Score von jedem identifizierten Protein auf einer vertikalen Skala gegen das photographische Bild des Gelstreifens gelegt. Da pro Gelstück teilweise mehrere Proteine gefunden wurden oder eine Proteinbande in mehreren Stückchen erfasst wurde, beträgt die Anzahl aller Datenbankergebnisse 271. Hierbei wird sichtbar, dass intensiver gefärbte Proteinbanden höhere Mascot scores der dort identifizierten Proteine ergaben, mit einem maximalen Mascot score von 479 im Gelstück 67 in dem Actin identifiziert wurde.

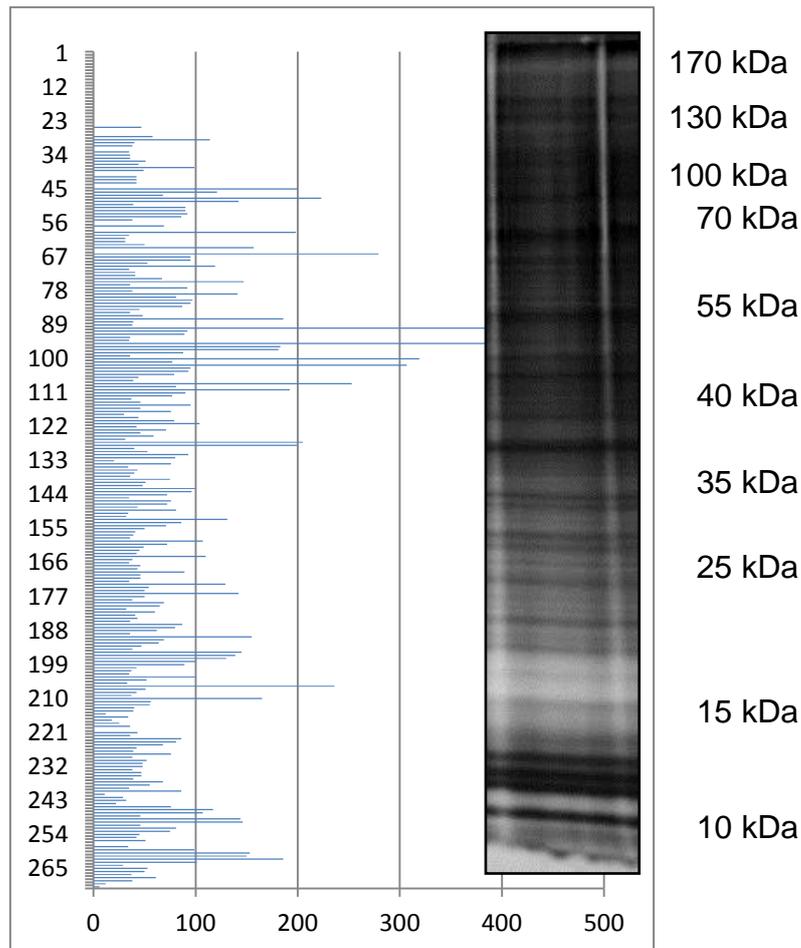


Abb. 45: Verteilung der Mascot Scores der identifiziertem Proteine. Die Nummer der Proteine sind in der Vertikalen angegeben, der Mascot Score wird durch den jeweiligen horizontalen blauen Balken angezeigt.

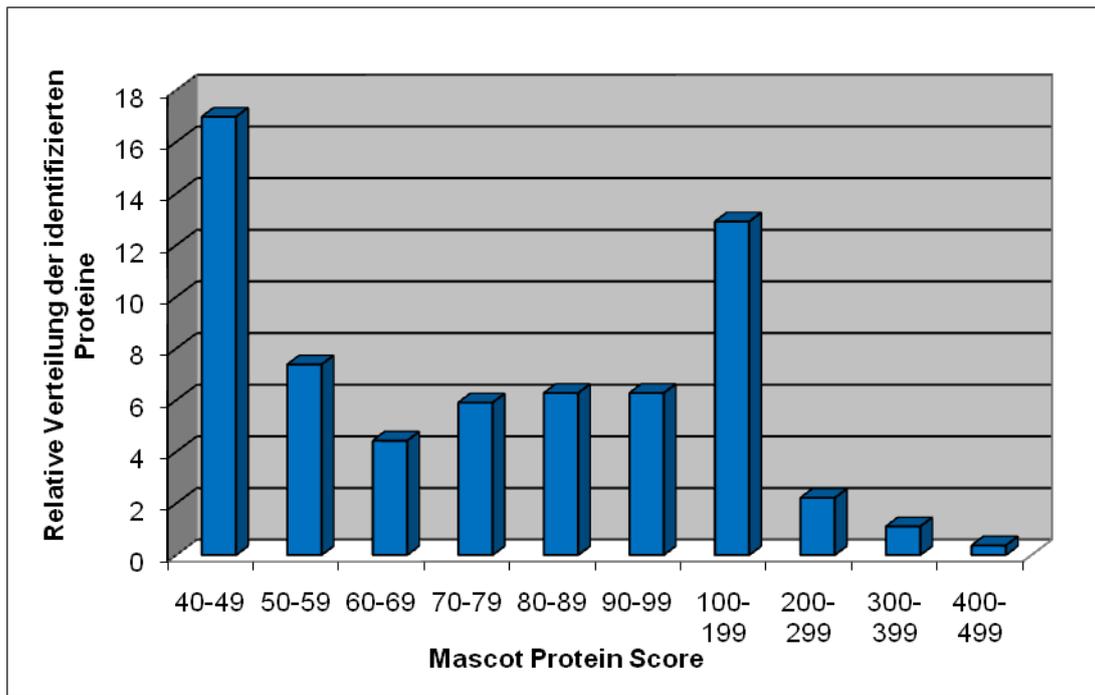


Abb. 46: Verteilung der Mascot Protein Score von allen gefundenen Proteinen aus cALL2 Zellen.

Die Verteilung der Proteine in Abb. 46 zeigt, dass 13% der gefundenen Proteine Mascot Scores zwischen 100-200 haben. Über dem Identifikationsminimum von 40 bis 100 befanden sich 83% der Treffer, über einem Mascot Score von 200 waren die restlichen 4% der Proteine verteilt. Betrachtet man die Verteilung der 109 unterschiedlichen Proteine nach ihrer biologischen Funktion, nehmen die regulatorische Proteine 29% ein, gefolgt von ribosomalen Proteinen. Am wenigsten konnten Proteine gefunden werden, welche in der Zelle an Redoxvorgängen beteiligt sind, wie z.B. Peroxiredoxin (Q06830). (Abb. 47)

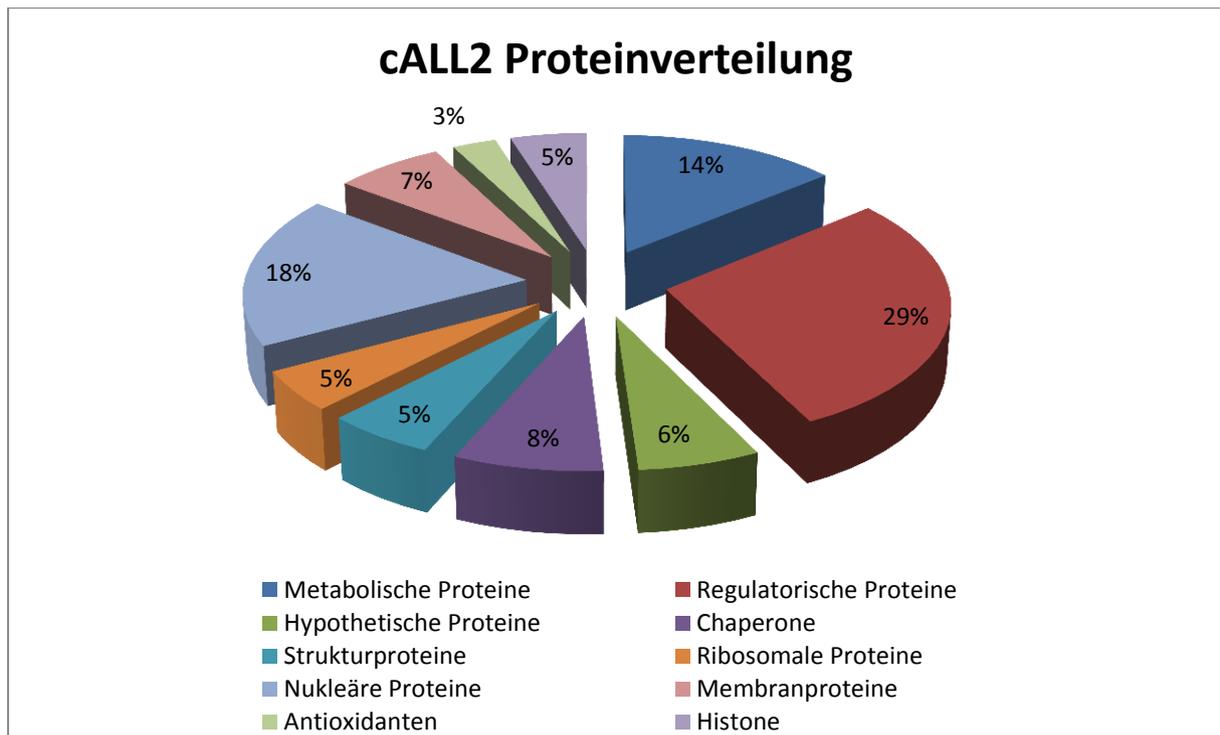


Abb. 24: Verteilung der identifizierten Proteine in cALL2-Zellen. 109 mit der 1D-Gel-CE-MS/MS Methode identifizierte Proteine wurden nach ihrer biologischen Funktion in der Zelle dargestellt.

4.5 Proteinquantifizierung

4.5.1 Vorversuche

Die eingesetzten Zelllinien cALL2 und cALL3 haben eine unterschiedliche Biologie in Hinblick auf ihr Ansprechen auf Prednison. Daher sollten sie sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden und verschiedene Proteine bzw. Proteine mit unterschiedlicher Konzentration nachweisbar sein. Um diesen quantitativen Unterschied genau abbilden zu können, wurde die ICPL Markierungstechnik (siehe 2.6.1) angewandt.

Zunächst wurde eine Reihe von Proteingemischen hergestellt, für die bekannte Proteine zunächst mit der leichten bzw. der schweren ICPL-Markierung versehen und dann in vorgegebenen Verhältnissen gemischt wurden (Tabelle 5). Diese Mischungen wurden dann mittels SDS-PAGE getrennt (Abb. 48)

Tabelle 5: Verwendete Standardproteine für ICPL.

<u>Protein</u>	<u>MW</u>	<u>Theoretisches Verhältnis</u>	<u>Gemessenes Verhältnis</u>	<u>#Peptide /Score</u>
1.BSA	69,3 kDa	1:1	1:0,89	4/254
2.Ovalbumin	42,7 kDa	4:1	4,11:1	3/458
3.Carboanhydase II	28,9 kDa	1:2	1:1,92	3/104
4.Ubiquitin	8,5 kDa	1:8	-(*)	-(*)

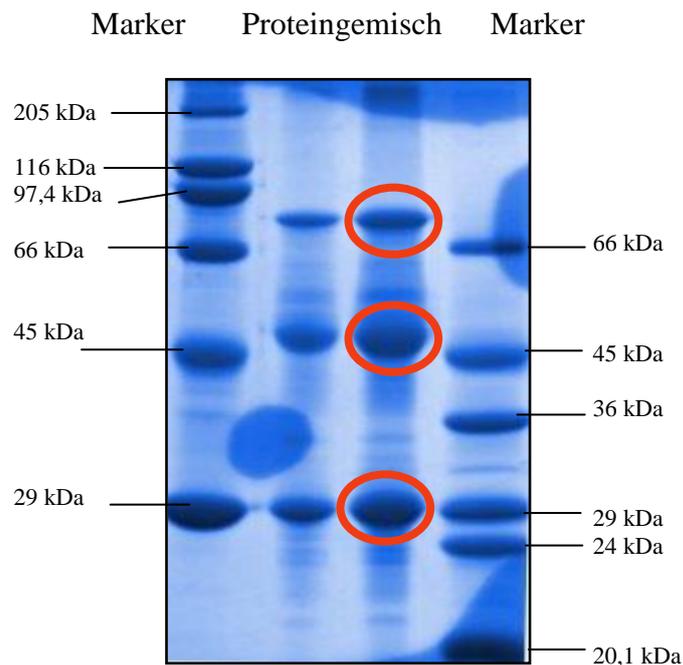


Abb. 25: SDS-PAGE ICPL-markierter Standardproteine. Zwei Konzentrationen des Proteingemisches wurden in jeder Spur in einem eindimensionalen SDS-Gel (5-15% Gradient) getrennt und mit Coomassie Blue® gefärbt. Die rote Kreise markieren die Proteinbanden von BSA (70kDa), Ovalbumin (47 kDa) und Carboanhydase II (29kDa)

Nachdem die markierten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und in der CE-MS Kopplung analysiert wurden, wurden die Spektren in der MSDB-Datenbank gesucht, wobei die ICPL-Modifikationen an Lysinresten als feste Modifikation vorgegeben wurde. Dabei konnten alle Proteine mit signifikanten Mascot Scores identifiziert werden (Tabelle 5). Pro Protein wurden mehrere Peptide identifiziert und diejenige, die ein Lysin enthielten, waren vollständig markiert. So konnten für die leichte und die schwere Versionen der ICPL-Markierung EICs bestimmt werden. Die Quantifizierung der Proteine wurde anhand der Peakflächen der EICs der Precursormassen aller markierten Peptide ermittelt. Die resultierenden Peakflächen wurden dann zur Quantifizierung herangezogen. Die gemessenen

Verhältniswerte entsprachen den theoretisch vorgegebenen. Beispielhaft ist ein doppelt markiertes Peptidsignal des Ovalbumins in Abb. 49 gezeigt.

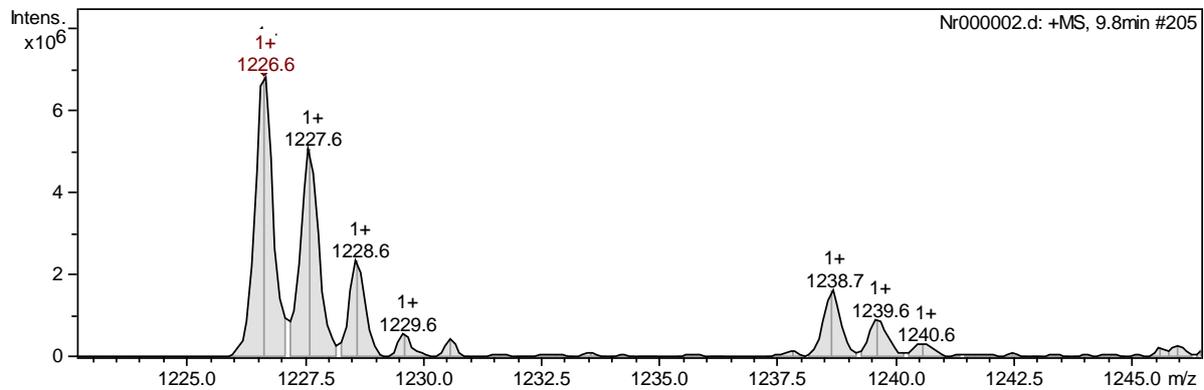


Abb. 49: MS Massenspektrum eines zweifach mit ICPL markierten Peptides aus Ovalbumin. $([M+H]^+$ 1226.6 m/z) Die Massendifferenz beides Signale beträgt 12.1 Da.

Für die Quantifizierung wurden die EICs erzeugt und mithilfe der DataAnalysis Software, die relative Peakflächen bestimmt, berechnet. Für das schwerere Peptid betrug diese 25.6% der leichten Variante, das mit dem eingesetzten Verhältnis von 4:1 sehr gut übereinstimmt (Abb. 50).

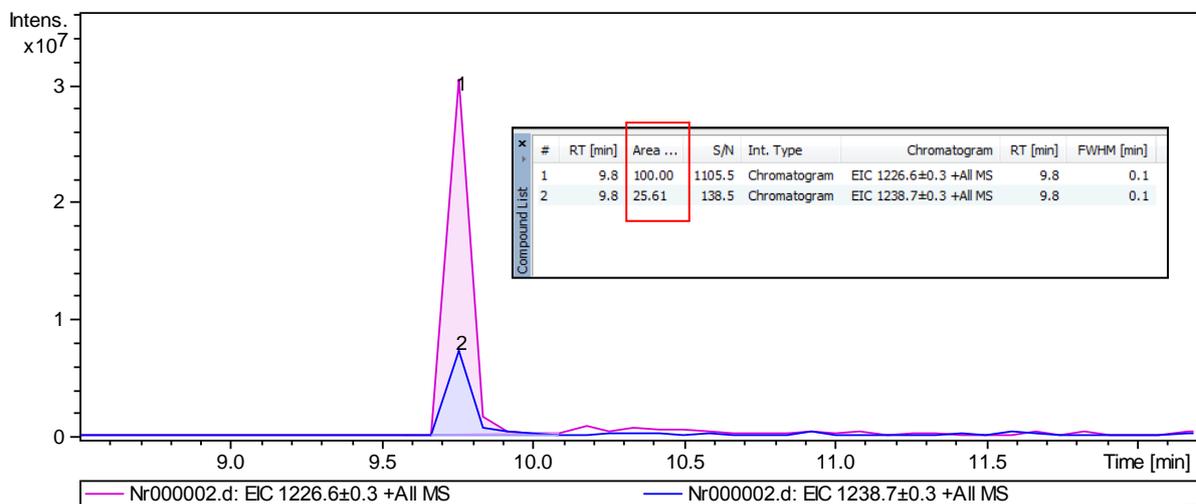


Abb. 50: Extracted Ion Chromatogramme der doppelt ICPL markierten Peptide. Die EICs zeigen die einfachgeladenen Peptidsignale $1.226,6 \pm 0,3$ m/z und $1.238,7 \pm 0,3$ m/z des tryptischen Ovalbumin Verdaus.

4.5.2 Proteinquantifizierung in cALL2 und cALL3 Zellen

Nachdem die ICPL Methode geprüft war, sollte das Proteom der Zelllinien cALL2 und cALL3 verglichen werden. Nach der Markierung der Proteine mit dem ICPL-Reagenz wurden diese im eindimensionalen SDS-Gradientengel (5-15%) getrennt (Abb. 51).

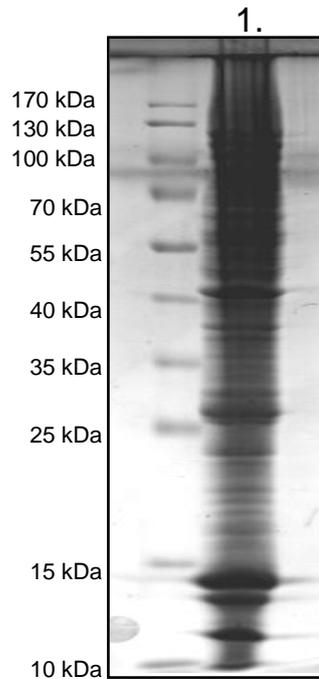


Abb. 51: Trennung der gemischten Proteinextrakte aus cALL2- und cALL3-Zellen. 200 µg Proteine aus dem cALL2/cALL3 ICPL Experiment wurden in Spur 1. in einem eindimensionalen Gel (5-15% Gradient) getrennt und mit Coomassie Blue® gefärbt. Die Massen von Markerproteinen sind an der linken Seite gezeigt. Die komplette Spur wurde in 121 gleichmäßige Gelstücke geschnitten und für CE-MS/MS-Analyse weiterverarbeitet.

Insgesamt konnten in den 121 Gelstücken 109 Proteine identifiziert werden, von denen 54 unterschiedlich waren (Anhang 4). In 27 Proteinen wurden insgesamt 56 ICPL markierte Peptide gefunden von denen 3 sowohl die leichte als auch die schwere Markierung enthielten. (siehe Tabelle 6)

Tabelle 6: Mit ICPL Markierung identifizierte regulierte Proteine in cALL2 / cALL3 Zellen.

Protein	Score	#Peptide	H/L Ratio
Nucleoside diphosphate kinase	87	4	1.18
Macrophage migration inhibitory factor	66	3	0.79
Histone H4	155	3	1.05

5. Diskussion

Nachdem im Jahre 2003 das humane Genom entziffert wurde, richteten sich wissenschaftliche Fragestellungen auf DNA-Modifizierungen, das Transkriptom, das Metabolom und das Proteom. In der Proteomforschung sollen die Proteine, für die die genetische Information vorliegt, nun analysiert werden. Während das Genom eines Organismus sehr statisch ist und sich nur wenig z.B. durch Mutationen oder epigenetische Ereignisse verändert, variiert das Proteinprofil verschiedener Zellen. Je nach Typ, Lokalisierung, Funktion, Differenzierung, Reifegrad, Umwelteinwirkungen usw. ist das Proteom sowohl räumlich als auch zeitlich einem dynamischen Wandel unterzogen. Die posttranslationalen Modifikationen erhöhen zusätzlich die Diversität und Komplexität des Proteoms. Daher sind nur „Momentaufnahmen“ des Proteoms von Zellen gleicher Zellphase möglich, ein komplettes Proteom eines Organismus besteht also aus unzähligen solchen Momentaufnahmen. Dieses Gesamtbild aufzubauen wird trotz immer schnellerer und effektiverer bioanalytischer Methoden wesentlich noch viel mehr Zeit erfordern und der Vorgang setzt eine weiterhin so schnelle technische Entwicklung voraus.

Eine weit verbreitete und etablierte Methode für Proteintrennung und -analyse ist die SDS Gelelektrophorese. Nach geeigneter Färbung erscheinen dann die Proteine als voneinander aufgetrennte Banden oder Spots, ihre Identität bleibt jedoch erstmal unbekannt. Man kann spezifische Antikörper verwenden, um mittels Western-Blot-Verfahren die Proteine zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Entwicklung von Antikörpern ist jedoch aufwendig und nur auf ein Protein ausgelegt, ein Screening vieler Proteine ist nicht möglich. Unbekannte Proteine kann man mittels Edman-Abbau sequenzieren, bei dem die Peptidkette schrittweise vom N-terminus her abgebaut wird^[47]. Posttranslationale Modifikationen können dabei jedoch nur schwer detektiert werden.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie können diese Methoden effektiv ergänzt werden. Werden die Proteine mit Trypsin verdaut, können die entstandene Peptide mittels chromatographischer Trennmethode, wie Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) oder Kapillarelektrophorese (CE) voneinander separiert werden und nach Elution z.B. direkt in eine Elektrospray-Quelle injiziert und dort ionisiert werden. Die Peptidtrennung mit der CE bietet einige Vorteile gegenüber der HPLC. Neben der höheren Trennleistung (theoretische Bodenzahl 10^7 bei der CE, bei der HPLC sind es 10^3 - 10^5 je nach verwendetem

Säulenmaterial^[57]) sind die Robustheit der Instrumente, geringerer Proben- und Lösemittelverbrauch und eine größere Matrixtoleranz als bei der HPLC zu nennen. Die relativ hohe Trenngeschwindigkeit und kurze Regenerationszeiten der Kapillare sind besonders bei umfassenden Proteomanalysen mit hoher Probenanzahl sehr zeiteffizient.

So wurden bereits 2003 von Kaiser et al. in einem einfachen Kapillaronenelektrophorese-MS (CZE-MS) Lauf mit Verwendung einer unbeschichteten Quarzglas Kapillare und einem Time-of-flight (TOF) Massenspektrometer 600 Polypeptide aus Dialyseflüssigkeiten identifiziert^[58]. Die gleiche Arbeitsgruppe fand mehrere potentielle Biomarker bei vergleichenden Analysen von Urinproben gesunder Freiwilliger bzw. Patienten mit Nierenerkrankung^[58, 60]. Dieses Analysensystem wurde ebenfalls auf Urinproben von Patienten mit allogenen Knochenmark- oder Stammzelltransplantationen angewandt, um erfolgreich Biomarker für die Transplantat-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease (GvHD)) zu finden^[61]. Da hier nach Polypeptiden mit unbekanntem Modifikationen und anderen Degradationsprodukten von Proteinen gesucht wurde, hat man ein Massenspektrometer gewählt, welches schnell genug für die scharfen CE Peaks ist und durch die hohe Massenauflösung die exakte Masse dieser Polypeptide und damit mögliche Summenformeln liefern kann, allerdings keine MS/MS Fragmentierungskapazität besitzt.

Für die vorliegende Arbeit wurde ebenfalls ein Kapillarelektrophoresesystem gewählt und statt eines *time-of-flight* Massenspektrometers wegen der Fragmentierungseffizienz und –sensitivität ein Ionenfallen-Massenspektrometer eingesetzt. Die hier untersuchten tryptischen Peptide sind in der NCBI Inr Datenbank vorhanden und mit der Mascot Suchmaschine können die erzeugten MS/MS Spektren sehr effektiv und automatisiert gesucht werden. Hierfür sind die Scangeschwindigkeit und die Massenauflösung einer Ionenfalle ausreichend und die hohe MS/MS Empfindlichkeit ist bei niedrigabundanten Peptiden von Vorteil. Ionenfallen-Massenspektrometer zeichnen sich außerdem durch den niedrigen Zeitaufwand für Kalibrationsvorgänge und die großen Serviceintervalle aus. Diese Betriebsstabilität gepaart mit der Robustheit der Kapillarelektrophorese macht die Kopplung der beiden Geräte ideal für Hochdurchsatz-Proteomanalysen mit vielen Proben. Diese Kombination beider instrumentellen Techniken wurden 2002 von Neusüß et al.^[62] vorgestellt und bildete für die vorliegende Arbeit die Grundlage.

In der CE werden hauptsächlich geladene Analyten voneinander aufgetrennt. Dies ist ideal für eine Elektrospray-Ionisierung der polaren und ionisierten Peptide. Voraussetzung einer CE-MS Kopplung ist ein geschlossener Stromkreis an der Spraynadel der Ionierungsquelle,

welche bei den sehr kleinen Flußraten der CE arbeiten kann. Der Stromfluß, der typischerweise in der CE verwendet wird, liegt um eine Größenordnung höher, als der im Elektrospray. Damit dieser Effekt die Ionisationseffizienz in der Quelle nicht beeinflusst, müssen beide Stromkreise voneinander entkoppelt werden. Die Verwendung hoher Stromstärken in der CE, solange diese die Kapillare nicht erhitzen und damit Auswirkungen auf die Trennung hätten, resultiert in hohen Feldstärken und den damit verbundenen schnelleren und effektiveren Trennungen. Die Erdung des Elektrospray-Sprühkopfes und Anlegen der ESI Spannung am selbigen umgeht diese Probleme. Voraussetzung hierfür ist die MS-seitige Hardwareunterstützung der Erdung des Sprayers.

Die Kapillarzonenelektrophorese basiert auf die Trennung der Peptide aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld. Sie ist für CE-MS Anwendungen wegen den verwendbaren flüchtigen Elektrolyten gut geeignet. Mithilfe dieser kann ein breiter pH-Wertbereich von 2-12 erreicht werden, solange keine speziellen Hintergrundelektrolytadditive wie Mizellen (für mizellarelektrokinetische Chromatographie, MEKC), Gele (Kapillargelelektrophorese CGE) oder Ampholyten (isoelektrische Fokussierung, CIEF) verwendet werden. Neben Wasser können auch nichtwasserbasierende CE-MS (*non-aqueous* CE-MS, NACE-MS) Verfahren genutzt werden. Bei biologischen Proben, wie Peptiden, welche wasserbasierend sind, findet dies selten Verwendung^[67]. Die CIEF bietet hohe Effizienz bei Proteinanalysen und wird für sehr komplexe Proben, wie Zelllysate verwendet. Die Limitierung der Kopplung dieser CE-Technik zur MS liegt in der Flüchtigkeit der Ampholyten und im Transfer der sehr schmal fokussierten Zonen. Als Lösung für das letztere Problem wurde die gravimetrische Mobilisierung gefunden^[68,69]. Damit die Ampholyten nicht mit der Ionisierungseffizienz des Elektrosprays interferieren, wurde ein Dialyseinterface entwickelt^[70]. Die Mehrheit der publizierten CIEF-MS Anwendungen schaltet jedoch noch eine zweite Trenndimension wie *reversed phase chromatography* vor die eigentlichen CE-Analyse und verwendet ein Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR MS)^[67].

Die Kombination von CGE und MS wird routinemäßig für DNA Sequenzierung, Oligonukleotidbestimmung oder für Analyse intakter Proteine eingesetzt. Die Gele und ihre Bestandteile reduzieren allerdings die Ionisationseffizienz im MS sehr und kontaminieren es auch schnell^[71,72,73].

Werden Mizellen bei der elektrophoretischen Trennung verwendet, verändern sie ihre Selektivität durch ihr pseudochromatographisches System und auch neutrale Analyten können

aufgetrennt werden. Die Mizellenbildenden Detergentien, wie Natriumdodecylsulfat, sind aber starke Inhibitoren für ESI Quellen. Deshalb müssen weitere Schritte unternommen werden, damit diese Detergentien und ihre Monomere nicht ins MS geraten, wie z.B. die gegenmigrierende Mizellen oder APCI Ionisierung^[75,76,77].

Wesentlich einfacher ist die Handhabung beim pH-vermittelten Stacking, wo der zwitterionische Charakter der Peptide für die Anreicherung verwendet wird (funktioniert im Prinzip für alle schwachen Säuren oder Basen). Entweder wird die Probe basisch eingestellt und wandert dann in einem ersten Schritt weg vom Detektor^[24] oder der Analyt wird in einem Pfropfen aus basischen Elektrolyten aufkonzentriert^[25], welches Prinzip auch in Kombination mit SPE und organischen Lösungsmitteln^[26] verwendet werden kann.

Für die vorliegende Arbeit wurde letzteres Verfahren, genannt „pH vermittelte, transiente Isotachophorese“ wegen seiner universellen und einfachen Umsetzbarkeit gewählt. Die Injektion von einem kleinen Pfropfen einer Ammoniak-Lösung wird von der Injektion der angesäuerten Probe gefolgt. Beim Einschalten der Spannung wandern die nun protonierten Peptide soweit, bis sie die Ammoniak-Zone erreicht haben und entladen sich. Dies erfolgt solange bis der Ammoniak-Pfropfen von der Probe und dem Puffer angesäuert ist. Durch ein größeres Probenvolumen im Vergleich zum Ammoniak-Pfropfen erhält man eine Erhöhung der Analytkonzentration. Die Methode ist auch geeignet, um phosphorylierte Peptide zu analysieren. Durch die Phosphogruppe am Molekül trägt das Peptid auch eine negative Ladung und ihre Retentionszeit verschiebt sich im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Peptid^[74].

Die Vorversuche zur Optimierung der Peptidtrennung in der Kapillarelektrophorese haben ergeben, dass die diversen Parameter einen unterschiedlichen Einfluß auf die Trennung hatten. Dabei hat sich gezeigt, dass die Kapillarelektrophorese, d.h. die Effizienz der Auftrennung der Peptide wesentlich entscheidender für die Proteinidentifikation war, als die Parameter im Massenspektrometer. Für das MS wurden als Ausgangsparameter die Einstellungen von Neusüß et al. gewählt^[62].

Als Versuchsstandard wurde hier 70 fmol eines tryptischen Standardverdaus von BSA eingesetzt. In der Literatur wird als LOD für einzelne Standardpeptide eine absolute Konzentration von 500 amol^[62] angegeben. Für die eindeutige Identifikation für Peptidgemische werden allerdings Peptidmengen im unteren fmol-Bereich benötigt. Wir

erreichten bei 15 fmol eines BSA Verdaus (20 nl Probenbeladung) einen Mascot score von 236 und kommen somit den publizierten Ergebnissen nahe und befinden uns in einem Konzentrationsbereich für nanoHPLC/MS Systeme. Für *sheathless* CE-MS Gerätekopplungen wurden unter 1 fmol als Nachweisgrenze für Peptide berichtet [63], jedoch ist die Stabilität des Elektrosprays bei solchen Interfaces störanfälliger. Die in dieser Arbeit verwendete *sheathflow* CE-MS ist dagegen wesentlich robuster und wurde deshalb verwendet. Für die Routinemessungen wurde vor und nach jeder Probenserie (12-48 Proben) 70 fmol BSA als Standard eingesetzt, um die Gesamtleistung der CE-MS-Kopplung regelmäßig überprüfen zu können.

Für die in der CE verwendete pH vermittelte, transiente Isotachophorese waren die Pufferkonzentrationen und Lösungsmittelzusammensetzung der eingesetzten Puffer, Kapillarlänge, Kapillardurchmesser und Probenvolumen entscheidend. Erhöht man die von Neusüß et al. empfohlene 10% Acetonitril auf 20%, verringert sich der erreichte Mascot score von 503 zu 153 und die Sequenzabdeckung von 22% auf 5%, da eine höhere Acetonitrilkonzentration zu reduzierter Dissoziation der geladenen Peptide von der Quarzglaskapillarwand führt und die Sensitivität verringert. Der gleiche Effekt tritt auf, wenn Acetonitril gegen Methanol austauscht wird. (Bei 10% Methanol sinkt der Mascot score von 312 zu 199 und die Sequenzabdeckung von 11% auf 7%) Die Konzentration der Ameisensäure wurde so gewählt, dass bei angelegten 30kV durch die Kapillare 50-70 μ A Strom floss. Bei 50 μ m Kapillarinne Durchmesser konnte bei maximaler Probenbeladung (10 % des Kapillarvolumens) keine ausreichende Signalintensität der Peptide erreicht werden, bei ID = 100 μ m wurde die Trennleistung der ITP CZE verringert. Als Optimum für die Analyse im vorgegebenen Setup hat sich eine Kapillare mit einem ID von 75 μ m erwiesen. Mit Spülen und Neukonditionierung der Kapillare nach 30 Minuten Gradienten konnte eine Laufzeit von 35 Minuten erreicht werden und ist somit unter Anbetracht der 70% längeren Kapillare mit der Literatur vergleichbar (Neusüß et al. 50 cm / 20 min).

Da die Kapillare fast vollständig temperiert werden konnte, waren die Retentionszeiten der Peptide gut reproduzierbar und stabil. Kleinere Abweichungen waren möglich, diese beeinflussten jedoch nicht die Identifikation der Peptide.

Die von Neusüß et al. beschriebene Lebensdauer der Kapillare von mehreren Monaten ließ sich jedoch nicht reproduzieren. Als Schwachstelle hat sich der Bereich der Kapillare erwiesen, welcher nicht mehr von der CE auf +15°C gehalten wurde, sondern sich frei in der

Luft oder im CE-MS Sprayerkopf befand. Hier wurde nach 10-14 Tagen die Beschichtung der Kapillare spröde und das Quarzglas brüchig. Dies machte sich durch Stromabbrüche während der Analyse bemerkbar, so dass die Kapillare erneuert werden musste.

Um das Spray für die Elektrospray-ionisierung zu gewährleisten wurde mit einer Spritzenpumpe ein Fluß von 3µl/min eingestellt, der optimales Spray und optimalen Ionentransfer in das MS ermöglichte. Neben Elektrospray (ESI) sind bereits andere Ionisierungstechniken für Massenspektrometer beschrieben worden. Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) werden z.B. für Metallbestimmungen in biologischen Proben verwendet^[64], Die Atmosphärendruck-Photoionisation (engl. *Atmospheric Pressure Photo Ionization*, APPI)^[65] und die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI)^[66] funktionieren ähnlich dem ESI Prinzip, nur wird die Ionisierung mittels einer Entladungslampe bei APPI oder chemisch mit einer nadelförmigen Elektrode sog. Koronanadel erreicht. Diese etwas komplexeren Techniken funktionieren auch mit nichtflüchtigen Additiven wie Phosphat, erzeugen keine Adduktionen, eignen sich aber mehr für spezielle CE-Anwendungen. Für Peptidanalysen bieten sie keinen zusätzlichen Vorteil und werden daher nicht verwendet.

Um die EPC Zielzellen analysieren zu können, wurden wegen ihrer Ähnlichkeit zuerst mit den bereits in der Literatur beschriebenen HUVEC Zellen^[42,43] die CE-ESI-MS/MS Methode etabliert und optimiert. Die zusammengefasste Liste dieser beiden Publikationen enthält 107 unterschiedliche Proteine. Die Schnittmenge der gefundenen Proteine zwischen der kombinierten Liste von Bruneel *et al.* und dieser Arbeit beträgt 30 Proteine. Es handelt sich hauptsächlich um hochabundante Proteine. Vergleicht man graphisch (Abb. 52) diese komplette Liste nach ihrer biologischen Funktion mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, so sieht man eine annähernde Übereinstimmung bei der relativen Verteilung identifizierter Proteine. Am höchsten sind in beiden Fällen die Strukturproteine vertreten, gefolgt von regulatorischen oder metabolischen Proteinen, wobei in dieser Arbeit prozentual mehr metabolische Proteine gefunden wurden. Diese und die weiteren Unterschiede bei den Proteingruppen niedrigerer Abundanz können auf die leicht voneinander abweichende 2D-Geltrennparameter zurückgeführt werden. Die IEF erfolgte zwischen pH 3-10 in dieser Arbeit, bei Bruneel *et al.* zwischen pH 4-7. Im schmaleren pH Bereich können die Proteine besser fokussiert werden, jedoch verliert man die Proteine mit einem pI Wert über 7. So konnten in dieser Arbeit sechs Membranproteine und eine höhere Anzahl an nukleären Proteinen gefunden werden.

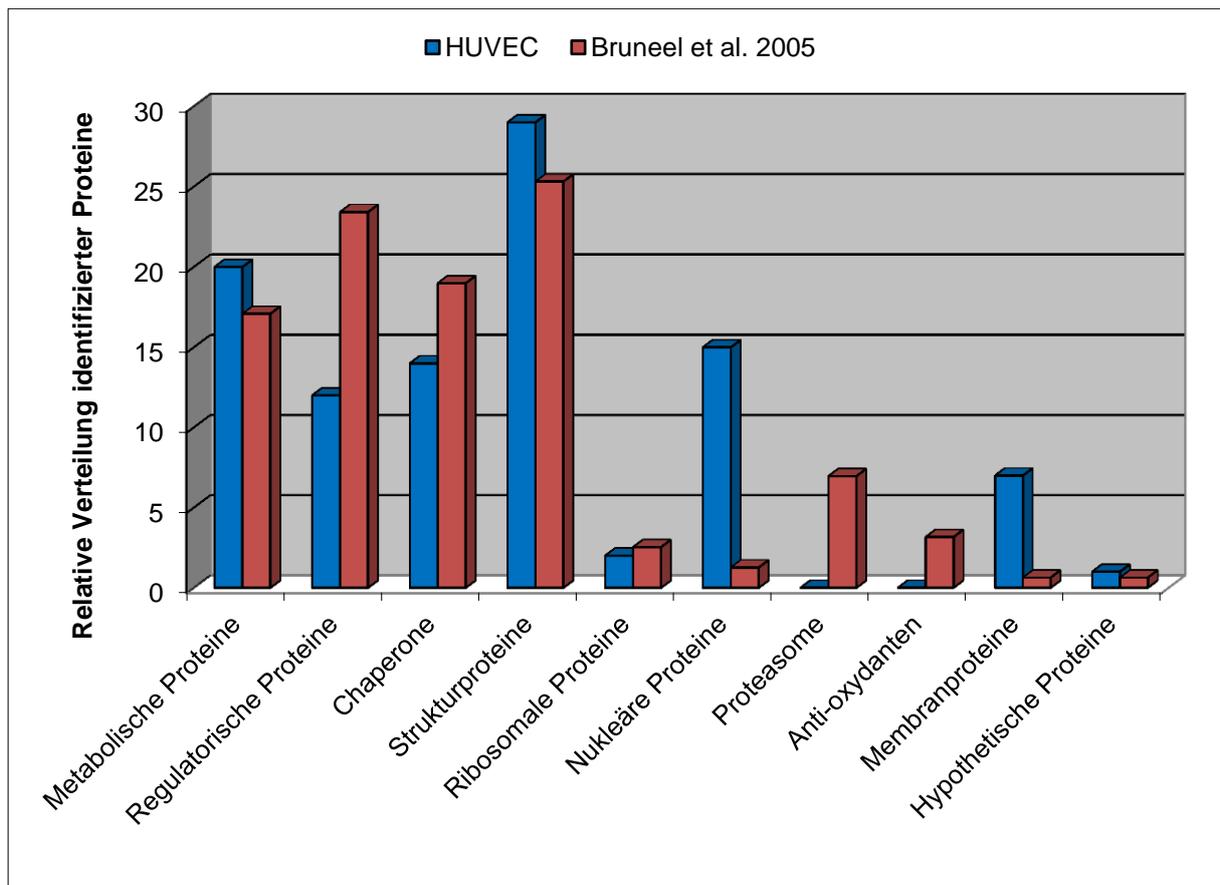


Abb. 26: Vergleichende Darstellung der absoluten Anzahl gefundenen Proteine nach ihrer biologischen Funktion. Die Proteine aus dieser Arbeit sind blau dargestellt, die im Jahre 2005 publizierten Ergebnissen von Bruneel et al.^[43] in rot.

35,3% der in dieser Arbeit identifizierten Proteine stimmen mit den bereits publizierten Resultaten überein. Der Unterschied der restlichen identifizierten Proteine basiert auf der verwendeten unterschiedlichen 2D-Gel-methode und der Tatsache, dass das methodische Ausstechen der Proteinspots aus 2D-Gelen nicht realisierbar ist. Die Proteinspots wurden absteigend ihrer Farbintensität mit Coomassie-Blau ausgewählt, so dass man zuerst die Proteine mit hoher Abundanz analysiert. So wurden in Übereinstimmung mit der Literatur mindestens in 25 Spots Proteine gefunden, die am Cytoskelett beteiligt sind (z.B. Actin (Spot Nr. 19-20), Tropomyosin (Spot Nr. 23, 81-82), Tubulin (Spot Nr. 13), Vimentin (Spot Nr. 10-18) usw.) oder bei der Zellmotilität und zellulären morphologischen Veränderungen bei der Angiogenese eine Rolle spielen. Desweiteren wurden Proteine der Glykolyse (z.B. Fructose-Bisphosphat Aldolase (Spot Nr. 106), Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (Spot Nr. 107) usw.) sowie 12 unterschiedliche Chaperone gefunden (z.B. Heat shock protein 27kDa,

60kDa, 70kDa). Chaperone sind spezialisierte Proteine, welche bei der Faltung / Entfaltung und Zusammenbau / Abbau anderer Proteine und Nucleosome assistieren^[49].

Die Ergebnisse der EPC Experimente ergaben neben den bereits erwähnten Proteinen auch Hämoglobin (Abb. 40, Spot Nr. 117). Es ist bekannt, dass ausdifferenzierte humane endotheliale Zellen in der Lage sind, zellfreies Hämoglobin aufzunehmen^[42,46]. Da die EPCs aus humanem Vollblut gewonnen werden, könnte es sich allerdings auch um eine Kontamination handeln. Die Aufarbeitung des Vollblutes und die daraus folgenden zahlreichen Zellwaschgänge der EPCs verhindert dies jedoch. Aber die Tatsache, dass Hämoglobin auch in endothelialer Vorläuferzellen wie EPCs nachweisbar ist, lässt vermuten, dass diese Zellen Hämoglobin auch *de-novo* synthetisieren können. Diese Hypothese müsste jedoch weiter untersucht werden. Verglichen mit den HUVEC Zellen wurden in den EPCs vermehrt Histone gefunden. Histone sind die Hauptbestandteile des Chromatins. Die Synthese von Histonen ist mit der DNA-Replikation während der S-Phase (Mitose) synchronisiert^[49]. Von den fünf bekannten Histon-Typen wurden auf dem EPC Gel drei gefunden (Histon H2A, H2B, H4). Diese zusammen mit Histon H3 sind sog. Kern-Histone, welche ein oktamer Nucleosom bilden. Wenn die Expressionsniveaus von Histonen in der Zelle erhöht sind, deutet das auf eine ebenfalls erhöhte DNA Replikation und eine damit verbundene gesteigerte Translation und Proteinbiosynthese.

Die identifizierten Proteine wurden auch anhand ihrer Funktion in der Zelle sortiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der HUVEC-Experimente wurden am meisten metabolische und regulatorische Proteine, gefolgt von Strukturproteinen identifiziert (Abb. 41) und überwiegen insgesamt im Vergleich zu den anderen Proteingruppen (zusammen 61% bei HUVECs und 77% bei EPCs). Eine mögliche Ursache dafür wäre die Tatsache, dass die ersten Ergebnisse von ruhenden HUVEC Zellen stammten, während die EPCs bereits 4 Tage nach der Vollblutentnahme geerntet wurden, so dass sie sich noch in der Wachstumsphase befanden. Dies könnte ebenfalls die erhöhte Abundanz der unterschiedlichen Histone erklären.

Der größte Nachteil der 2D PAGE ist die mangelnde Reproduzierbarkeit, Proteine über ca. 100kDa werden nicht mehr voneinander aufgetrennt, die Anzahl der mit Massenspektrometrie identifizierbaren Spots liegt unter 1000^[33]. Geschätzte 30% der Proteine in einer Zelle sind Membranproteine. Diese lassen sich jedoch nicht auf dem 2D Gel separieren, spielen allerdings in der Signaltransduktion, Zelladhäsion, Ionen-transport und weiteren Prozessen in

der Zelle eine wichtige Rolle und sind somit von besonderem Interesse. Ausserdem haben ca. ein Drittel der zellulären Proteine ihren isoelektrischen Punkt über pH 7 und erfordern speziell angepasste IPG Streifen^[56]. Für diese Arbeit wurde die 2D Gelelektrophorese als anfängliche Proteintrennmethode gewählt. Dieses Verfahren ist bereits solide etabliert und die Probenkomplexität der einzelnen Proteinspots ist sehr niedrig ist, was die massenspektrometrische Analyse erleichterte.

Wurde statt 2D Gelelektrophorese ein 5-15% 1D-SDS-Gradientengel zur Proteintrennung verwendet, wurden mehr Proteine identifiziert (85 Proteine bei 2D-HUVEC, 109 Proteine bei 1D-cALL2) Die 1D Gelelektrophorese bietet den Vorteil, dass mit weniger technischem Aufwand auch hydrophobe Proteine wie Membranproteine detektiert werden können. Jedoch wirkt sich hier die Proteinkomplexität negativ auf die Identifikationsrate aus. Da bei der 1D-Gelmethode das ganze SDS-Gel zerschnitten wird, ist die Verteilung der Proteine in den Gelstückchen ebenfalls nicht konstant. Es gab Bereiche, in denen sich keine Proteine nachweisen ließen. Besonders im höheren Molekulargewichtsbereich befanden sich in den Gelbanden sehr viele unterschiedliche Proteine, so dass nach dem tryptischen Verdau ein komplexes Gemisch an Peptiden entstand. Diese können viele überlappende Peptidpeaks in der CE-Trennung zur Folge haben, so dass das Massenspektrometer nicht genug Zeit hat, alle zu analysieren. Außerdem können sich die Peptidionen gegenseitig bei der Ionisierung bereits in der ESI-Quelle unterdrücken, was zu verringerten Signalintensitäten und niedrigeren MS/MS Fragmentqualitäten führen kann. Dies führt zu einer Unterdrückung von Signalen. Das Gleiche passiert vermutlich im großen Molekulargewichtsbereichen des Gels (ab ca. 100 kDa), da aus diesen großen Proteinen für die CE-Trennung zu viele Peptide entstehen. Trägt man die Anzahl der gefundenen Proteine pro Gelstreifen auf einer vertikalen Skala auf und vergleicht man dies direkt mit einem Photo vom Gel, ergibt sich, daß in den Stückchen 1-24 wegen der Probenkomplexität kein Protein eindeutig identifiziert werden konnte (Abb. 47). In den anderen Stückchen wurden 1-3 Proteine gefunden. Optisch leere Gelbereiche enthielten ebenso Proteine, wie intensiv gefärbte, was vermuten lässt, dass die massenspektrometrische Detektion von Proteinen nicht zwingend von ihrer Coomassie-Blau-Färbbarkeit abhängt.

Effektiv wäre für die 1D-Gel-MS zumindest das Fraktionieren der Zellen in eine zytosolische, eine Membran- und eine Zellkernfraktion. So könnte man auch die Proteinkonzentration bei gleichbleibender Proteinmenge für die ICPL Quantifizierung erhöhen, da im Rahmen dieser Arbeit für einen ICPL Ansatz lediglich 100 µg Protein eingesetzt werden konnten.

Vorversuche haben allerdings gezeigt, dass je mehr Protein auf das Gel geladen wird, desto besser wird die Identifikationsrate im Massenspektrometer. Da mit dem ICPL Reagenz die Lysinreste modifiziert werden, stellen sie damit keine tryptischen Spaltstellen mehr dar. Somit verhält sich Trypsin wie das Enzym Arg-C. Vorexperimente an Standardproteinen zeigten, dass alle Lysinreste, die man in der Mascot Suche finden konnte, auch mit voller Labelingeffizienz ICPL markiert waren. Man erhält dadurch wesentlich weniger Peptide, welche mitunter zu groß für das Ionenfallen-Massenspektrometer werden könnten (größer 4000m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$). Ausserdem erkennt die Steuersoftware des Massenspektrometers im datenunabhängigen AutoMSn –Modus nicht, dass zu einem Massensignal zusätzlich verwandte Massen, je nach Ladungszustand und Anzahl der Labelingstellen, +12, +6, +3 oder +2 m/z vorhanden sind und wählt trotz eingestellter dynamischen Active Exclusion lediglich fast immer den intensiveren Precursor für die MS/MS Fragmentierung aus. Damit ist es zu erklären, dass nur drei unregulierte Peptide von annähernd gleicher Intensität mit beiden Markierungen gefunden wurden. Leider stehen softwareseitig für das Ionenfallen-Massenspektrometer nur diese Funktionalitäten zur Verfügung. MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer wäre hier wesentlich besser geeignet, da hier die Auswahl der MS-Precursormasse gezielt auf die Massensignalaare erfolgen könnte. Auch andere isobarische Labelingstechniken wie iTRAQ wären mit dem MALDI-MS vorstellbar. iTRAQ labelt auf Peptidebene, d.h. man umgeht das Problem der maskierten tryptischen Spaltstellen. Die iTRAQ-Signalmassen bei Masse $114\text{ m/z} - 118\text{ m/z}$ sind allerdings wegen des 20% Fragmentierungs-Cutoff häufig mit IT-MS nicht nachweisbar. Hier könnte ein TOF Massenspektrometer besser eingesetzt werden. Für die Kopplung der Ionenfallen-Massenspektrometer mit der etablierten reproduzierbaren CE-Trennung wäre der Weg der markierungsfreien Quantifizierung (siehe 2.6) ebenfalls möglich, zumal mit dieser Methode der Markierungsschritt wegfällt. Da man bei der markierungsfreien Quantifizierung allerdings fünf technische Replikate für eine ausreichende Reproduzierbarkeit benötigt^[50], wären die schnellen online CE-MS/MS-Laufzeiten ein großer Vorteil, um die Experimente schnell durchführen zu können. Vergleichend sei hier die Analyse von SH-SY5Y Zellen mit 1D-Gel-LC-MALDI-MS/MS aufgeführt^[48]. Die reine Anzahl ohne Quantifizierung der so gefundenen Proteine inklusive aller Proteinfragmente und Isoformen betrug 3399, bei einem Aufwand pro Gelstückchen von zwei Arbeitstagen, so dass die LC-MALDI Analyse eines Gelstreifens, der in 30 Streifen geschnitten wurde, 60 Arbeitstage erfordert.

In dieser Arbeit wurde eine präzise, sensitive und reproduzierbare Methode für die Peptidanalyse mittels isotachophoretischer Kapillarelektrophorese, online gekoppelt an einem Ionenfallen-Massenspektrometer für eine *bottom-up* Applikation zur Proteomanalyse entwickelt, optimiert und an drei Zelllinien überprüft. Die Resultate sind mit den bereits in Publikationen veröffentlichten Ergebnissen in Menge und Qualität vergleichbar. So wurden bekannte Proteinfunde verifiziert und existierende Hypothesen, wie eine mögliche *de-novo* Synthese von Hämoglobin in endothelialen Zellen, bekräftigt.

7. Ausblick

Diese Arbeit sollte den Grundstein für die instrumentelle Analytik mit einer Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer für *bottom-up* Proteomics Applikationen legen. Die hier beschriebenen und angewandten Methoden könnten weiter verbessert und erweitert werden, um die Anzahl der identifizierten Proteine zu erhöhen. Neben dem Erhöhen der möglichen Beladung der CE-Kapillare kann dies sowohl instrumentell am MS (schnellere Scangeschwindigkeit, höhere Empfindlichkeit und größerer dynamischer Bereich des Massenspektrometers) als auch auf der Softwareseite geschehen. Könnte man bereits in der Mascot-Suche einmal identifizierte Peptide in einem erneuten CE-MS/MS-Lauf der gleichen Probe von der Aquisition der MS/MS Spektren dynamisch und automatisch ausschliessen, wäre die Analyse überlappender oder niedrigintensiver MS-Peptidsignale möglich. Mit der Fragmentierungstechnik *electron transfer dissociation* (ETD) könnten auch größere Peptide, welche mit CID nicht mehr fragmentieren, analysiert werden. Desweiteren ist ETD bei den in CID nicht analysierbaren posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung bzw. eventuellen CID-labilen Präparationsartefakten eine effektive Methode. Für nicht-isobare Quantifizierungsexperimente mit ICPL wäre die gezielte Precursor-Selektion markierter Peptide bereits im MS für die spezifische Identifikation von Vorteil. Für die markierungsfreie Quantifizierung kann neben der CE auch eine ebenso reproduzierbare Trennmethode wie die nanoHPLC mit dem MS gekoppelt werden. Werden dann durch die MS quantitative Ergebnisse erzielt, können die betreffenden Proteine mit weiteren anerkannten und etablierten biochemischen Methoden, wie z.B. Western Blots spezifisch untersucht und ihre Regulation verifiziert werden. Eine Verringerung der Peptidkomplexität, indem man sie in ihre unterschiedliche Zellkompartimente (Membrane, Mitochondrien, Zellkern und Cytoplasma) aufteilt^[51], würde in einer höheren Proteinanzahl resultieren, da dadurch vermehrt niedrigabundante Proteine bzw. deren Peptide erfasst würden. Durch Kombination unterschiedlicher chromatographischer Peptidtrennmethoden (nanoHPLC, CE) und Massenspektrometertypen (ESI und MALDI) können komplementäre Proteinlisten generiert werden. Schließlich könnte durch die Kombination aller Geräte, Analysen und Zellfraktionen mittels einer umfassenden Datenmanagementsoftware das Gesamtbild eines Proteoms der Zielzellen aufgestellt werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Asahara T, et al. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 (5302): 964–7
2. Purhonen S, et al. (2008) Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (18): 6620–5
3. Yoder MC, et al. (2007) Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 105(9) (5): 1801–9
4. Gao D et al. (2008) Endothelial Progenitor Cells Control the Angiogenic Switch in Mouse Lung Metastasis. *Science* 319 (5860): 195–198.
5. Nolan DJ et al. (2007) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes and Development* 21 (12): 1546–1558.
6. Mellick As, Plummer PN et al. (2010) Using the Transcription Factor Inhibitor of DNA Binding 1 to Selectively Target Endothelial Progenitor Cells Offers Novel Strategies to Inhibit Tumor Angiogenesis and Growth. *Cancer Research* 70 (18): 7273–7282.
7. Cardiovascular Outcomes *New England Journal of Medicine* 353 (10): 999–1007.
8. Shantsila E, et al (2007) Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *Journal of the American College of Cardiology* 49 (7): 741–52.
9. J unqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.: *Histologie*. Hrsg. von Manfred Gratzl, Springer Verlag, 2002.
10. Fishman, A.P. (1982) Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci*, 401: 1-8
11. Griendling, K.K., Alexander, R.W. (1996) Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *Faseb J*, 10(2): 283-92
12. http://de.wikipedia.org/wiki/Akute_lymphatische_Leukämie
13. Tomeczkowski et al. (1995) Absence of G-CSF receptors and absent response to G-CSF in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL cells. *Br J Haematol* 89: 771-779
14. Pennington, S.R., Wilkins, M.R., Hochstrasser, D.F., Dunn, M.J. (1997) Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends Cell Biol.* 7 (/1997) 168-173.
15. Aebersold R, Mann M (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422 (6928): 198–207
16. Islinger M, Eckerskorn C, Völkl A. (2010) Free-flow electrophoresis in the proteomic era: a technique in flux. *Electrophoresis*. 31(11):1754-63.

17. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics *Anal. Chem.* 73 (23): 5683–5690
18. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989 Oct 6;246(4926):64-71.
19. Karas M, Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 60(20):2299-301.
20. Tanaka, K. Waki, H. , Ido. Y., Akita S., Yoshida, Y., Yoshida T., Matsuo T. (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2, 151-153
21. Handbuch für Compass 1.1 / Esquire 3000^{plus} (2003) Bruker Daltonik GmbH, Bremen
22. John William Strutt, 3. Baron Rayleigh (1882) On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses Charged with Electricity. *Phil. Mag.* 5, Nr. 14, S. 184–186.
23. Dole M.; Mack L. L.; Hines R. L.; Mobley R. C.; Ferguson L. D.; Alice M. B. (1968). Molecular beams of macroions. *Journal of Chemical Physics* 49 (5): 2240–2249
24. Iribarne J. V.; Thomson B. A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics* 64 (6): 2287–2294
25. Roepstorff, P. and Fohlman, J. (1984) Letter to the editors. *Biological Mass Spectrometry*, 11: 601.
26. Richard S. Johnson, Stephen A. Martin, Klaus Biemann, John T. Stults, J. Throck Watson (1987) Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem.* 59 (21), pp 2621–2625
27. Drexler HG, Matsuo Y, MacLeod RA (2004) Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of erythroleukemia. *Leuk Res.* 28(12):1243-51.
28. Ogata Y, Charlesworth MC, Higgins L, Keegan BM, Vernino S, Muddiman DC.(2007) Differential protein expression in male and female human lumbar cerebrospinal fluid using iTRAQ reagents after abundant protein depletion. *Proteomics.* 7(20):3726-34.
29. Drummel-Smith J, Winstall E, Bergeron MG, Poirier GG, Ouellette M.(2007) Comparative proteomics analyses reveal a potential biomarker for the detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *J Proteome Res.* 6(12):4690-702. Epub 2007 Nov 13.
30. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.*19(3):1720-30.
31. Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, Aebersold R. (2002) Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics.* 1(4):323-33.
32. Glökler, J., Angenenedt, P. (2003) Protein and antibody microarray technology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 797, 229-240.

33. Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.
34. Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics*. 5(1):4-15.
35. Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W. (Hrsg.): *Bioanalytik*. 2. Aufl. 2006. 1.160 Seiten, 170 s/w Abb., 730 farb. Abb., 132 s/w Tab. Spektrum Akademischer Verlag. ISBN 3-8274-1520-9
36. Takayuki Asahara, Toyooki Murohara, Alison Sullivan, Marcy Silver, Rien van der Zee, Tong Li, Bernhard Witzenbichler, Gina Schatteman, Jeffrey M. Isner. (1997) Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis *Science* Vol. 275. no. 5302, pp. 964 – 966
37. Redona, C., Picha, D., Rogacoub, E., Sedelnikovaa, O., Newrokca, K., Bonnera, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2). 162-169.
38. 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.* 72:248-54.
39. Wessel D, Flügge UI. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138(1):141-3.
40. Laemmli UK .Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5
41. Jens Ohnesorge, Christian Neusüß, Hermann Wätzig, Quantitation in capillary electrophoresis-mass spectrometry *Electrophoresis* 2005, 26, 3973–3987
42. Arnaud Bruneel Bruno Baudin (2003) Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture, *Proteomics*, 3, 714–723
43. Arnaud Bruneel, Bruno Baudin (2005) Proteomics of human umbilical vein endothelial cells applied to etoposide-induced apoptosis, *Proteomics*, 5, 3876–3884
44. Bertram C, von Neuhoff N, Skawran B, Steinemann D, Schlegelberger B, Hass R. (2008) The differentiation/retrodifferentiation program of human U937 leukemia cells is accompanied by changes of VCP/p97. *BMC Cell Biol.* 15;9:12.
45. Gauci S, Helbig AO, Slijper M, Krijgsveld J, Heck AJ, Mohammed S. (2009) Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Anal Chem.* 81(11):4493-501.
46. Faivre-Fiorina B, Caron A, Fassot C, Fries I, Menu P, Labrude P, Vigneron C. (1999) Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. *Am J Physiol.* 1999 Feb;276(2 Pt 2):H766-7
47. Edman, P. (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem. Bd.* 22, S. 475

48. Mützelburg, Marika V.(2008) Quantitative proteome analysis of human neuroblastoma cells treated with Clostridium botulinum C3 exo-enzyme., Medizinische Hochschule Hannover, genehmigte Dissertation.
49. Ellis, R.J., Van der Vies, S.M. (1991) Molecular Chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321-347.
50. G. H. Dunteman: *Principal Component Analysis*. Sage Publications, 1989
51. Brunner E, Ahrens CH, Mohanty S, Baetschmann H, Loevenich S, Potthast F, Deutsch EW, Panse C, de Lichtenberg U, Rinner O, Lee H, Pedrioli PG, Malmstrom J, Koehler K, Schrimpf S, Krijgsveld J, Kregenow F, Heck AJ, Hafen E, Schlapbach R, Aebersold R. (2007) A high-quality catalog of the *Drosophila melanogaster* proteome. *Nat Biotechnol.* 25(5):576-83.
52. Asahara T, Masuda H, Takahashi T. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 85: 221-228.
53. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/childALL/HealthProfessional>
54. Guidelines for pediatric cancer centers. (2004) *Pediatrics*, 113(6): 1833-5
55. http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced_genomes/genome_guide_p1.shtml
56. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;97(17):9390-5.
57. Simpson DC, Smith RD. (2005) Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics. *Electrophoresis*; 26(7-8):1291-305.
58. Kaiser T, Hermann A, Kielstein JT, Wittke S, Bartel S, Krebs R, Hausadel F, Hillmann M, Golovko I, Koester P, Haller H, Weissinger EM, Fliser D, Mischak H. (2003) Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry to establish polypeptide patterns in dialysis fluids. *J Chromatogr A.*; 1013(1-2):157-71.
59. Wittke S, Fliser D, Haubitz M, Bartel S, Krebs R, Hausadel F, Hillmann M, Golovko I, Koester P, Haller H, Kaiser T, Mischak H, Weissinger EM. (2003) Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers. *J Chromatogr A.*;1013(1-2):173-81.
60. Neuhoff N, Kaiser T, Wittke S, Krebs R, Pitt A, Burchard A, Sundmacher A, Schlegelberger B, Kolch W, Mischak H. (2004) Mass spectrometry for the detection of differentially expressed proteins: a comparison of surface-enhanced laser desorption/ionization and capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*;18(2):149-56.
61. Kaiser T, Kamal H, Rank A, Kolb HJ, Holler E, Ganser A, Hertenstein B, Mischak H, Weissinger EM. (2004) Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*; 104(2):340-9.

62. Neusüss C, Pelzing M, Macht M. (2002) A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*; 23(18):3149-59.
63. Kelly, J. F., Ramaley, L., Thibault, P., *Anal. Chem.* 1997, 69, 51–60.
64. Kannamkumarath SS, Wrobel K, Wrobel K, B'Hymer C, Caruso JA (2002) Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis. *J Chromatogr A.*; 975(2):245-66.
65. Nilsson SL, Andersson C, Sjöberg PJ, Bylund D, Petersson P, Jörntén-Karlsson M, Markides KE.(2003) Phosphate buffers in capillary electrophoresis/mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom.*;17(20):2267-72.
66. Tanaka Y, Otsuka K, Terabe S. (2003) Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.*; 30(6):1889-95.
67. Hernández-Borges J, Neusüss C, Cifuentes A, Pelzing M. (2004) On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biomolecules. *Electrophoresis.*; 25(14):2257-81. Review.
68. Tang W, Harrata AK, Lee CS. (1997) Two-dimensional analysis of recombinant E. coli proteins using capillary isoelectric focusing electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.*; 69(16):3177-82.
69. Yang L, Lee CS, Hofstadler SA, Pasa-Tolic L, Smith RD. (1998) Capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein characterization. *Anal Chem.*; 70(15):3235-41.
70. Lamoree M.H., Tjaden, U.R., Van der Greef, J. (1997) *J.Chromatogr.*; 777 31-39
71. Barry, J.P., Muth, J., Law, S.-J., Karger, B.-L., Vouros, P. (1996) *J.Chromatogr.*;732, 159-166
72. Harsch A, Vouros P. (1998) Interfacing of CE in a PVP matrix to ion trap mass spectrometry: analysis of isomeric and structurally related (N-acetylamino)fluorene-modified oligonucleotides. *Anal Chem.*; 70(14):3021-7.
73. Freudemann T, von Brocke A, Bayer E. (2001) On-line coupling of capillary gel electrophoresis with electrospray mass spectrometry for oligonucleotide analysis. *Anal Chem.*; 73(11):2587-93
74. Zand R, Li MX, Jin X, Lubman D. (1998) Determination of the sites of posttranslational modifications in the charge isomers of bovine myelin basic protein by capillary electrophoresis-mass spectroscopy. *Biochemistry.*; 37(8):2441-9.
75. Suomi J, Wiedmer SK, Jussila M, Riekkola ML.(2001) Determination of iridoid glycosides by micellar electrokinetic capillary chromatography-mass spectrometry with use of the partial filling technique. *Electrophoresis.*; 22(12):2580-7.

76. Frommberger M, Schmitt-Kopplin P, Menzinger F, Albrecht V, Schmid M, Eberl L, Hartmann A, Kettrup A. (2003) Analysis of N-acyl-L-homoserine lactones produced by *Burkholderia cepacia* with partial filling micellar electrokinetic chromatography--electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis*.; 24(17):3067-74.
77. Koezuka K, Ozaki H, Matsubara N, Terabe S. (1997) Separation and detection of closely related peptides by micellar electrokinetic chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry using the partial filling technique. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*; 689(1):3-11.
78. Aebersold, R., Morrison, H. D., (1990) Analysis of dilute peptide samples by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*; 516, 79–88.
79. Schwer, C., Lottspeich, F.(1992) Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems. *J. Chromatogr.*; 623, 345–355.
80. Tomlinson, A. J., Naylor, S., *J. Liq. Chromatogr.* 1995, 18,3591–3615.

9. Anhang

Anhang 1: Liste der identifizierten Proteine aus HUVEC Zellen

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq.cov. %	Score
1	Endoplasmin Transitional endoplasmic reticulum	ENPL_HUMAN	89.6	3.4	57
2	ATPase (TER ATPase)	TERA_HUMAN	89.1	10.7	248
3	Heat shock 70 kDa protein	GRP78_HUMAN	72.2	20.5	461
4	Heat shock 70 kDa	HSP7C_HUMAN	75.6	19.7	555
5	HSP 70kD	Q8N1C8_HUMAN	73.8	11.7	250
6	Heat shock protein 60	CH60_HUMAN	61	31.2	710
7	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMAN	56.7	25.1	484
8	Calreticulin	CALR_HUMAN	48.1	8.4	139
9	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	57.1	15.2	223
10	Vimentin	VIME_HUMAN	53.5	39	603
11	Vimentin	VIME_HUMAN	53.5	22	255
12	Vimentin	VIME_HUMAN	53.5	14	277
13	Tubulin beta-7	TBB7_HUMAN	49.6	12.4	245
14	Vimentin	VIME_HUMAN	53.6	27	412
15	Vimentin	VIME_HUMAN	53.6	25	388
16	Vimentin	VIME_HUMAN	53.6	22	455
17	Reticulocalbin-1	RCN1_HUMAN	38.8	7.6	69
18	Vimentin	VIME_HUMAN	53.6	15	232
19	Actin Gamma	ACTG_HUMAN	41.7	43	481
20	Actin Gamma	ACTG_HUMAN	41.7	35	526
21	Nucleophosmin	Q6V962_HUMAN	32.5	14	113
22	Tropomyosin 3	Q5VU59_HUMAN	27.2	15	64
23	Annexin A2	Q8TBV2_HUMAN	38.8	35	449
24	Immunoglobulin heavy chain variant	Q9NPP6_HUMAN	24.2	22	53
25	Calumenin	CALU_HUMAN	43.2	42	85
26	Lamin C	LMNA_HUMAN	53.2	36	149
27	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	62.5	45	438
28	V-ATPase 116 kDa isoform a4	VPP4_HUMAN	60.9	35	124
29	V-ATPase 116 kDa isoform a4	VPP4_HUMAN	60.9	49	239
30	Alpha Enolase	ENO1B_HUMAN	47.3	35	173
31	JKT41-binding protein	HNRDL_HUMAN	27.5	21	95
32	Proteasome component C2	PSA1_HUMAN	29.8	19	90
33	ER Lumenal Protein 28	Q3YAI4_HUMAN	29.8	12	160
34	Heat shock 27 kDa protein	HSPB1_HUMAN	22.4	30	272
35	T4AL Kinase	A4I1T4_HUMAN	63.8	23	99
36	Transforming growth factor beta-1	TGFB1_HUMAN	36.8	22	90
37	60S ribosomal protein L15	RL15_HUMAN	34.4	15	82
38	Putative GTP-binding protein 6	GTPB6_HUMAN	38	20	135
39	Putative GTP-binding protein 6	GTPB6_HUMAN	38	31	160
40	F-Actin Capping Prot	CAPZB_HUMAN	31.4	42	239

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq.cov. %	Score
42	Peroxiredoxin-4	PRDX4_HUMAN	30.7	31	117
43	Ribosomal Protein L7	RL7I_HUMAN	29.9	11	77
44	S100P binding protein Riken	S1PBP_HUMAN	38.1	49	68
45	Ribosomal Protein L10	RL10_HUMAN	24.8	42	55
46	Ribosomal Protein L4-P.	RL4P_HUMAN	25.1	59	65
47	Hsp 24 DnaK nucleotide exchange factor	A0Y0A7_HUMAN	53.2	28	184
48	Keratin, type I cytoskeletal 13	K1C13_HUMAN	59.7	15	102
49	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	89.8	22	406
50	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	89.8	30	760
51	Tyrosine-protein kinase ITK/TSK	ITK_HUMAN	88.4	9	40
52	NADH-quinone oxidoreductase subunit M	NUOM_HUMAN	80.4	20	178
53	Heat shock 70 kDa protein	DNAK2_HUMAN	73.9	31	471
54	Osteonectin	SPRC_HUMAN	35.2	11	41
55	Mell. peptidase alpha	Q4X4M9_HUMAN	80.6	15	49
56	TBC1 domain family member 10B	TB10B_HUMAN	87.2	3	52
57	Endothelin-1	EDN1_HUMAN	25.05	19	60
58	Possible J 56 gene segment	A0N4V7_HUMAN	56.6	10	77
59	Heat shock 70 kDa protein 8	HSP7C_HUMAN	71	23	555
60	Lamin 1B	LMNB1_HUMAN	66.56	20	470
61	Lamin 1B	LMNB1_HUMAN	66.6	13	232
62	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN	38.8	37	439
63	T-complex protein 1	TCPA_HUMAN	60.8	8	138
64	Aldehyde dehydrogenase (NAD)	ALDH2_HUMAN	56.8	5	143
65	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	49.2	5	97
66	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	45.8	2	46
67	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMAN	57.1	20	322
68	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q5T6W5_HUMAN	19.7	7	80
69	Histone H2B-related protein	Q7Z2G1_HUMAN	19.6	6	75
70	Tropomyosin 4	TPM4_HUMAN	28.5	19	157
71	Tropomyosin 3	Q5VU59_HUMAN	27.3	49	532
72	Splicing factor	SFRS1_HUMAN	27.7	15	133
73	Chloride Intracellular Channel Prot.1	CLIC1_HUMAN	27.1	24	309
74	Splicing factor	SFRS1_HUMAN	27.7	19	124
75	ATP Synthetase D	ATP5H_HUMAN	18.4	11	110
76	Lamin C	LMNA_HUMAN	65.1	30	739
77	Lamin-A/C	LMNA_HUMAN	74.4	14	277
78	Elongation factor 1-beta	EF1B_HUMAN	24.7	17	92
79	Lamin C	LMNA_HUMAN	65.1	24	477
80	Lamin A	LMNA_HUMAN	74.4	13	230
81	HNRPL-Protein	Q6NTA2_HUMAN	60.8	16	155
82	HNRPL-Protein	Q6NTA2_HUMAN	60.8	6	245

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq.cov. %	Score
84	Dihydrolipoamide Dehydrogenase	DLDH_HUMAN	54.6	3	118
85	T-complex protein 1 subunit beta	TCPB_HUMAN	57.6	23	456
86	Pre-mRNA-processing factor 19	PRP19_HUMAN	55.6	10	166
87	Nuclear matrix NMP 238	RUVB1_HUMAN	50.8	16	164
88	Fascin	FSCN1_HUMAN	55	10	181
89	Glutamate Dehydrogenase NADP+	DHE4_HUMAN	61.7	13	228
90	a-Enolase	ENOA_HUMAN	45.4	17	189
91	Translational elongation factor 1	EF1A_HUMAN	50.1	18	226
92	Phosphoglycerat Kinase	PGK1_HUMAN	44.8	17	192
93	Fructose-Bisphosphat Aldolase	ALDOA_HUMAN	39.8	25	391
94	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	36.2	32	372
95	VDAC-1	VDAC1_HUMAN	30.7	20	103
96	VDAC-2	Q5VWK1_HUMAN	33.8	9	131
97	Lung cancer Oncogene 7	Q5VLR4_HUMAN	38.4	19	269
98	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Iso A	HNRA1_HUMAN	36	11	123
99	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_HUMAN	35.9	9	239
100	Peroxiredoxin	Q5T155_HUMAN	19.1	39	179
101	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2_HUMAN	37,5/35,9	50	479/225
102	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	36.2	34	372
103	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2_HUMAN	37.5	32	270
104	VDAC-1	VDAC1_HUMAN	30.7	34	342
105	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A3	HNRA3_HUMAN	39.8	14	152
106	Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_HUMAN	50.5	10	124
107	Annexin A2	Q8TBV2_HUMAN	38.7	41	605
108	Triosephosphate isomerase (TIM)	TPIS_HUMAN	26.8	31	358
109	Annexin A1	ANXA1_HUMAN	38.9	29	100
110	Peroxiredoxin 3	PRDX3_HUMAN	28	12	127
111	HNRPH-1	ROH1_HUMAN	46.5	10	157
112	HNRPH -C1 -C2	ROC_HUMAN	33.7	21	264
113	Stomatin-like protein 2	STML2_HUMAN	38.5	17	132

Anhang 2.

Liste der identifizierten Proteine aus EPC Zellen

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	M(th)	Seq.cov (%)	Score
1	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	FTHFD_HUMAN	41.6	5	67
2	ACTG1 protein	Q6PJ43_HUMAN	72.3	15	81
3	ACTG1 protein	Q6PJ43_HUMAN	53.5	12	98
4	ACTG1 protein	Q6PJ43_HUMAN	36.0	30	186
5	ACTG1 protein	Q6PJ43_HUMAN	19.0	24	201
6	Actin beta	ACTB_HUMAN	41.6	27	384
7	Actin beta	ACTB_HUMAN	11.4	40	644
8	Actin beta	ACTB_HUMAN	11.7	17	319
9	Actin beta	ACTB_HUMAN	16.5	36	453
10	Actin gamma	ACTG_HUMAN	56.8	10	67
11	Actin gamma	ACTG_HUMAN	98.8	2	71
12	Actin gamma	ACTG_HUMAN	44.6	5	77
13	Actin gamma	ACTG_HUMAN	41.7	12	93
14	Actin gamma	ACTG_HUMAN	29.0	20	146
15	Actin gamma	ACTG_HUMAN	17.5	26	244
16	Actin gamma	ACTG_HUMAN	16.3	27	304
17	Actin gamma	ACTG_HUMAN	16.3	26	306
18	Actin gamma	ACTG_HUMAN	10.3	28	341
19	Actin gamma	ACTG_HUMAN	38.5	31	376
20	Aging-associated gene 9 protein	Q2TSD0_HUMAN	44.5	16	166
21	Aging-associated gene 9 protein	Q2TSD0_HUMAN	36.0	16	186
22	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	72.4	13	102
23	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	24.7	11	197
24	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	72.4	18	266
25	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	12.8	22	320
26	Annexin A2 (Annexin II)	ANXA2_HUMAN	41.6	24	270
27	Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II)	ANXA2_HUMAN	66.4	2	61
28	Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II)	ANXA2_HUMAN	53.5	6	98
29	AX885176 NID	CAE99290	27.7	39	173
30	Beta-2-microglobulin, chain B	1A6ZB	57.1	13	62
31	Calgizzarin	S10AB_HUMAN	72.3	17	89
32	CALPROTECTIN MRP-14 protein	Q9QVR5_HUMAN	49.6	11	42
33	Calreticulin variant	Q53G71_HUMAN	57.1	5	53
34	Calreticulin variant	Q53G71_HUMAN	41.6	7	106
35	Calreticulin variant 1	Q53G71_HUMAN	10.0	37	430
36	CALU protein (Calumenin)	Q6IAW5_HUMAN	41.6	7	63
37	Cathepsin B	CATB_HUMAN	57.1	20	240
38	Cathepsin B , chain B	CATB_HUMAN	16.8	24	236
39	Cathepsin B , chain B	CATB_HUMAN	22.2	33	289
40	Cathepsin D	CATB_HUMAN	38.4	16	134
41	Cathepsin D	CATD_HUMAN	38.1	21	189
42	Cathepsin D	CATB_HUMAN	24.7	20	295
43	Cathepsin S cysteine protease	CATS_HUMAN	31.4	13	147
44	Chaperonin 10-related protein	Q9UNM1_HUMAN	56.7	12	68
45	Cofilin-1	COF1_HUMAN	56.5	5	50
46	CS288575 NID	CAK18759	19.0	13	290
47	CS288575 NID	CAK18759	18.0	16	348
48	CS288575 NID	CAK18759	11.7	16	399
49	Cytochrome c oxidase	Q8TB65_HUMAN	72.4	6	106

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	M(th)	Seq.cov (%)	Score
50	Electron transfer flavoprotein Endoplasmic reticulum lumenal Ca(2+)-	ETFHA_HUMAN	22.4	14	117
51	binding protein grp78	GRP78_HUMAN	65.8	12	107
52	Endoplasmic-reticulum-lumenal protein 28	ERP29_HUMAN	47.0	19	77
53	Endoplasmic-reticulum-lumenal protein 28	ERP29_HUMAN	37.8	22	130
54	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_HUMAN	57.8	15	141
55	Eosinophil lysophospholipase	LPPL_HUMAN	53.7	15	46
56	Eosinophil lysophospholipase	LPPL_HUMAN	29.4	25	131
57	Galectin 1	LEG1_HUMAN	41.4	46	208
58	Galectin-3 carbohydrate recognition domain	Q8QGD8_HUMAN	72.4	56	214
59	Glutathione peroxidase 1	GPX1_HUMAN	41.7	14	66
60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	41.7	26	63
61	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	22.4	16	126
62	GRB2 protein	Q6ICN0_HUMAN	16.9	18	139
63	Guanine nucleotide-binding protein	GBB1_HUMAN	53.5	6	115
64	H ⁺ -transporting two-sector ATPase	A33370	41.7	13	227
65	H ⁺ -transporting two-sector ATPase beta chain p	A33370	72.4	13	203
66	H ⁺ -transporting two-sector ATPase beta chain p	A33370	11.4	26	563
67	H ⁺ -transporting two-sector ATPase delta chain	ATPD_HUMAN	44.5	13	144
68	Heat shock 70kDa protein 1-like	Q53FA3_HUMAN	37.2	9	98
69	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	Q53HF2_HUMAN	47.0	9	74
70	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	Q53HF2_HUMAN	14.8	15	336
71	Heat shock 70kDa protein 9B variant	Q53H23_HUMAN	27.2	5	86
72	Heat shock protein 60	Q38L19_HUMAN	53.7	2	49
73	Heat shock protein 60	Q38L19_HUMAN	41.6	7	96
74	Hemoglobin beta chain	HBB_HUMAN	46.9	46	273
75	Histone H2A.Z (H2A/z)	H2AZ_HUMAN	66.4	15	53
76	Histone H2B.1	H2B1J_HUMAN	56.5	19	61
77	Histone H2B.1	H2B1J_HUMAN	47.0	29	74
78	Histone H2B.1	H2B1J_HUMAN	47.0	12	75
79	Histone H4	H4_HUMAN	61.2	15	54
80	Histone H4	H4_HUMAN	44.5	30	139
81	Histone H4	H4_HUMAN	29.0	29	156
82	Histone H4	H4_HUMAN	26.5	30	194
83	Hypothetical protein	Q9HAH1_HUMAN	73.6	3	42
84	Hypothetical protein	Q2KHP4_HUMAN	56.5	5	51
85	Hypothetical protein	Q2KHP4_HUMAN	53.7	4	79
86	Hypothetical protein	Q2KHP4_HUMAN	29.4	9	133
87	Hypothetical protein	Q2KHP4_HUMAN	98.5	4	158
88	Hypothetical protein	Q2KHP4_HUMAN	92.3	6	168
89	Hypothetical protein	Q2KHP4_HUMAN	62.9	7	212
90	Hypothetical protein	Q2KHP4_HUMAN	14.4	12	271
91	Hypothetical protein CAPG	Q53SA7_HUMAN	55.2	9	81
92	Interferon-inducible protein X (IFIX)	Q5T3W6_HUMAN	113.4	4	44
93	Keratin 10, type I, cytoskeletal 1	K1C10_HUMAN	72.4	5	97
94	Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	54.7	1	69
95	Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	13.6	22	478
96	Keratin-8-like protein 1	Q9H552_HUMAN	72.3	8	105
97	Lamin B1	LMNB1_HUMAN	32.0	5	53

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	M(th)	Seq.cov (%)	Score
98	Lamin B1	LMNB1_HUMAN	41.6	8	131
99	Lamin-B1	LMNB1_HUMAN	29.4	13	337
100	Major epididymis-specific protein E4	WFDC2_HUMAN	49.6	23	46
101	Manganese superoxide dismutase	SODM_HUMAN	38.4	23	183
102	Myosin alkali light chain 6	MYL6_HUMAN	30.6	38	190
103	Peptidylprolyl isomerase A	PPIA_HUMAN	57.9	13	78
104	Peptidylprolyl isomerase A	PPIA_HUMAN	70.4	21	97
105	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	41.6	12	83
106	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	36.0	38	185
107	Phosphoglycerate kinase	PGK1_HUMAN	12.8	15	160
108	PKA-activated chloride channel	CLCN2_HUMAN	53.7	3	47
109	Profilin, chain A	PROF1_HUMAN	25.1	33	167
110	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	15.6	9	190
111	Protein disulfide-isomerase	PDIA3_HUMAN	24.0	11	201
112	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	53.5	9	203
113	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	17.6	19	261
114	Protein disulfide-isomerase	PDIA3_HUMAN	53.5	17	279
115	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMAN	72.4	9	128
116	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	29.4	8	214
117	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	65.9	11	248
118	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	18.0	14	348
119	Retinal dehydrogenase 1 (RalDH1)	AL1A1_HUMAN	30.6	12	197
120	Sequence 45 from Patent WO03014151 SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	CAD88075	11.4	28	503
121	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	Q5T123_HUMAN	41.6	20	83
122	Superoxide dismutase (Mn)	SODM_HUMAN	66.4	7	62
123	Superoxide dismutase (Mn) precursor	SODM_HUMAN	14.7	29	228
124	Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2	PRDX1_HUMAN	57.8	21	134
125	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3_HUMAN	72.3	12	100
126	Triosephosphate isomerase (TIM)	TPIS_HUMAN	19.0	31	289
127	Tropomyosin 3	Q5VU59_HUMAN	16.0	36	320
128	Tumor rejection antigen (Gp96)	Q59FC6_HUMAN	82.5	13	265
129	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1	QCR1_HUMAN	32.7	10	185
130	Vimentin	VIME_HUMAN	38.4	12	148
131	Vimentin	VIME_HUMAN	123.5	15	218
132	Vimentin	VIME_HUMAN	22.0	17	226
133	Vimentin	Q53HU8_HUMAN	36.1	18	314
134	Vimentin	Q5JVT0_HUMAN	13.6	23	455
135	Vimentin	Q5JVT0_HUMAN	11.4	31	484
136	Vimentin	VIME_HUMAN	11.4	29	544
137	Vimentin variant	Q53HU8_HUMAN	9.4	31	378
138	Vimentin variant	Q53HU8_HUMAN	11.4	24	466
139	Vimentin variant	Q53HU8_HUMAN	18.5	27	512
140	Voltage-dependent anion channel 2	Q5VWK3_HUMAN	53.5	6	45
141	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)	VDAC1_HUMAN	53.5	7	81
142	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)	VDAC1_HUMAN	56.8	13	107
143	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	RPGR_HUMAN	41.6	5	76

Anhang 3.

Liste der identifizierten Proteine aus cALL2 Zellen

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq.cov. %	Score
1	14-3-3 protein beta/alpha	P31946	28.1	26	71
2	14-3-3 protein epsilon isoform transcript variant 1	Q4VJB6	26.5	17	36
3	14-3-3 protein gamma	P61981	28.3	19	41
4	14-3-3 protein zeta/delta	P63104	27.7	13	107
5	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial	P42126	32.8	9	45
6	40S ribosomal protein S13	P62278	172.2	17	35
7	40S ribosomal protein S7	P62083	22.1	15	35
8	40S ribosomal protein S8	P62243	24.2	11	46
9	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	61.1	20	95
10	60S ribosomal protein L13	Q6NZ55	24.3	18	42
11	60S ribosomal protein L18	Q07020	21.6	30	64
12	Acidic (Leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32	Q53F35	28.7	15	86
13	Actin, cytoplasmic 2	P63261	41.6	42	192
14	Actin-like protein	Q562M3	11.5	24	38
15	Adenylate kinase isoenzyme 2	P54819	26.5	15	36
16	ADP/ATP translocase 1	P12235	33.1	18	32
17	ADP-ribosylation factor 1	P84080	20.6	14	76
18	ALB protein	Q8IUK7	45.2	20	36
19	Ankyrin repeat domain-containing protein 57	Q53LP3	55.7	17	38
20	ANP32A protein	Q3KPI8	14.8	15	35
21	AX970024 NID	CAF15132	19.8	23	95
22	Chaperonin 10-related protein	Q9UNM1	10.3	14	38
23	Cofilin-1	P23528	18.5	13	38
24	CQ834838 NID	CAH05634	21.2	23	95
25	Elongation factor 1-alpha 1	P68104	50.1	2	45
26	Elongation factor 2	P13639	95.3	24	42
27	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	Q9H6S3	80.6	10	31
28	Exonuclease domain-containing protein 1	Q9P224	77.4	12	34
29	Ezrin (p81)	P15311	69.2	2	69
30	Far upstream element-binding protein 1	Q96AE4	67.6	11	53
31	Follistatin-related protein 4	Q6MZW2	93.1	4	37
32	General transcription factor 3C	Q12789	209.5	7	36
33	Glutathione S-transferase P	P09211	23.4	18	38
34	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Q2TSD0	36.0	16	71
35	Heat shock 70kDa protein 1-like variant	Q53FA3	70.4	8	35
36	Heat shock 70kDa protein 6	P17066	71.0	26	95
37	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	Q53GZ6	70.9	27	119
38	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	70.9	27	279
39	Heat shock protein 60	P10809	61.1	9	38
40	Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	83.3	12	121
41	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	Q2VIN3	41.5	13	35
42	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K transcript variant	Q5EC54	51.0	10	67
43	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Q00839	90.3	8	58
44	High mobility group protein B2	P40673	24.0	23	80
45	High-mobility group box 1	Q5T7C0	11.4	22	43
46	histone H1x - human	Q92522	22.5	10	75
47	Histone H2A type 1	P0C0S8	14.1	22	46
48	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	P62807	13.7	28	117

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq.cov. %	Score
49	Histone H2B type 1-J	P06899	13.6	28	76
50	Histone H2B type 2-C	Q6DN03	21.5	19	46
51	Histone H3.1t	Q16695	15.4	6	22
52	Histone H4	P62805	11.4	9	34
53	HSP90AA1 protein	Q2VPJ6	68.3	18	200
54	HSPA5 protein	Q2KHP4	72.4	17	198
55	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	65.4	20	39
56	Keratin-1	P04264	66.0	25	72
57	Lamin B1	P20700	66.4	14	35
58	Macrophage migration inhibitory factor	P14174	12.3	9	29
59	Mitochondrial peroxiredoxin PRX1	P34227	29.5	18	42
60	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	P26038	67.6	21	157
61	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric	P19105	19.8	15	39
62	Nucleolin (Protein C23)	P19338	76.4	11	36
63	Nucleoside diphosphate kinase	Q86XQ2	19.6	24	81
64	Nucleoside diphosphate kinase B	P22392	17.2	19	68
65	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	18.0	16	29
66	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	23.7	19	68
67	Peripheral plasma membrane protein CASK	O14936	66.6	3	12
68	Peroxiredoxin-1	Q06830	22.1	20	62
69	Peroxiredoxin-2	P32119	21.7	5	34
70	Peroxiredoxin-6	P30041	25.0	23	46
71	PHB protein	Q6FHP5	29.8	19	81
72	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P30086	21.1	24	52
73	Phosphoglycerate kinase 1	P00558	44.6	11	44
74	Phosphoglycerate mutase 1	P18669	28.8	16	72
75	Plastin-2	P13796	70.1	8	41
76	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	P09874	112.9	1	35
77	Proteasome (Prosome, macropain) subunit, beta type, 4	Q5SZS5	113.1	7	32
78	Proteasome activator complex subunit 2	Q9UL46	27.4	18	48
79	Proteasome subunit alpha type-7	O14818	20.2	22	110
80	Protein SET	Q01105	33.5	11	39
81	PSME1 protein	Q6FHU3	28.7	14	76
82	Putative uncharacterized protein DKFZp686J01190	Q7Z2V5	46.0	2	41
83	Putative uncharacterized protein YWHAQ	Q53RR5	11.2	24	50
84	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	57.8	7	97
85	Ras-related protein Rab-11B	Q15907	24.5	19	36
86	Ras-related protein Rab-7a	P51149	23.5	17	47
87	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	23.2	17	46
88	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Rho GDI 1) (Rho-GDI alpha)	P52565	23.2	18	50
89	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Rho GDI 2) (Rho-GDI beta)	P52565	23.2	16	38
90	Ribosomal protein L15 pseudogene 3	Q5T6E0	24.2	6	43
91	RNA-binding protein 8A	Q3ZCE8	19.9	23	55
92	RPL7 protein	Q3KQU0	29.2	18	96
93	Serine/threonine-protein kinase ULK4	Q96C45	142.4	4	12
94	SET translocation (Myeloid leukemia-associated)	Q5VXV1	33.5	18	36
95	SFPQ protein	Q6PIX2	55.4	11	51
96	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	P14678	24.6	15	35
97	Spatacsin	Q96JI7	70.3	4	42
98	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	Q16629	27.4	9	37
99	Stathmin	Q3T0C7	17.3	15	48
100	Stathmin-2	Q93045	20.8	22	47
101	T-cell activation protein phosphatase 2C-like protein	Q6UY82	32.6	20	31

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq.cov. %	Score
102	Transgelin-2	P37802	22.4	28	40
103	Transmembrane protein C1orf162	Q8NEQ5	14.1	17	18
104	Triosephosphate isomerase	P60174	26.5	11	69
105	Tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein	Q8N9Z3	66.0	20	42
106	Tumor rejection antigen (Gp96) 1 variant	Q59FC6	65.9	7	49
107	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3	P62310	11.8	17	45
108	Ubiquitin	P62990	10.9	9	37
109	Zinc finger SWIM domain-containing protein 3	Q96MP5	79.4	4	11

Anhang 4

Liste der identifizierten Proteine aus cALL2 Zellen

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq. Cov. %	Score
1	40S ribosomal protein SA	P08865	32.7	22	142
2	Alpha Enolase 1	P06733	47.2	16	302
3	ATP synthase subunit beta	P06576	57.9	12	87
4	AX886577 NID	AX886577.1	7.9	31	71
5	AX969959 NID	AX969959.1	7.9	29	46
6	AX971858 NID	AX971858	7.6	30	45
7	C10orf18 protein	Q6IPC8	84.4	13	41
8	CDNA FLJ36025	Q8N9Z3	66.0	20	54
9	DENN domain-containing protein 4C	Q5VZ89	186.9	3	43
10	Dynein	Q9P2D7	494.0	2	42
11	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68	Q6AZZ1	56.3	22	126
12	Fibrillin 1	Q75N88	147.3	4	40
13	Gamma-enolase	P09104	47.3	19	119
14	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Q2TSD0	36.0	4	97
15	Guanine nucleotide-binding protein	P63243	34.9	9	95
16	Heat shock 70 kDa protein 1L	P34931	70.4	15	62
17	Heat shock 70kDa protein 8	Q53GZ6	70.9	18	187
18	Heat shock protein 27	P04792	22.8	4	45
19	Heat shock protein 60	P10809	61.2	20	172
20	Heat shock protein HSP 90	P07900	98.1	3	119
21	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	P09651	34.2	5	92
22	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q5EC54	51.0	8	72
23	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Q2HJ60	36.0	14	70
24	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	33.7	20	58
25	Histone H2A type 2-A	Q6FI13	14.0	34	139
26	Histone H2A.1	P0C0S8	14.1	32	126
27	Histone H2B	Q3KP43	7.6	18	69
28	Histone H4	P62805	11.4	28	155
29	Hypermethylated in cancer 2 protein	Q96JB3	66.2	12	49
30	Keratin 2A	P35908	65.9	23	157
31	Keratin, type II	Q7Z794	61.7	6	42
32	L-lactate dehydrogenase	P07864	36.3	16	51
33	LPPR4 Protein	Q86XM6	82.2	12	40
34	Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase	P06239	58.0	11	40
35	Macrophage migration inhibitory factor	P14174	12.5	19	66
36	Nucleoside diphosphate kinase	P15531	17.2	13	87
37	Procollagen II N-proteinase	O15072	135.6	6	44
38	Profilin	P07737	14.8	10	46
39	Protein disulfide-isomerase A6	Q15084	53.9	2	56
40	Putative uncharacterized protein DKFZp434N222	Q9NSW9	44.9	6	42
41	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma	Q44TT68	24.7	11	41
42	Ribosomal protein S18	P62271	17.7	19	61
43	Ribosomal protein S28	P62859	7.8	17	47
44	RNA exonuclease 4	Q9GZR2	46.6	9	40
45	RPEL Protein	Q5R356	18.6	12	44
46	Titin	Q8WZ42	2991.2	0	40
47	Transgelin-2	P37802	22.2	20	79
48	Tubby-related protein 1	O00294	60.4	10	41

Nr.	Protein Name	Acc.Nr.	MW(kDa)	Seq. Cov. %	Score
49	Tubulin alpha	P68370	50.1	15	135
50	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	Q96K76	157.3	6	43
51	UPF0258 protein	Q6UPX6	102.9	5	49
52	Vimentin	P08670	53.5	24	185
53	Zinc finger FYVE domain-containing protein 26	Q68DK2	270.2	1	42
54	Zinc finger protein 8	P17098	65.0	19	43

