

**Methodenentwicklung
zur Bestimmung von
intakten Proteinen und Proteomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Manuela Hügel, Lebensmittelchemikerin

Saarbrücken, 2008

Tag des Kolloquiums:	20. Mai 2009
Dekan:	Professor Dr.-Ing. Stefan Diebels
Vorsitzender:	Prof. Dr. M. Springborg
Berichterstatter:	Prof. Dr. C. Huber Prof. Dr. R. Müller
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. M. Martin

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von April 2005 bis September 2008 im Institut für instrumentelle Analytik und Bioanalytik der Universität des Saarlandes. Während dieser Zeit begegneten mir ganz besondere Menschen, die sich hier wieder finden sollen. Daher,

Vielen Dank

... an meinen Doktorvater **Prof. Dr. Christian Huber** für die Stellung des Themas und die Möglichkeit, mich auf diesem Gebiet zu beweisen und dreieinhalb unvergessliche Jahre in Saarbrücken zu verleben, für die Unterstützung und Betreuung, für hervorragende Ideen, die aus kleinen Signalen intensive Spektren machten, und für die Scherze zwischendurch, die für mich für immer eine Verbindung von Fön und Telefon bedeuten werden.

... an **Dr. Markus Martin** für die Überbrückung logischer, verbaler und statistischer Ausfälle, abendliche „Mokkapartys“ und regelmäßige Aufforderungen, endlich Feierabend zu machen, ohne die ich sicher einige Nächte durchgemacht hätte.

... an **Christa Göllen**, die mit ihrer fröhlichen Art immer eine Aufmunterung war, wenn es mal nicht so lief, wie ich es doch gern wollte, ohne die jeder Antrag auf Urlaub und Reisekosten ein Trauerspiel geworden wäre.

... an **Reiner „Windy“ Wintringer** für so manche schnelle Hilfe sowohl bei apparativen als auch mentalen Problemen, gleichermaßen für die verbalen Gefechte und die starke Schulter, die immer da war, wenn ich sie brauchte.

... an **Iris Gostomski** und **Verena Fraaß** für konstruktive Diskussionen, so manche Hilfestellungen, wenn es hoch her ging, für Schultern zum Anlehnen und Scherze zum Lachen, für unvergessliche Kinobesuche und durchbackene Nächte und für die Teilnahme am „Klöni-Club“.

... an **Andreas Leinenbach** und **Silke Ruzek** für ausgiebige Diskussionen, eine sehr angenehme Zusammenarbeit, die Gewissheit, dass meine „Babys“ immer in guten Händen waren bzw. zukünftig auch noch sind, und für einen unvergesslichen Packmarathon.

... an **Katja Melchior und Jens Mohr**, sowie die Doktoren **Anis Masunah, Christian Schley, Nathanaël Delmotte, Sascha Quinten** und **Bilgin Vatansever** für ihre Hilfe in jeder Arbeitslage, gute Tipps und Ratschläge, viel Spaß in den Kaffeepausen sowie Kabbeleien und Aufmunterungen.

... an **Volker Neu, David Gode** und **Thomas Hoffmann** für die Vorbereitung und Durchführung verschiedener Praktika bzw. die Bearbeitung einzelner Themen, durch die mir einiges an Zeit gespart wurde, sowie an **Patrick Riefer** und **Patrick Eschhold** für das gute Arbeitsklima und das nette Miteinander.

... an **Eva Luxenburger** und **Devid Hero** für ihren Einsatz, das allgemeine Chaos in vertretbaren Grenzen zu halten, für ihren Eifer und ihre Begeisterung, die ansteckend ist.

... an **Dr. Frank Steiner** seinen Humor und seine Geschichten, die Wortgefechte und gegenseitigen Sticheleien, wenn es auch nur eine kurze Zeit lang war.

... an **Dr. Nora Luniak** für die tolle Zusammenarbeit am Bromelain-Thema.

... an **Norbert Ochs, Jens Wiegert** und **Hans-Peter Skohoutil** dafür, dass sie verschiedene Konstruktionen möglich und so manches Malheur behoben haben.

Sie alle haben die letzten drei Jahre zu einer angenehmen Erfahrung gemacht, die ich nie vergessen werde und nicht missen möchte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter Gudrun Hügel bedanken, die mir in meiner gesamten Zeit in Saarbrücken wie auch schon zuvor selbst auf die Ferne hin zur Seite stand und an mich glaubte und noch immer mein Fels in der Brandung ist.

Inhalt

Danksagung	I
Inhalt	III
Zusammenfassung	IX
Abstract	X
Abkürzungsverzeichnis	XI

TEIL I ALLGEMEINER UND THEORETISCHER TEIL 1

1	PROTEINE	3
1.1	Struktur und Aufbau von Proteinen und Aminosäuren	3
1.2	Einteilung und Funktion von Proteinen	9
1.3	Das Proteom	11
1.4	Chemische Umsetzungen in der Proteinanalytik	13
1.5	Die Nutzung der Struktur zur Darstellung und Aufklärung der Aminosäuresequenz	16
2	ANALYTISCHE TRENNMETHODIK VON PROTEINEN	17
2.1	Elektrophorese	18
2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie	20
2.2.1	Umkehrphasen- und Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie	22
2.2.2	Ionenaustauschchromatographie	24
2.2.3	Chromatofokussierung	26
2.2.4	Miniaturisierung	27
2.2.5	Methodenkombination	31
2.2.6	Säulenkopplung	34
2.3	Gezielte Trennung von Proteinen	35
3	DETEKTIONSMETHODEN	36
3.1	Photometrie	36
3.2	Massenspektrometrie	37
3.2.1	Elektrospray Ionisation	38
3.2.2	Massenanalyse	40
3.2.2.1	Flugzeit Massenspektrometrie	41
3.2.2.2	Ionenfallenmassenspektrometrie	44
3.2.3	Detektion	49

3.3	Darstellung und Charakterisierung als Ziel der Proteinanalyse	49
4	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE UND INTERPRETATION DER DATEN	50
4.1	Parameteroptimierung	50
4.2	Chromatogrammerzeugung mit massenspektrometrischer Detektion	51
4.3	Charakterisierung von intakten Proteinen	53
4.4	Identifizierung von Proteinen mit Tandem-Massenspektrometrie	55
4.5	Der Weg zur genauen Charakterisierung	57
5	REFERENZEN	58

**Teil II Methodenentwicklung zur Darstellung und Trennung
von Proteinen67**

1	APPARATIVE ANFORDERUNGEN UND CHEMIKALIEN.....	69
1.1	Apparative Systeme für die Methodenentwicklung	69
1.2	Chemikalienliste.....	70
1.3	Zur Einschätzung der Methoden verwendete Formeln und Berechnungen	71
2	ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG EINER METHODIK ZUR PROTEINANALYSE MITTELS MIKRO-HPLC-TOF-MS	73
2.1	Parameteroptimierung und Massenkalisierung am micrOTOF	73
2.2	Entwicklung einer mikro-HPLC-Trennmethode für intakte Proteine	76
2.2.1	TFA als Ionenpaarreagenz.....	77
2.2.2	FA als Ionenpaarreagenz.....	78
2.2.3	Eluentenvergleich – TFA vs. FA.....	79
2.3	Reproduzierbarkeit von Trennung und Detektion	83
2.3.1	11-Proteinstandard-Mischung	85
2.3.2	8-Proteinstandard-Mischung	89
2.4	Massenstabilität	93

3	ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG EINER METHODIK ZUR PROTEINANALYSE MITTELS MIKRO-HPLC-IONENFALLEN-MS	95
3.1	Optimierung der massenspektrometrischen Parameter	95
3.1.1	Optimierung der Ionisierungsparameter	96
3.1.2	Optimierung der Ionenoptik-Parameter und Prüfung der Einstellungen.....	99
3.2	Etablierung eines mikro-HPLC-Systems zur Trennung intakter Proteine	101
3.2.1	Flussteilung an der Rheos 2000 Zweikanal Gradientenpumpe	101
3.2.2	Aufrüstung zum System mit Vorkonzentrierung	104
3.2.3	Kopplung der mikro-HPLC- und MS-Methoden.....	105
3.2.4	Modifizierung der Ionisierungsspannung.....	109
3.3	Trennung und Detektion von Standardproteinen – Reproduzierbarkeit und Statistische Parameter	111
3.3.1	10-Proteinstandard-Mischung	112
3.3.2	8-Proteinstandard-Mischung	118
4	HPLC-MS VON STANDARDPROTEINEN IM HOHEN MASSENBEREICH	124
4.1	mikro-HPLC-TOF-MS von großen Proteinen	124
4.2	mikro-HPLC-Ionenfallen-MS von großen Proteinen.....	129
5	DARSTELLUNG MODIFIZIERTER PROTEINE	135
5.1	Darstellung von Transferrin.....	135
5.2	Darstellung von Ovalbumin.....	138
6	CHROMATOFOKUSSIERUNG VON PROTEINEN.....	146
6.1	Untersuchung und Auswahl der Pufferzusammensetzung	146
6.2	Miniaturisierung - <i>Downscaling</i> auf 2 mm-Säuleninnendurchmesser	152
6.3	Prüfung der Eignung zur Vortrennung von Proteinen - 1D-Methode	156
6.3.1	Chromatofokussierung der 20-Proteinstandard-Mischung	157
6.3.2	IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS der Fraktionen der Chromatofokussierung	158
7	DISKUSSION DER VERSCHIEDENEN METHODEN UND ENTWICKLUNGSERGEBNISSE	163
7.1	Zusammenfassung der Ionenpaar-Umkehrphasen mikro-HPLC-Trennmethode	163
7.2	Zusammenfassung der Flugzeit-MS-Methode	164
7.3	Zusammenfassung der Ionenfallen-MS-Methode	165

7.4	Diskussion der Chromatofokussierung als Vortrennung	165
8	REFERENZEN.....	167

Teil III Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben.....169

1	APPARATIVE ANFORDERUNGEN UND CHEMIKALIEN.....	171
1.1	Apparative Systeme für die Methodenentwicklung	171
1.2	Chemikalienliste.....	174
2	MEHRDIMENSIONALE PROTEINANALYSE VON MENSCHLICHEM SERUM	175
2.1	Übersicht der verwendeten Methoden	175
2.1.1	Chromatofokussierung von Serum.....	176
2.1.2	IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS intakter Proteine in CF-Fraktionen	176
2.2	Ergebnisse.....	178
2.3	Diskussion	181
3	MEHRDIMENSIONALE PROTEINANALYSE VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	183
3.1	Übersicht der verwendeten Methoden	184
3.1.1	Chromatofokussierung von <i>Escherichia coli</i> Proteinen	184
3.1.2	IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS intakter Proteine in CF-Fraktionen	185
3.1.3	IP-RP-mikro-HPLC-Ionenfallen-MS von Peptiden in CF-Fraktionen	186
3.2	Ergebnisse.....	188
3.2.1	Analyse auf der Ebene intakter Proteine.....	188
3.2.2	Ergebnisse der Analyse der verdauten Proteine in den Fraktionen	192
3.2.3	Vergleich der Messungen auf intakter Protein- und Verdauebene	194
3.3	Ergebnis und Diskussion der Untersuchung des <i>E. coli</i> -Lysats	196
4	CHARAKTERISIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON BROMELAIN	199
4.1	Übersicht der verwendeten Methoden	200
4.1.1	Kationenaustauschchromatographie von Bromelain-Rohextrakt.....	200
4.1.2	IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS intakter Proteine in den SCX-Fraktionen.....	201
4.1.3	IP-RP-mikro-HPLC-Ionenfallen-MS von Peptiden in SCX-Fraktionen.....	202

4.2	Ergebnisse.....	204
4.2.1	Kationenaustausch-HPLC - Trennung und Fraktionierung.....	204
4.2.2	Darstellung der intakten Proteinmassen	205
4.2.3	Sequenzanalyse und Datenbankvergleich	207
4.3	Interpretation und Diskussion der Ergebnisse	208
5	ANALYSE DER HAUPTPROTEINE VON MOLKE	211
5.1	Zur Darstellung und Quantifizierung von Molkeproteinen verwendete Methoden.....	211
5.1.1	Probenvorbereitung.....	211
5.1.2	Nachweis und Quantifizierung von Molkeproteinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS	212
5.1.3	Nachweis und Quantifizierung von Molkeproteinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-IT-MS	213
5.1.4	Zusammensetzung der Kalibrierreihen und Durchführung der externen Kalibrierung	214
5.2	Ergebnisse der Molkeuntersuchung mittels Flugzeit-MS	215
5.2.1	Darstellung der Molkeproteine	215
5.2.2	Quantifizierung der Molkeproteine	216
5.3	Ergebnisse der Molkeuntersuchung mittels Ionenfallen-MS	219
5.3.1	Darstellung der Molkeproteine	219
5.4	Vergleich der Ergebnisse und Diskussion der Methoden.....	222
6	DARSTELLUNG, CHARAKTERISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON GLIADINEN	224
6.1	Zur Darstellung und Quantifizierung von Gliadinen verwendete Methoden ..	224
6.1.1	Probenvorbereitung.....	225
6.1.2	Nachweis und Quantifizierung von Gliadinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS	225
6.1.3	Nachweis und Quantifizierung von Gliadinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-IT-MS	227
6.1.4	Gewinnung reiner Gliadine zur Bereitung eines Gliadinstandards	228
6.1.5	Zusammensetzung der Kalibrierreihen und Durchführung der externen Kalibrierung	228
6.2	Ergebnisse der Gliadinuntersuchung mittels Flugzeit-MS.....	230
6.2.1	Darstellung der Gliadine.....	231
6.2.2	Quantifizierung der γ -Gliadine	234
6.3	Ergebnisse der Gliadinuntersuchung mittels Ionenfallen-MS.....	236
6.3.1	Darstellung der Gliadine.....	236
6.3.2	Quantifizierung der γ -Gliadine	238
6.4	Vergleich der Ergebnisse und Diskussion der Methoden.....	240

7	ANHANG	243
7.1	Tabellen zu Kapitel 2	243
7.2	Abbildungen zu Kapitel 3.1.2	246
7.3	Tabellen zu Kapitel 3.2.1	248
7.4	Tabellen zu Kapitel 3.2.3	270
7.5	Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 4.....	308
7.6	Tabellen zu Kapitel 5.2.2	312
7.7	Tabellen zu Kapitel 5.3.2	313
7.8	Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.2.....	314
7.9	Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.3.....	317
8	REFERENZEN.....	319

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Zusammensetzung von Proteomen umfasst die Identifizierung und Quantifizierung aller Proteine innerhalb einer Zelle, eines Gewebes oder einer biologischen Flüssigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter genau definierten Bedingungen. Analytische Methoden zur Untersuchung dieser heterogenen Proben müssen aufgrund der immensen Komplexität und des großen dynamischen Konzentrationsbereiches der Proteine (bis $1:10^{10}$) sehr effiziente Trennungen der Proteine in Kombination mit sehr nachweisstarken Detektionsmethoden aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene chromatographische Methoden speziell zur Trennung von intakten Proteinen entwickelt und optimiert. Hierzu wurde die Ionenpaar-Umkehrphasen mikro-Hochleistungsflüssigchromatographie (IP-RP-mikro-HPLC) gewählt. Die Detektion der Proteine wurde durch Massenspektrometrie (MS) unter Verwendung von Flugzeit- (TOF) oder Ionenfallen Massenanalysatoren gewährleistet. Außerdem wurde eine Chromatofokussierungs-Methode entwickelt und optimiert, mit der in Kopplung mit der beschriebenen IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS-Methode die multidimensionale Analyse von komplexen Proteomen auf der Ebene der intakten Proteine möglich war. Alle entwickelten HPLC- und MS-Methoden wurden auf Reproduzierbarkeit, Stabilität sowie Orthogonalität getestet. Sie wurden angewendet zur Charakterisierung glycosylierter Proteine sowie zur Trennung und Detektion von Proteinen aus menschlichem Serum und einem *Escherichia coli*-Lysat. Außerdem wurden Molkeproben und ein Gliadinextrakt aus Weizenmehl qualitativ und quantitativ untersucht.

Abstract

Proteome analysis includes the identification and quantitation of all proteins in a cell, tissue, or biological fluid at a given time point and under well defined conditions. Because of the immense complexity and the broad dynamic concentration range of the proteins (up to $1:10^{10}$), analytical methods for investigating these heterogeneous samples must enable highly efficient separations of proteins in combination with highly sensitive detection methods. This thesis describes the development and optimization of different chromatographic methods for the separation of intact proteins. Ion-pair reversed-phase micro high performance-liquid chromatography (IP-RP-micro-HPLC) was chosen and hyphenated to mass spectrometric (MS) detection using time-of-flight (TOF) and ion trap mass analyzers. Moreover, a chromatofocusing method was developed and optimized. In combination with the described IP-RP-micro-HPLC-TOF-MS method, the chromatofocusing method allowed the multidimensional analysis of intact proteins in complex proteomes. All developed methods were evaluated with regard to reproducibility, robustness, as well as orthogonality. They were employed to the characterization of glycosylated proteins and for the separation and detection of proteins in human serum and in an *Escherichia coli* lysate. Furthermore whey samples and an extract of gliadins from wheat flour were qualitatively and quantitatively analyzed.

Verwendete Abkürzungen

AS	Aminosäure/n
BPC	Basispeak Chromatogramm (base peak chromatogram)
BSA	Rinderserumalbumin
CE	Kapillarelektrophorese
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	Extrahierter Ionenstrom (extracted ion current)
ESI	Elektrosprayionisation
ETD	Elektronentransfer Dissoziation
GE	Gelelektrophorese
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
i.D.	Innendurchmesser
IEC	Ionenaustauschchromatographie (ion exchange chromatography)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP-RP-HPLC	Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie (ion pair-reversed phase chromatography)
it	Injektionszeit (injection time)
IT	Ionenfalle (ion trap)
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (matrix assisted laser desorption/ionisation)
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung
NWG	Nachweisgrenze
pH	Säuremaß
pI	Isoelektrischer Punkt
PFF	Peptidfragment Fingerprint
PMF	Peptidmassen Fingerprint

PS/DVB	Poly(Styrol-Divinylbenzol), Polymer
PTM, PTMs	Posttranslationale Modifikation, Posttranslationale Modifikationen
RNA	Ribonukleinsäure/n
RPC	Umkehrphasenchromatographie (reversed phase chromatography)
RSD	relative Standardabweichung
RTICC	rekonstruiertes Totalionenstrom Chromatogramm (reconstructed total ion current chromatogram)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBP	Tributylphosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Totalionenstrom (total ion current)
TOF	Flugzeit (time-of-flight)
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbarer Bereich des Lichtes (visible)

Teil I

Allgemeiner und theoretischer Teil

1 Proteine

Proteine bilden einen wichtigen Baustein innerhalb von Zellen und Organismen im Gesamten. Während Nukleinsäuren in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Kodierung für den Aufbau und die Wirkung von Proteinen bilden, wird über Ribonukleinsäuren (RNA) die Synthese von Peptiden und Proteinen gewährleistet, die wiederum für das Leben der Zelle und zum Ausführen verschiedener Vorgänge in der Zelle unerlässlich sind. Proteine sind essentielle Elemente beim Aufbau eines jeden Organismus, wirken als Rezeptoren oder Hormone und regulieren damit den Stoffwechsel und die Immunabwehr. Natürliche und medizinisch relevante Wirkstoffe wie Immunglobuline oder einige Antibiotika sind Proteine, wodurch ihnen auch bei externer Zufuhr therapeutische Relevanz zukommt. Aufgrund der vielfältigen Aufgaben, die diese Stoffklasse besitzt, sind sowohl der Aufbau als auch die jeweils vorliegende Menge sehr verschieden und stark abhängig vom Zellzustand (Alter, Funktionsfähigkeit). In Kombination mit den Nukleinsäuren bilden Peptide und Proteine etwa 67 % der Zelltrockenmasse ^[1]. Der große dynamische Konzentrationsbereich, den jeweils einzelne Proteine gemessen am Gesamtzellprotein aufweisen erschwert die Bestimmung des Zellproteoms ^[2]. Die gering konzentrierten Proteine und Peptide sind jedoch zum Verstehen der Stoffwechselfvorgänge und zur Diagnose proteininduzierter oder auf Proteine wirkender Krankheiten ebenso unerlässlich wie die in großer Menge vorliegenden. Zur Etablierung von analytischen Methoden müssen daher sowohl der Aufbau von Proteinen und Peptiden allgemein als auch im Speziellen sowie ihre Eigenschaften beachtet werden.

1.1 Struktur und Aufbau von Proteinen und Aminosäuren

Proteine und Peptide sind aus Aminosäuren aufgebaut, die durch so genannte Peptidbindungen verknüpft sind. Dabei handelt es sich um eine Reaktion zwischen der Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der Aminogruppe einer weiteren Aminosäure unter Wasserabspaltung. In Abbildung 1 ist die Sequenz eines Pentapeptids beginnend beim N-Terminus, d.h. der Aminosäure mit freier α -Aminogruppe, aus den Aminosäuren Alanin, Glycin, Serin, Phenylalanin und Lysin gezeigt. Die Aminosäurebausteine sind dabei unterschiedlich hell unterlegt.

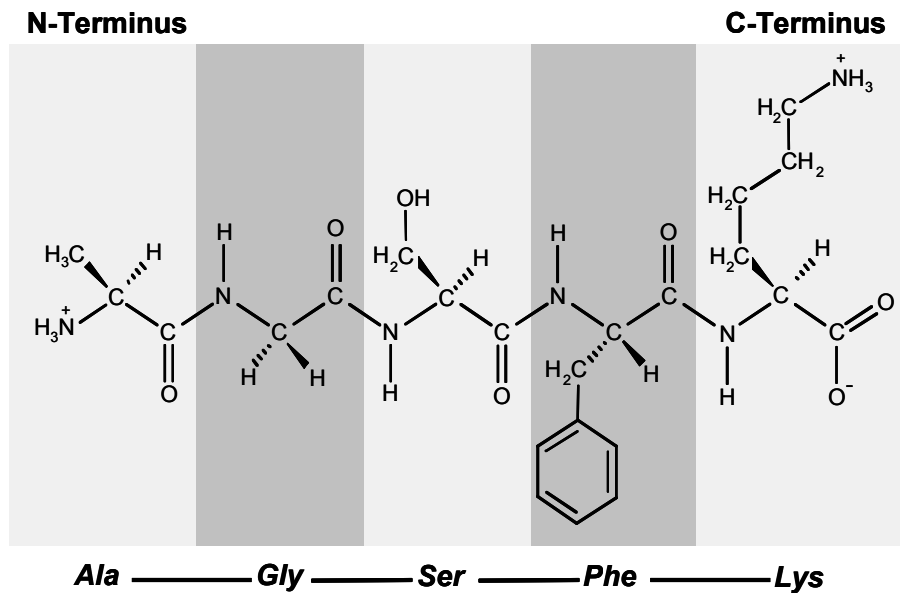


Abbildung 1: Aufbau des Peptapeptids Ala-Gly-Ser-Phe-Lys

Biologisch relevante und gleichzeitig natürliche Aminosäuren sind die 20 proteinogenen Aminosäuren, die in Tabelle 1 mit ihrem Drei- und Einbuchstabencode gezeigt sind. Hierbei handelt es sich um aliphatische oder aromatische Carbonsäuren mit mindestens einer α -ständigen Aminogruppe. Andere Carbon- oder Sulfonsäuren mit α -, β - oder γ -ständigen Aminogruppen können ebenfalls biologische Relevanz zeigen, gehören jedoch nicht zu den proteinogenen Aminosäuren, da sie in natürlich aufgebauten Peptiden und Proteinen nicht oder nur selten bei bestimmten Bakterien auftreten ^[1].

Aminosäuren besitzen aufgrund ihrer funktionellen Säure- und Aminogruppen ampholytischen Charakter und sind daher sowohl in sauren als auch in basischen Medien löslich. Bei ausgeglichener Ladung, bzw. am so genannten Isoelektrischen Punkt pI , der je nach Azidität und Basizität der vorhandenen funktionellen Gruppen bei definiertem pH-Wert des Lösungsmittels vorliegt, sind die Löslichkeit der jeweiligen Aminosäure im Medium sowie die Mobilität im elektrischen Feld minimal. Ausgehend vom pI wird durch Erhöhung bzw. Erniedrigung des pH-Wertes des Mediums die Löslichkeit gewährleistet ^[3]. Die Ladungsverteilung an Aminosäuren ist in Abbildung 2 gezeigt.

Tabelle 1: Strukturen und Bezeichnungen der proteinogenen Aminosäuren

Glycin	Gly (G)		Asparagin	Asn (N)	
Alanin	Ala (A)		Glutamat	Glu (E)	
Valin	Val (V)		Glutamin	Gln (Q)	
Leucin	Leu (L)		Arginin	Arg (R)	
Isoleucin	Ile (I)		Lysin	Lys (K)	
Serin	Ser (S)		Histidin	His (H)	
Threonin	Thr (T)		Phenylalanin	Phe (F)	
Cystein	Cys (C)		Tyrosin	Tyr (Y)	
Methionin	Met (M)		Tryptophan	Trp (W)	
Aspartat	Asp (D)		Prolin	Pro (P)	

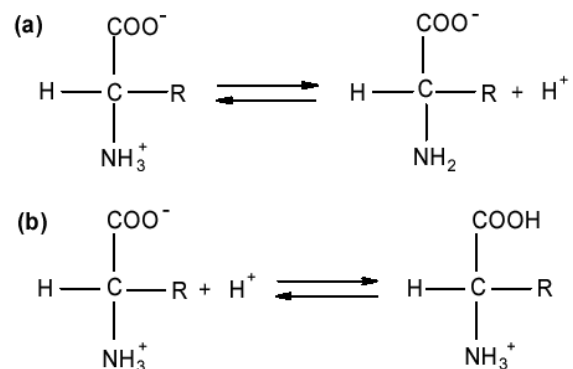


Abbildung 2: Säure-Base-Verhalten von Aminosäuren:

(a) pH-Erhöhung, (b) pH-Erniedrigung

Zusätzliche Funktionalität wird je nach Aminosäure durch die Anwesenheit von Hydroxyl-, Mercapto- oder Aminocarbonylgruppen gewährleistet. Auch Heterozyklen, aliphatische und aromatische Seitenketten beeinflussen die chemischen, physikalischen und auch biologischen Eigenschaften ^[3]. Die Einteilung der Aminosäuren anhand ihrer funktionellen Gruppen zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Klassifizierung der proteinogenen Aminosäuren (AS) anhand ihrer funktionellen Gruppen

➤	aliphatische Aminosäuren:	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I)
➤	Hydroxyaminosäuren:	Ser (S), Thr (T)
➤	Aminodicarbonsäuren:	Asp (D), Glu (E)
➤	Aminodicarbonsäureamide:	Asn (N), Gln (Q)
➤	basische Aminosäuren:	Lys (K), Arg (R), His (H)
➤	schwefelhaltige Aminosäuren:	Cys (C), Met (M)
➤	zyklische Aminosäuren:	Pro (P)
➤	aromatische bzw. heteroaromatische AS:	Phe (F), Tyr (Y), Trp (W)

Mit Ausnahme des Glycins besitzt jede proteinogene Aminosäure ein Chiralitätszentrum α -ständig zur Carboxylgruppe (Amino-Kohlenstoffatom), woraus die optische Aktivität der Strukturen resultiert. Nach der Fischer-Nomenklatur erhält jede Aminosäure die Präfix D- oder L- sowie den Index (+) oder (-), welcher die lichtdrehende Wirkung beschreibt. Die 20 proteinogenen Aminosäuren können transskriptorisch vom menschlichen Organismus nur in ihrer L-Konformation verwendet werden ^[1].

Die Verknüpfung von Aminosäuren resultiert in Peptidketten, die nach ihrer Länge eingeteilt werden können: bei Kettenlängen von bis zu 100 Aminosäureeinheiten wird im Allgemeinen von Peptiden gesprochen, die wiederum in Oligo- (etwa 2-9 Aminosäuren) und Polypeptide (10-100 Aminosäuren) unterteilt werden können. Ab einer Länge von 100 Aminosäuren handelt es sich um Proteine ^[1].

Während Peptide mit geringer Länge meist gestreckt mit den Peptidbindungsatomen in einer Ebene liegend existieren, führen verschiedene Wechselwirkungen zwischen

den funktionellen Gruppen der Aminosäuren und posttranslationale Umsetzungen bei langen Polypeptidketten zu komplexen dreidimensionalen und funktionalen Strukturen. Die eigentliche Aminosäuresequenz wird dabei als Primärstruktur bezeichnet [3].

Die aus der Ebene herausragenden funktionellen Gruppen an den Aminosäureresten wechselwirken über van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken miteinander und stabilisieren damit die Sekundärstruktur, also die Ausbildung lokaler Konformationen. Am häufigsten kommen die α -Helix und das β -Faltblatt vor, die beide in Abbildung 3 gezeigt sind. Die Stabilisierung der rechtsdrehenden Spirale α -Helix erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen der Carbonylgruppe einer Aminosäure mit der Amidgruppe der sequenziell um vier Einheiten entfernten bzw. in der folgenden Spiralwindung benachbarten Aminosäure. Unter den β -Faltblättern sind zwei planare Anordnungen zu unterscheiden: in der parallelen Anordnung werden zwei Peptidketten gleichgerichtet über Wasserstoffbrücken stabilisiert, in der antiparallelen Anordnung werden die Peptidketten gegenläufig über Wasserstoffbrücken stabilisiert.

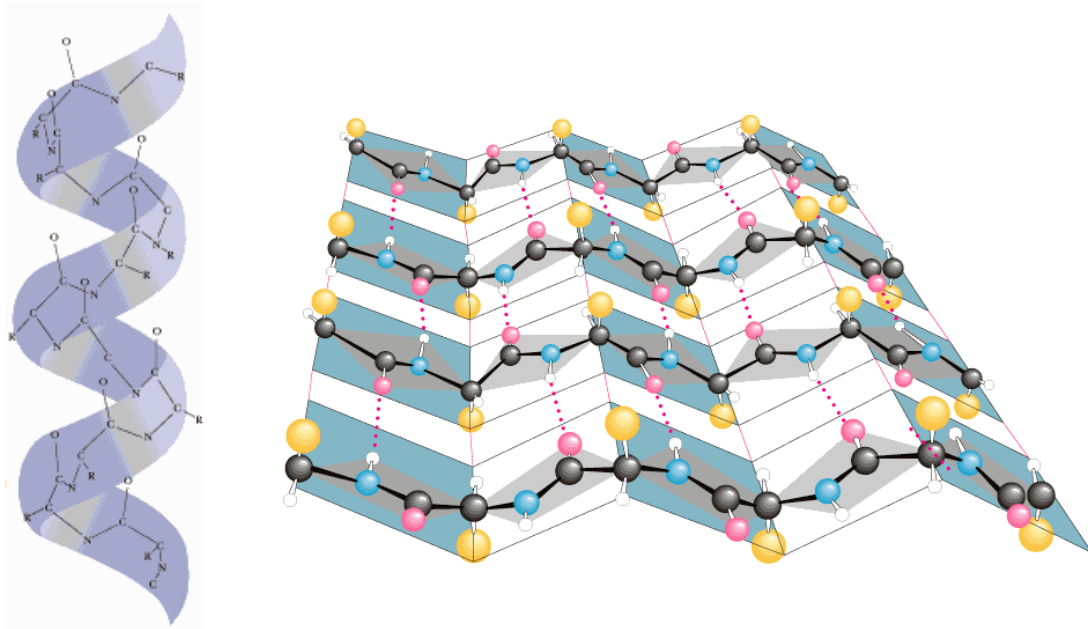


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konformationen α -Helix (links) und β -Faltblatts (rechts)

Außerdem kommt es zu statistisch verteilten Knäuelkonformationen, so genannten random coils. Welche Form ausgebildet wird, ist entscheidend abhängig von der Primärstruktur, da einzelne Aminosäuren zur Ausbildung stabilisierender

Wechselwirkungen durch Drehung oder Faltung des Peptidrückgrats und der Seitenketten eine entsprechende Nähe aufweisen müssen. Die Verbindung einzelner Strukturabschnitte wird durch Schleifen oder Turns gebildet, die zumeist polare Aminosäuren beinhalten, da in diesen Bereichen der Polypeptidkette nicht selten die biologische Funktionalität bzw. Wechselwirkungen oder Bindungen zu kleinen Molekülen oder anderen Polypeptidketten etabliert werden ^[3]. Durch Umsetzungen an der Primärstruktur können so genannte posttranslationale Modifikationen (PTM) ausgebildet werden. Der häufigste Vertreter dieser Modifikationen ist die Ausbildung von Disulfidbrücken durch Oxidation zweier Thiolgruppen von Cysteinresten. Diese kovalente Bindung stabilisiert die Faltung der Kette und die lokalen Konformationen und ermöglicht weitere Wechselwirkung zwischen den Aminosäureresten der einzelnen Abschnitte des Polypeptids.

Die Tertiärstruktur beschreibt die Gesamtheit der dreidimensionalen Struktur der Polypeptidkette inklusive aller Abschnitte der Sekundärstrukturen sowie deren Richtung zueinander. Die funktionale Annäherung und Zusammenlagerung verschiedener oder gleichartiger Polypeptidketten sowie die kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkung mit funktionalen Molekülen, den so genannten prosthetischen Gruppen, wird letztlich als Quartärstruktur bezeichnet. Das wohl bekannteste Beispiel eines so quartär strukturierten Proteins ist das menschliche Hämoglobin, das aus je zwei gleichen Polypeptidketten, also vier Monomeren, durch nicht-kovalente Bindung gebildet wird und als prosthetische Gruppe koordinativ einen Porphyrinfarbstoff besitzt. Diese Gruppen können, wie beispielsweise im Protein Cytochrom C auch kovalent an die Polypeptidkette gebunden sein.

Auf dieser strukturellen Ebene wird somit die Wirkung bzw. die Aufgabe des Proteins oder Proteinkomplexes gewährleistet, da z. B. beim Hämoglobin der Sauerstofftransport im Blut die Aufgabe des Proteins ist und dieser durch die Anlagerung des Sauerstoffs an ein durch den Porphyrinring der Hämgruppe komplexiertes Eisen(II)kation gewährleistet wird. Auch weitere posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierungen, die vornehmlich an Aspartat- (D-) oder Asparaginresten (N-glycosidisch) lokalisiert sind ^[4], oder Phosphorylierungen ^[5] sowie Acetylierungen oder Hydroxylierungen tragen zur Funktionalität bei. Abbildung 4 zeigt die Bausteine von Glycanstrukturen ^[6]. Durch Kondensation der einzelnen Komponenten in unterschiedlichen Monomierzusammensetzungen und durch die Bildung von Verzweigungen entsteht eine Vielzahl verschiedener Glycane,

die die Komplexität von Proteinen nochmals erhöhen. Es folgt somit nicht nur auf Grund der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen eine große Vielfalt verschiedener Strukturen, die Heterogenität wird durch die unterschiedlichen und verschieden stark ausgeprägten PTMs noch verstärkt, was die Analyse solcher Proteine in komplexen biologischen Matrices erschwert.

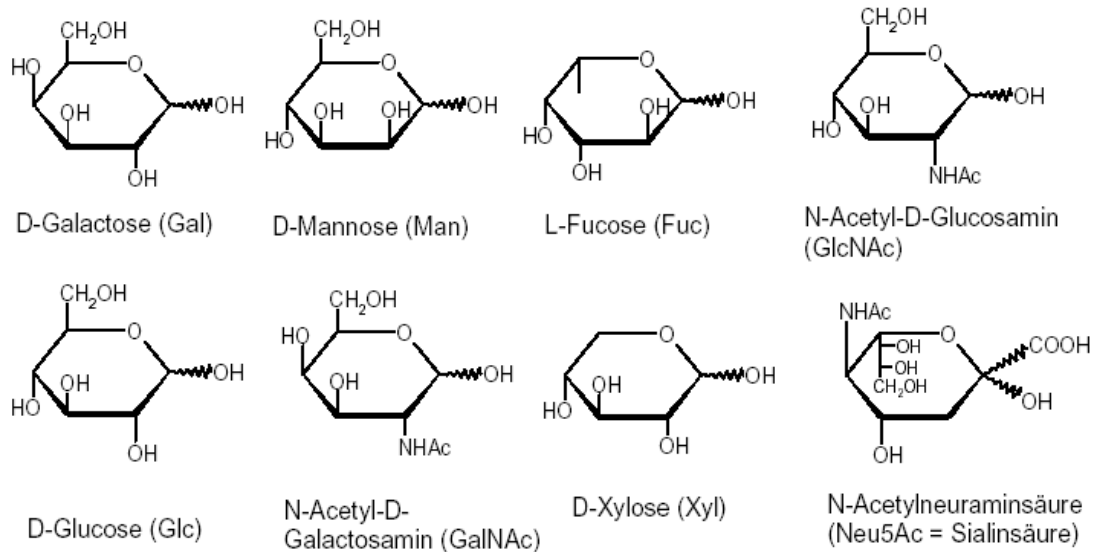


Abbildung 4: Bausteine von Glycanstrukturen

1.2 Einteilung und Funktion von Proteinen

Proteine lassen sich auf verschiedene Weisen klassifizieren. Fibrilläre oder Skleroproteine bestehen aus sehr geordneten, linearen Strukturen wie β -Faltblattabschnitten. Diese Proteine haben häufig eine stark herabgesetzte Wasserlöslichkeit und besitzen meist strukturgebende Funktion. Ein Beispiel hierfür ist das Kollagen. Das Gegenstück bilden die globulären oder Sphäroproteine, die in ungeordneter Weise verschiedene Formen mit einem hohen Anteil an α -Helices besitzen und dadurch eine kugelförmige oder ellipsoide Tertiärstruktur annehmen können. Diese Proteine sind meistens gut wasserlöslich und funktional sehr vielfältig. Eine weitere Einteilung kann aufgrund ihrer physiologischen Funktion im Organismus erfolgen. Die erste Unterscheidung erfolgt hierbei zwischen strukturgebenden, wie bspw. Kollagen, und regulatorisch wirkenden Proteinen. Diese lassen sich wiederum unterteilen in peptidbasierte Hormone wie das Insulin, Transportproteine wie das bereits erwähnte Hämoglobin, Antikörper zur Abwehr organismusfremder

Substanzen in Form der Immunglobuline und Enzyme, die in verschiedenen Formen an nahezu jedem Schritt von Biosynthesen und Abbaureaktionen innerhalb des Stoffwechsels beteiligt sind ^[3].

Enzyme haben wegen ihrer hohen Substratspezifität auch außerhalb des Organismus an Bedeutung gewonnen. Im analytischen Bereich wurde eine Vielzahl verschiedener enzymbasierter Methoden zum Nachweis unterschiedlichster Substanzen entwickelt. So sind bspw. Enzymimmunoassays etabliert, die einen schnellen und spezifischen, also sicheren Nachweis von bestimmten Toxinen, wie dem für den Menschen hochgiftigen Ochratoxin in nahezu jeder Matrix erlauben. Durch die Verwendung von Proteasen wurde die heutige massenspektrometrische Proteinanalytik sowohl in elektrophoretischer als auch in chromatographischer Hinsicht erleichtert bzw. die Charakterisierung durch Vereinfachung der Probenkomplexität ermöglicht. Auf die enzymatische Spaltung von Proteinen und die Analyse der erhaltenen Peptide wird in Kapitel 4 ausführlich eingegangen.

Auch zur Reinigung und Aufkonzentrierung spezifischer Biomarker können Proteine dienlich sein. So lassen sich aus biologischen Matrices glycosylierte Proteine durch Anreicherung an mit Concanavalin A belegten stationären Phasen entfernen und getrennt von nicht-glycosylierten Proteinen nachweisen und charakterisieren ^[7].

Gerade in Bezug auf die Interpretation von Analyseergebnissen in der Proteinanalytik muss beachtet werden, dass Proteine nicht grundsätzlich in ihrer aktiven, funktionsfähigen Form vorliegen müssen. Die Codierung der Aminosäuresequenz in der DNA des Organismus sieht zumeist eine Sequenzerweiterung bei der Übersetzung der transfer-RNA in die eigentliche Aminosäuresequenz vor. So werden Proteine zunächst als Proproteine biosynthetisiert und anschließend durch PTMs komplettiert, bevor sie durch spezifische Proteasen von definierten Sequenzabschnitten getrennt und damit aktiviert werden. Die abgespaltenen Peptide werden als Signal- oder Propeptide bezeichnet. Ein komplexes Beispiel für diese Aktivierung gibt das Chymotrypsinogen bzw. der Umsatz zum aktiven Chymotrypsin. Die Synthese des Chymotrypsinogens umfasst eine Kettenlänge von 245 Aminosäuren, deren Konformation an den Stellen 1 und 122, 42 und 58, 136 und 201, 168 und 182 sowie 191 und 220 durch Disulfide stabilisiert wird. Anschließend erfolgt die Restriktion durch bereits aktives Chymotrypsin oder anwesendes Trypsin an insgesamt 4 Stellen und damit die Entfernung von 2 Propeptiden mit jeweils 2 Aminosäuren aus der Mitte der Kette heraus. Die aktive Form des Enzyms besteht

somit aus 3 durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten verschiedener Länge und Sequenz^[8].

Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass nur die Peptidanalyse zur eindeutigen Identifizierung von Proteinen trotz umfangreicher Sequenzdatenbanken und sehr genauer massenspektrometrischer Ergebnisse nicht eindeutig sein muss. Für ein exaktes Ergebnis wäre eine 100 %ige Sequenzabdeckung beim Vergleich der ermittelten Aminosäuresequenzen mit den *in silico* verdauten Peptidsequenzen aus den Datenbanken nötig. Diese wird jedoch in den seltensten Fällen erreicht. Nur die Analyse in molekularer Form kann eine komplette Abdeckung der gesamten Sequenz gewährleisten, was auch die Unterscheidung von Proproteinen und aktiven Proteinformen erleichtern bzw. ermöglichen würde^[9,10].

Das Beispiel des Chymotrypsins zeigt eine weitere Eigenschaft von Enzymen: die Autoregulation zur Aufrechterhaltung der benötigten Gesamtaktivität innerhalb der Zelle oder des Organismus.

1.3 Das Proteom

Die Summe aller Proteine sowie die quantitative Zusammensetzung eines Zellzustandes oder -teils (z. B. Zellmembran, Zellkern) oder einer biologischen Flüssigkeit bildet das so genannte Proteom^[11]. Es handelt sich um eine sehr vielfältige Mischung verschiedenster Proteinsequenzen mit und ohne Modifikationen, die in verschiedenen Ausprägungen vorliegen können, mit sehr stark variierenden Konzentrationen der Einzelstrukturen. In Abbildung 5 ist diese heterogene Verteilung anhand der Zusammensetzung des menschlichen Plasmas illustriert. Neben den überwiegenden Proteinen Albumin und Immunglobulin G gehören Transferrin, Fibrinogen und die anderen namentlich in Abbildung 5 gezeigten Proteine zu den zehn hochabundanten Inhaltsstoffen der Plasmaproteine^[3]. Hier sind allerdings nachweislich etwa 10,000 einzelne Proteine pro Zeiteinheit bzw. Stadium enthalten. Mit Ausnahme der genannten werden diese Plasmaproteine in den verbleibenden 10 % Gesamtprotein zusammengefasst. Da auch innerhalb dieser gering-konzentrierten Plasmafraktion große Mengenunterschiede auftreten, kommt es zu einem dynamischen Konzentrationsbereich von bis zu $1:10^{10}$, gemessen am Albuminanteil^[12].

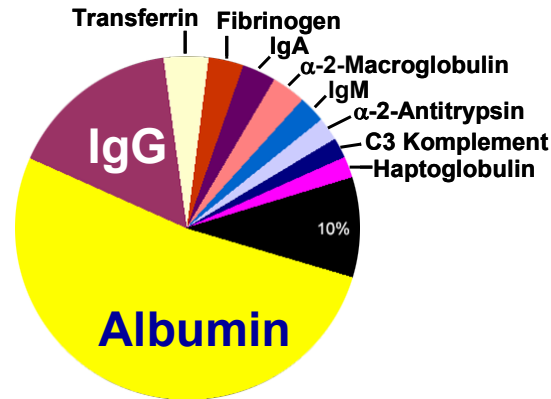


Abbildung 5: Zusammensetzung von menschlichen Plasmaproteinen

Das Zusammenspiel von Art und Konzentration der Proteine bedingt das Leben von Zellen und die Funktion von biologischen Flüssigkeiten und ganzen Organismen. Über- oder unterexprimierte Proteine können die Abläufe in der Zelle oder im Blut stark beeinflussen. So sind einige Krankheiten bekannt, die durch das Fehlen von Proteinen oder Proteinaktivität auftreten, wie bspw. Diabetes, wo durch fehlendes Insulin der Abbau von Zuckern im Organismus gehemmt ist. Auch Veränderungen in der Proteinstruktur oder des Modifikationsgrades können Anzeichen für Krankheiten sein ^[13]. So wird bspw. das Glycoprotein Transferrin als Biomarker für Alkoholismus benutzt, da durch den Vergleich der Transferrin-Glycanstrukturen von nachgewiesenen alkohol-abstinenten Personen mit denen von Alkoholikern große Unterschiede im Glycosylierungsgrad beobachtet worden sind ^[14,15].

Die beschriebene Heterogenität bezüglich der Konzentration führt in der Proteinanalytik zu großen Schwierigkeiten bei der Charakterisierung und Identifizierung der geringer konzentrierten Proteine in der Gesamtmatrix. Aus diesem Grund finden verschiedene Methoden zur Dekomplexierung des Proteoms in so genannte Subproteome, also kleinere, jedoch noch immer komplexe Mischungen, neben Affinitätsmethoden zur Eliminierung einzelner Proteine oder Proteingruppen Anwendung. Die chromatographischen Möglichkeiten zur Vereinzelung und Trennung von Proteinen werden in Kapitel 2 erläutert, da sie einen essentiellen Anteil dieser Arbeit darstellen.

1.4 Chemische Umsetzungen in der Proteinanalytik

Für verschiedene Fragestellungen ist es in der Bioanalytik nötig, die Analyten chemisch zu verändern. Neben der chemischen Spaltung bildet das bekannteste Beispiel hierfür der proteolytische Verdau, weil die Identifizierung von Proteinen auf Basis ihrer spezifischen Verdaupeptide mittels Tandem-Massenspektrometrie und Datenbankvergleich erfolgt. Eine Übersicht über Spaltungsreagenzien und Enzyme sowie ihre Wirkung liefert Tabelle 3 ^[16,17]. Um der Protease (meistens Trypsin, oft Pepsin oder Endoproteinase Glu-C, selten Chymotrypsin oder andere) die optimale Möglichkeit zu geben, die spezifischen Schnittstellen an der Proteinsequenz zu erreichen und dort zu wirken, werden verschiedene Umsetzungen des Proteins vor dem eigentlichen Verdau durchgeführt.

Diese Vorbereitung umfasst zunächst die Denaturierung der Proteine und die reduktive Spaltung anwesender Disulfidbrücken, so dass die Tertiär- und Quartärstruktur komplett und die Sekundärstruktur größtenteils zerstört werden. Denaturiert wird häufig mit Harnstoff oder Guanidin-Hydrochlorid bei einem pH-Wert von etwa 8. Die Reduktion der oxidierten Cysteine kann mit Dithiothreitol (DTT) oder Phosphinen wie Tributylphosphin (TBP) erfolgen. Damit sich die Cysteinreste nicht erneut zu Disulfiden verbinden, wird zumeist eine Umsetzung der freien Sulfhydrylgruppen mit kleineren Molekülen wie Iodacetamid, Iodessigsäure oder para-Vinylpyridin durchgeführt. Nach Entfernung der Denaturierungs- und Alkylierungsreagenzien durch Dialyse oder Ultrazentrifugation kann die enzymatische Spaltung durchgeführt werden. Enzyme werden in Protein-Enzym-Verhältnissen von 10:1 bis 100:1 zugegeben und für einige Zeit unter den optimalen Wirkungsbedingungen des Enzyms inkubiert.

Durch den Verdau der Proteine, die in Mischung sehr unterschiedliches Verhalten auf chromatographischer und massenspektrometrischer Ebene aufweisen, entsteht eine weitaus homogenere Peptidmischung.

Tabelle 3: Spezifität von chemischen Spaltungsreagenzien und Enzymen

Reagenz	Spaltstelle
Chemische Spaltung	
Bromcyan	Carboxylseite von Methioninresten
O-Iodosobenzoat	Carboxylseite von Tryptophanresten
Hydroxylamin	Asparagin-Glycin Bindungen
2-Nitro-5-thiocyanobenzoat	Aminoseite von Cysteinresten
Ameisensäure	Asparaginsäure-Prolin Bindungen
Enzymatische Spaltung	
Trypsin	Carboxylseite von Lysin- und Argininresten
Chymotrypsin	Carboxylseite von Tyrosin-, Tryptophan-, Phenylalanin-, Leucin-, Histidin- und Methioninresten
Pepsin (pH 1.3)	Carboxylseite von Phenylalanin- und Leucinresten
Glu-C Protease	Carboxylseite von Glutaminsäureresten
Asp-N Protease	Aminoseite von Asparaginsäureresten

Weitere chemische Umsetzungen werden zur relativen Quantifizierung von Peptiden und Proteinen durchgeführt. Es erfolgt zumeist eine Isotopenmarkierung der Proteine, wobei verschiedene Proben (Extrakte von Zellstadien oder gesunden und kranken Zellen) unterschiedlich schwere Isotope erhalten, anhand derer sie letztlich massenspektrometrisch unterschieden werden können. Es gibt hierfür vier Herangehensweisen:

1. Chemische Isotopenmarkierung von Proteinen

Spezifische Aminosäuren werden auf intakter Proteinebene mit einem Isotopenreagenz modifiziert. Die *Isotope Coded Affinity Tag* (ICAT)-Methode sieht eine Umsetzung von Cysteinresten mit einem Biotin-Derivat vor, das je nach Markierung 8 Wasserstoff- oder Deuteriumatome trägt ^[18-23]. Die *Isotope Coded Protein Labeling* (ICPL)-Methode sieht die Markierung mit Kohlenstoffisotopen-tragender Nikotinsäure an Lysinresten und der freien

Aminogruppe von Proteinen vor ^[24]. Die Analyse erfolgt hauptsächlich anhand der Verdaupeptide der markierten Proteine.

2. Chemische Isotopenmarkierung von Peptiden

Die Markierung erfolgt nach Durchführung des enzymatischen Verdau der Peptide ^[25,26]. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die *isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation* (iTRAQ)-Methode, in der die ϵ -Aminogruppe von Lysinresten und die freie Aminogruppe der Peptide isotopenmarkiert werden ^[27].

3. Metabolische Isotopenmarkierung

Die Modifizierung erfolgt in diesem Fall metabolisch bereits in der Zelle durch markierte Aminosäuren im Nährmedium, die essentiell für den Organismus sind und somit nur durch Aufnahme aus dem Medium in die Proteine eingebaut werden können. Diese Methode wird *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture* (SILAC) genannt ^[28]. Eine weitere Möglichkeit ist, das Nährmedium mit ¹⁵N-Isotopen anzureichern, wodurch die Isotope in die Synthese einbezogen werden können ^[29-32].

4. Enzymatische Isotopenmarkierung

Bei dem Verdau von Proteinen werden Sauerstoffatome aus der Reaktionslösung in die Peptide eingebaut, da es sich chemisch um eine Hydrolyse handelt. Dies kann bei Ausführen der Reaktion in $H_2^{18}O$ ausgenutzt werden, um parallel zum Verdau die Markierung vorzunehmen ^[26,33-35].

Aufgrund der Markierungen wird bei der massenspektrometrischen Analyse eine Massendifferenz zwischen den unterschiedlich schwer markierten Peptiden erreicht. Der Intensitätsunterschied zwischen den Peptiden zeigt den relativen Gehalt der einzelnen Peptide bzw. Proteine im Vergleich für die beiden markierten Proben.

Markierungen mit Isotopen von Sauerstoff oder Stickstoff sind Deuteriummarkierungen vorzuziehen, wenn die chromatographischen Eigenschaften der unterschiedlich markierten, ansonsten jedoch gleichen Peptide gleichwertig sein sollen. Bei mit Deuterium markierten Peptiden wird in der Umkehrphasenchromatographie, der häufigsten Trennmethode vor der massenspektrometrischen Detektion, eine deutliche Retentionsverschiebung beobachtet, wodurch die Analyte bei unterschiedlichen Eluentzusammensetzungen der Massenspektrometrie zugeführt werden, wodurch sich auch ihre Ionisierbarkeit ändern kann ^[36].

1.5 Die Nutzung der Struktur zur Darstellung und Aufklärung der Aminosäuresequenz

Innerhalb dieser Arbeit sollte die amphiphile Struktur von Proteinen zugunsten ihrer Analytik eingesetzt werden. Anhand ihres ionischen Charakters in Verbindung mit dem hydrophoben Charakter des Proteinrückgrates bestand die Möglichkeit, verschiedene Mechanismen zur chromatographischen Trennung von Proteinen einzusetzen. Außerdem erlaubte die Ausbildung von Zwitterionen die Klassifizierung von Proteinen anhand ihrer pI-Werte. Diese Eigenschaften von Proteinen sollten chromatographisch genutzt werden, um die qualitative und quantitative Darstellung von Proteomen anhand der top-down Analysenstrategie umzusetzen und zu etablieren. Die Heterogenität von Proteomen aufgrund der unterschiedlichen Strukturen der Proteine und ihrem dynamischen Konzentrationsbereich sollte durch die Benutzung ihrer Eigenschaften zunächst verkleinert und schlussendlich durch Vereinzelung aufgehoben werden. Hierbei spielten posttranslationale Modifikationen und ihre Charakterisierung eine große Rolle. Durch gezielte Umsetzungen der modifizierten Proteine sollte eine Strategie gefunden werden, die Modifikationen und Glycosylierungen im Speziellen zusammen mit der Proteinstruktur darzustellen und zu identifizieren.

2 Analytische Trennmethodik von Proteinen

Wie bereits für Proteine beschrieben handelt es sich auch im Allgemeinen bei biologischen Proben zumeist um hochkomplexe Mischungen von Substanzen. Für eine genaue Analyse der Zusammensetzung solcher Proben sind Methoden zur Aufreinigung, Extraktion, Vereinzelung und Abreicherung der Matrix und einzelner Substanzen nötig. Im Falle der Proteomanalytik werden im Allgemeinen nach eventueller Zellyse Aussalzung und Ultrafiltration zur Entfernung der Matrix und Aufkonzentrierung der Proteine im Rahmen der Probenvorbereitung benutzt. Die anschließende Vereinzelung bzw. Proteomteilung erfolgt elektrophoretisch oder chromatographisch.

Sofern bestimmte Proteine nachgewiesen oder quantifiziert werden sollen, sind verschiedene spezifische immunologische Methoden etabliert worden, die auch ohne Vereinzelung zu genauen Ergebnissen führen. Hierzu gehören u. a. Immunoassays und Blotting-Methoden, in denen Antigen-Antikörper-Reaktionen zum Nachweis des speziellen Analyten ausgenutzt werden. Die Herstellung von Antikörpern, deren Spezifität sehr hoch und Kreuzreaktivität mit anderen Substanzen sehr niedrig sein muss, ist jedoch sehr teuer, so dass dieses Vorgehen für ein gesamtes Proteom nicht anwendbar ist, da für jedes im Proteom enthaltene Protein ein Antikörper vorliegen müsste. Für die Sensibilisierung von Organismen muss zunächst auch das Antigen in sehr reiner und aktiver Form vorliegen. Auch hierfür lassen sich chromatographische Methoden verwenden.

Aufgrund der Komplexität der Probenmatrices ist die Darstellung eines gesamten Proteoms durch Charakterisierung und Quantifizierung aller Proteine und Peptide sehr schwierig und bedarf effizienter Trenn- und empfindlicher Detektionsmethoden.

Abbildung 6 zeigt schematisch die gängigen Strategien in der Analytik von Proteomen^[37]. Sowohl in der top-down-^[38] als auch in der bottom-up-Strategie^[39] werden mehrdimensionale Trennungen elektrophoretischer^[40] und/oder chromatographischer^[41] Art durchgeführt. Die Detektion erfolgt letztlich durch Tandem-Massenspektrometrie der Verdaupeptide der Proteine. Zur Identifizierung werden anschließend Datenbankvergleiche durchgeführt. Den Unterschied bilden die getrennten Analyte: während in der bottom-up-Strategie von Beginn an die Verdaupeptide analysiert werden, wird in der top-down-Strategie zunächst die Vereinzelung auf intakter Proteinbasis durchgeführt^[42]. Dies hat für die bottom-up-

Methodik zur Folge, dass ein Protein zum Schluss der Analysenserie anhand verschiedener Peptide in unterschiedlichen Fraktionen nachgewiesen wird. Bei der top-down-Strategie wird die Gesamtheit der Verdaupeptide eines Proteins bei optimaler Vortrennung in nur sehr wenigen, aufeinander folgenden Fraktionen detektiert. Es ist jedoch zu beachten, dass die Trennung und vor allem die Detektion von Peptiden aufgrund der erhöhten Homogenität der Analyte wegen größerer Ähnlichkeit von Peptid- gegenüber Proteinanalyten einfacher durchzuführen ist.

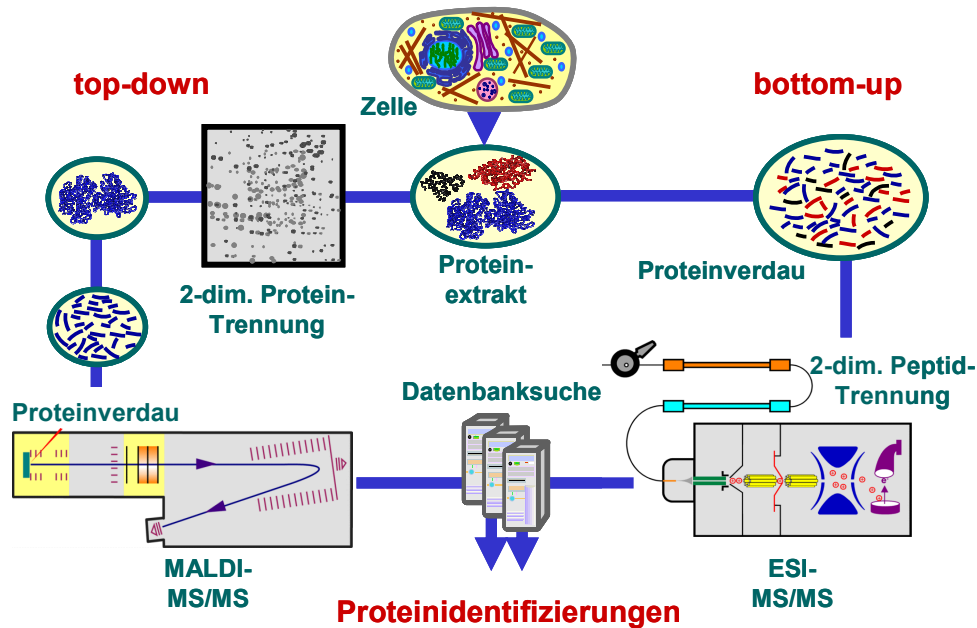


Abbildung 6: Strategien der Proteomanalytik; top-down und bottom-up

2.1 Elektrophorese

In der Elektrophorese wird die Eigenschaft von Proteinen und Peptiden ausgenutzt, unterschiedlich schnell im elektrischen Feld zu migrieren. Je nach Ladung der Analyten und Richtung des Feldes sowie Zusammensetzung des Mediums ergeben sich unterschiedliche aber oft charakteristische Bandenmuster. So können beispielsweise in der Lebensmittelanalytik in relativ kurzer Zeit Speziesnachweise für Fleisch- und Fischlebensmittel durchgeführt werden.

Die Wanderung wird durch Anlegen eines gleichgerichteten elektrischen Feldes entlang einer definierten Strecke gewährleistet, die durch ein feinporiges Gel (Flachbettgelelektrophorese) oder eine Matrix-gefüllte (Kapillargelelektrophorese)

oder ungefüllte (Kapillarelektrophorese) Kapillare limitiert wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von Größe und Ladung des Analyten. Für Proteine wird meistens die zweidimensionale Gelelektrophorese mit Isoelektrischer Fokussierung (IEF) in erster und SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) in zweiter Dimension benutzt. Durch Generierung eines pH-Gradienten innerhalb der Gelmatrix wird ausgenutzt, dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Bereich des pI-Wertes des Proteins null ist und sich in der Nähe des pH-Bereichs, der dem pI entspricht, das Protein anreichert. Bei der SDS-PAGE erfolgt die Trennung der Proteine nach Größe, indem der Einfluss der Eigenladung des Proteins durch Versetzen mit Natriumdodecylsulfat im Überschuss minimiert wird, da sich das selbst geladene Detergenz wie ein Mantel um die Analytmoleküle legt ^[42,43].

Die Detektion der Proteine erfolgt durch Anfärben der Proteinbanden im Gel beispielsweise mit Brilliantblau G oder Reduktion von Silberionen durch die Analyte. Die massenspektrometrische Analyse gelelektrophoretisch getrennter Proteine erfordert die Isolierung der Banden und Entfernung der Gelmatrix, was mit einem großen Arbeitsaufwand und nicht selten erheblichen Analytverlusten einhergeht. Im Falle der Kapillarelektrophorese ist die direkte MS-Analyse durch die bestehenden Kopplungstechniken mit Elektrosprayionisation oder die Nutzung von automatischen Spotinstrumenten zur Targetbelegung für die Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) erschwert. Die sehr geringen Flüsse, die in der Kapillarelektrophorese (CE) vorherrschen, sind für diese weitere Analytik theoretisch gut geeignet, praktisch erschweren sie jedoch die Handhabung, vor allem in Hinblick auf die Kopplung mit der Massenspektrometrie (MS): einerseits wegen der Potentialunterschiede, die in beiden Geräten benutzt werden, andererseits erfordert die MS flüchtige Hintergrundelektrolyte, was optimierte CE-Trennmethoden nicht grundsätzlich vorsehen. Die Absorption ultravioletten Lichtes der Wellenlängen ~214 nm (Peptidbindung) oder 280 nm (Phenylalanin-, Tryptophan- und Tyrosinreste) zur zerstörungsfreien Detektion bildet hingegen in der CE eine einfach umzusetzende Methode.

Die Interpretation der Bandenmuster bzw. Charakterisierung einzelner Analyte anhand der Masse oder des pI-Wertes erfolgt durch Vergleiche mit parallel getrennten und detektierten Markermischungen, die Proteine mit bekannten Massen (für SDS-PAGE) bzw. pI-Werten (für IEF) enthält.

2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) stellt mit ihrer Vielfältigkeit für sehr unterschiedliche Substanzen eine effiziente Trennmöglichkeit dar. Die große Menge an variablen Parametern in der Methodenauswahl ermöglicht die Kombination von Methoden und erlaubt recht einfach die Festsetzung von Prioritäten. So ist es möglich, Proteine nach verschiedenen Eigenschaften zu trennen, wobei beispielsweise in der Umkehrphasen HPLC aufgrund der organischen Lösungsmittel die irreversible Denaturierung der Proteine auftritt, während mit Ionenaustausch-Methoden die Aktivität der Analyte bei geeigneter Pufferung des Eluenten beibehalten werden kann. Die Trennung selbst erfolgt auf Grund von Wechselwirkungen zwischen dem Analyten, der stationären Phase und dem Fließmittel anhand der speziellen Eigenschaften wie Hydrophobie und Polarität. Definierte Porengrößen der stationären Phase können zu einer wechselwirkungsfreien Trennung nach Größe ausgenutzt werden. Auch die Belegung eines stationären Trägermaterials mit Antikörpern ist möglich, wodurch auch die Affinität einzelner Proteine zu den Antikörpern als Trennmechanismus verwendet werden kann. Außerdem besitzen chromatographische Methoden gegenüber Gelelektrophoresetechniken den Vorteil der leichteren Automatisierung und vereinfachten Kopplungsmöglichkeit mit der Massenspektrometrie ^[44,45]. Tabelle 4 fasst die in der Proteinanalytik verwendeten Trennmechanismen zusammen ^[46-50].

Die stationäre Phase besteht aus porösen oder unporösen sphärischen Teilchen eines Trägermaterials wie Kieselgel oder Styrol-Copolymeren an dessen Oberfläche die erwünschte Funktionalität aufgebunden wird. So basieren die üblichen Umkehrphasen auf Kieselgel, das mit aliphatischen Ketten von 4 bis 18 Kohlenstoffatomen belegt wird. Abgesehen von der Art der Funktionalität bestimmen sowohl die Dichte der Belegung und die Einführung von abschirmenden Schutzgruppen an freien Hydroxylgruppen des Silikat-Gerüsts, als auch die Dichte der Packung, die Größe der belegten Teilchen und der Poren sowie das Volumen, das zwischen den Teilchen besteht, die Fähigkeit der stationären Phase, Analyten effizient zu trennen.

Tabelle 4: Chromatographische Trennmechanismen in der Protein- und Peptidanalytik

Trennmethode	Abkürzung	Trennprinzip
nicht interaktive Methoden		
Größenausschluss-Chromatographie	SEC	Unterschiede in der Molekülgröße
interaktive Methoden		
Ionenaustauschchromatographie	IEC	elektrostatische Wechselwirkungen
Normalphasenchromatographie	NPC	polare Wechselwirkungen
Umkehrphasenchromatographie	RPC	solvophobe Wechselwirkungen
Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie	IP-RPC	elektrostatische und solvophobe Wechselwirkungen
Affinitäts-Chromatographie	AC	biospezifische Wechselwirkungen
Metallaffinitäts-Chromatographie	IMAC	Komplexbildung

Für die chromatographische Trennung vor allem großer Biomoleküle hat sich die Verwendung monolithischer stationärer Phasen bewährt. Monolithische Phasen weisen eine aktive Oberfläche auf, die in ihrer Trenneffizienz stark der Oberfläche poröser Teilchen ähnelt. Allerdings besitzen monolithische Phasen keine Mikroporen, so dass der Transfer der großen Moleküle durch die Säule erleichtert wird. Abbildung 7 zeigt vergleichend vier verschiedene Arten von Säulenpackungen ^[51].

- In Beispiel (a) handelt es sich um sphärische, poröse Partikel mit großem Teilchendurchmesser. Diese Packung weist eine hohe Permeabilität und große Zwischenpartikelvolumina auf, zeigt aber geringe Trenneffizienz.

- Auch in Beispiel (b) handelt es sich um sphärische, poröse Partikel allerdings mit kleinem Teilchendurchmesser. Diese Phase hat auf Grund des Teilchendurchmessers eine geringe Permeabilität und kleine Zwischenpartikelvolumina und wegen der kürzeren Diffusionslängen in den Poren eine hohe Trennleistung.
- Wiederum sphärische aber unporöse Partikel mit kleinem Teilchendurchmesser sind in Beispiel (c) gezeigt. Diese Phase besitzt eine geringe Permeabilität auf Grund kleiner Zwischenpartikelvolumina und eine hohe Trenneffizienz aber nur geringe Beladbarkeit ^[52].
- Beispiel (d) zeigt eine monolithische Phase. Neben einer hohen Permeabilität auf Grund fehlender Zwischenpartikelvolumina, da es sich um ein einziges poröses Partikel handelt, besitzt diese Phase eine hohe Trennleistung bei erleichtertem Massentransfer durch die Kanäle, was die Trennung großer Biomoleküle bevorzugt ^[53-58].

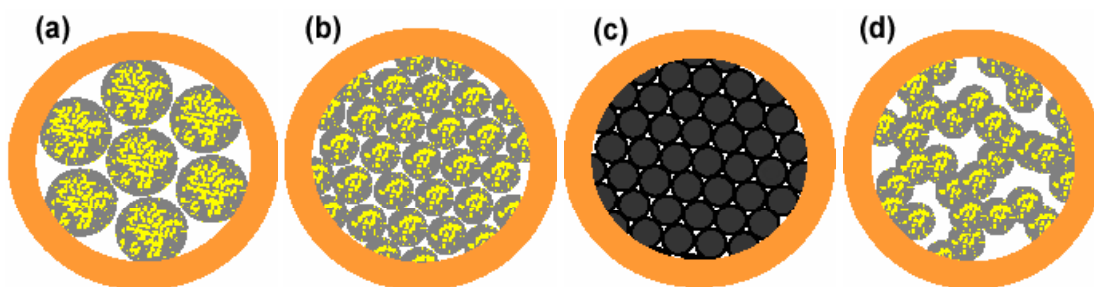


Abbildung 7: Vergleich verschiedener Säulenpackungen; (a) poröse, große Teilchen, (b) poröse, kleine Teilchen, (c) unporöse, kleine Teilchen, (d) Monolith

Auf die in dieser Arbeit verwendeten Trennmechanismen wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

2.2.1 Umkehrphasen- und Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie

Die Umkehrphasen HPLC (RP-HPLC) benutzt das Potential von Peptidsequenzen, solvophobe Wechselwirkungen mit einer hydrophoben stationären Phase in einem polaren Medium auszubilden ^[59]. Diese Wechselwirkungen werden je nach Größe und Entfaltung der Peptidkette an mehreren Stellen ausgebildet (Mehrpunktadsorption) ^[60]. Die Elution erfolgt durch Polaritätserniedrigung des

Eluenten bei Benutzung eines Gradienten mit zunehmendem Anteil an organischem Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril. Erst wenn alle wechselwirkenden Stellen durch den Eluenten von der stationären Phase getrennt worden sind, erfolgt die Elution des Proteins oder Peptids. Diese Art von Wechselwirkungsmechanismus wird als on-off-Prinzip bezeichnet und erklärt die Tatsache, dass eine isokratische HPLC-Methode nicht wie bei anderen organischen Molekülen als Trennmethode anwendbar ist ^[61].

Die Ionenpaar-Umkehrphasen HPLC (IP-RP-HPLC) ist eine Weiterführung der Umkehrphasen HPLC. Durch den Zusatz eines Ionenpaares, also eines kleinen organischen Moleküls mit hydrophobem und ionogenem Charakter, beispielsweise Trifluoressigsäure-Ion (TFA) oder Triethylammonium-Ion, lassen sich neben den solvophob wechselwirkenden Bereichen des Proteins oder Peptids auch die polaren, geladenen Seitenketten zur Ausbildung von Wechselwirkungen ausnutzen. Der unpolare Rest des Ionenpaarreagenzes wechselwirkt solvophob mit der stationären Phase, wodurch ein elektrisches Oberflächenpotential erzeugt wird ^[62]. Die polaren Bereiche der Peptidkette können nun an dieser polarisierten Oberfläche wechselwirken ^[63-65]. Auch hier greift wieder das on-off-Prinzip. Abbildung 8 zeigt schematisch die beschriebenen Wechselwirkungen eines Proteins für die in dieser Arbeit überwiegend verwendete Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie an einer Octylphase (links) und einer Poly(Styrol-Divinylbenzol)-Phase (PS/DVB) mit TFA-Zusatz im Eluenten ^[51].

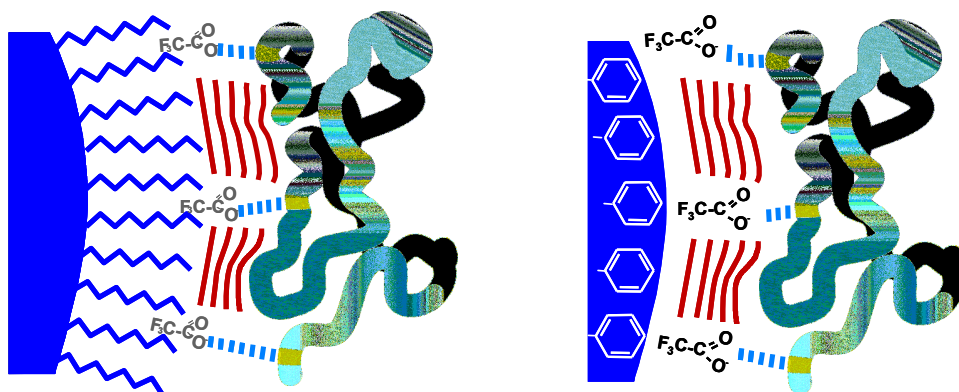


Abbildung 8: Prinzip der Wechselwirkungen eines Proteins mit einer Octylphase (links) und einer Poly(Styrol-Divinylbenzol)-Phase unter Zusatz von TFA als Ionenpaarreagenz

In der Proteinanalytik zeigen die RP-HPLC und IP-RP-HPLC die höchsten Trenneffizienzen im Vergleich zu anderen flüssigchromatographischen Methoden. Die Polypeptidstränge liegen weitestgehend entfaltet vor, aufgrund der denaturierenden Wirkung der Eluentenzusammensetzung auf die Stabilisierung der nativen Strukturen. Somit sind diese Methoden ungeeignet zur Trennung von Proteinen, wenn deren biologische Aktivität anschließend noch gegeben sein soll.

In Hinblick auf eine direkte Kopplung des Trennsystems mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie muss die RP- oder IP-RP-HPLC eindeutig als die Methode der Wahl angesehen werden ^[66,67]. Ein mittels Elektrosprayionisation an die Massenspektrometrie gekoppeltes HPLC-System sollte zum einen keine kristallisierbaren Salze im Eluenten aufweisen, bzw. die Eluenten sollten gut verdampfbar sein und möglichst ohne Clusterbildung entweder vor der MS-Analyse als Neutralteilchen entfernt werden oder als Ionen außerhalb des Messbereiches das Massenspektrometer durchqueren. Dies wird gewährleistet durch die Verwendung von Wasser und Acetonitril oder Methanol und ggf. einem organischem Ionenpaarreagenz als Eluenten ^[44]. Auch für eine anschließende MALDI-MS-Analyse eignen sich diese Systeme, da die Eluenten keinen negativen Einfluss auf die im Allgemeinen benutzten MALDI-Matrices besitzen und schon bei Raumtemperatur einen Dampfdruck besitzen, der zur Verflüchtigung führt, vor allem in Hinsicht auf geringe zum Spotten verwendete Matrix-Mengen ^[68]. Die Vorgänge bei der Ionisierung und Massenanalyse werden in Kapitel 3.2 weiterführend behandelt.

In dieser Arbeit wurden IP-RP-mikro-HPLC Methoden mit TFA als Ionenpaarreagenz unter Benutzung von Kapillarsäulen auf monolithischer Poly(Styrol-Divinylbenzol)-Basis entwickelt und angewendet. Auf die Miniaturisierung von HPLC-Systemen und -Methoden wird in Kapitel 2.2.4 näher eingegangen. Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Detektion der Substanzen nach erfolgter chromatographischer Trennung werden in Kapitel 3 beschrieben.

2.2.2 Ionenaustauschchromatographie

In der Ionenaustausch HPLC (IEX-HPLC) werden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Seitenketten der Peptide oder Proteine mit den am Trägermaterial verankerten, geladenen, funktionellen Gruppen der stationären Phase ausgebildet. Anhand der funktionellen Gruppen unterscheidet man zwischen

Kationen- und Anionenaustausch: Aminogruppen werden durch Protonierung auf Grund des pH-Wertes des Eluenten zu Gunsten des Anionenaustausches funktionalisiert, deprotonierbare Gruppen wie Sulfonsäuregruppen wirken als Kationenaustauscher. Abbildung 9 illustriert die Wechselwirkungen mit einem Protein anhand einer Kationenaustauscherphase ^[51].

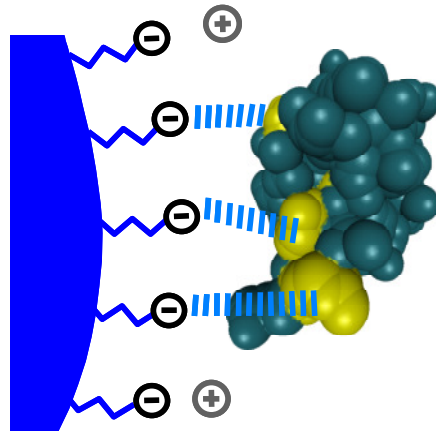


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen einem Protein und einer Kationenaustauscherphase; helle Zonen im Protein: positiv geladene Seitenketten

Die Elution erfolgt durch schrittweise oder lineare Steigerung der Salzkonzentration im pH-gepufferten Eluenten. Im Falle des Kationenaustauschs konkurrieren die Kationen des Eluenten mit den Analyten um die Positionen an der stationären Phase. Der pH-Wert des Eluenten muss während der Analyse durch pufferfähige Systeme wie Natrium-Dihydrogenphosphat / Dinatrium-Hydrogenphosphat konstant gehalten werden, da sonst zum einen die Aktivität der stationären Phase verändert wird und zum anderen die Ladung der Analyten variieren könnte, was einer reproduzierbaren Trennung entgegenstehen könnte. Dies gilt ebenfalls für den Anionenaustausch, bei dem allerdings die Anionen mit den negativ geladenen Analyten um Positionen an der stationären Phase konkurrieren.

Im Allgemeinen ist es möglich, basische Proteine oder Peptide mittels Kationenaustausch aufzutrennen, während saure Proteine keine Wechselwirkungen ausbilden und wegen überwiegend negativer Ladungen unretardiert von der Säule eluieren. Genau umgekehrt verhält es sich im Falle des Anionenaustauschs. Relativ neutrale Proteine, solche mit einem pI-Wert bei etwa 7, bilden hierbei eine Zwischengruppe. Wie gut die Trennung für diese Proteine und Peptide etabliert

werden kann, ist von dem pH-Wert des Eluenten abhängig, da zur Retention eines Proteins im Falle des Ionenaustauschs der Eluenten-pH-Wert um mindestens eine Einheit von dem pI-Wert des Analyten verschieden sein muss, um eine ausreichende Ladung des Proteins zu gewährleisten^[69].

Innerhalb dieser Arbeit wurden Proteine an einer starken, mit Sulfonsäuregruppen funktionalisierten und PS/DVB-basierten Kationenaustauscherphase getrennt und anschließend mittels IP-RP-micro-HPLC Flugzeit-MS analysiert.

2.2.3 Chromatofokussierung

Chromatofokussierung bezeichnet eine spezielle Art des chromatographischen Ionenaustauschs in Anlehnung an die Isoelektrische Fokussierung durch Ausnutzung des pI-Wertes von Proteinen^[70,71]. Die Trennung erfolgt wiederum an einer Ionenaustauschphase, allerdings nicht bei konstantem pH-Wert und steigendem Salzgehalt, sondern in einem pH-Gradienten unter Zusatz eines organischen Lösungsmittels^[72]. Die Proteine werden in grenzwertigem pH-Bereich des Eluenten auf die Säule aufgegeben und durch lineare pH-Änderung in den entgegen gesetzten pH-Bereich kontinuierlich bis zum Erreichen des pI-Wertes neutralisiert. Die Elution erfolgt bei dem Eluenten-pH, der dem pI-Wert entspricht, indem die nun nicht mehr wechselwirkenden Analyte unter Zuhilfenahme des organischen Lösungsmittelanteils mit dem Fließmittel die Säule verlassen^[72-74]. Die Wechselwirkungen bei verschiedenen pH-Werten an einer Anionenaustauscherphase sind in Abbildung 10 illustriert.

Die Eluenten erfordern eine starke Pufferung in mehreren Bereichen, um eine möglichst lineare pH-Änderung zu erzeugen^[75]. Dazu muss zunächst im hohen pH-Bereich bei etwa pH 10-11 die Pufferkapazität der Säule reguliert werden. Zu Beginn des Gradient, bei Zufuhr des sauren Eluenten B zum basischen Eluenten A ist mittels Durchfluss-pH-Messung im Allgemeinen ein Sprung um etwa eine pH-Einheit zu beobachten, der auf die Pufferkapazität der stationären Phase zurückzuführen ist^[70]. Ohne die Pufferung des Eluenten erweitert sich dieser Sprung auf zwei bis drei Einheiten, was die unretardierte bzw. Koelution der stark basischen Proteine zur Folge hat^[75].

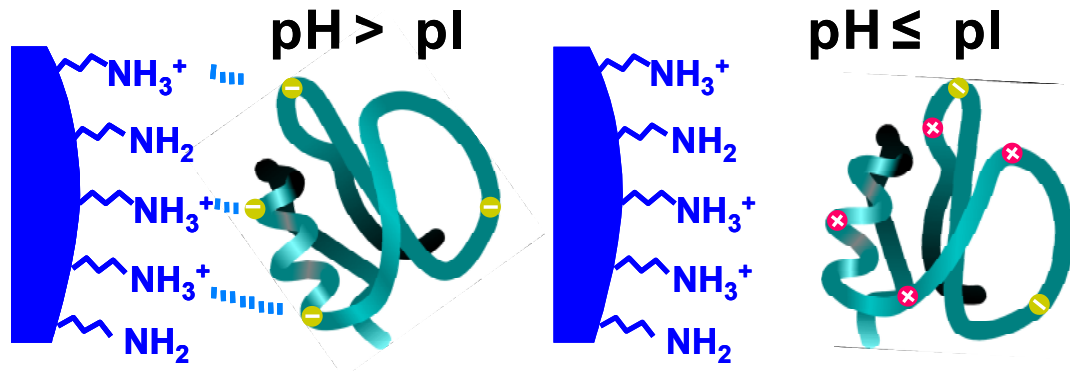


Abbildung 10: Prinzip der Chromatofokussierung eines Proteins an einer Anionenaustauscherphase;

links: Retention bei $\text{pH} > \text{pI}$, rechts: Elution bei $\text{pH} \leq \text{pI}$

Diese Methode erlaubt Einschätzungen über die pI -Werte der untersuchten Proteine und kann ergänzend zur Identifizierung mittels Massenspektrometrie herangezogen werden. Außerdem handelt es sich in diesem Fall, wie auch beim Ionenaustausch allgemein um eine Methodik, die sich der RP- und IP-RP-HPLC gegenüber orthogonal verhält, was die Kombination dieser Methoden zur Vereinzelung eines Proteoms ermöglicht.

2.2.4 Miniaturisierung

Speziell in der Bioanalytik ist die Miniaturisierung von Trennsystemen wegen der geringen verfügbaren Probenmenge den analytischen Maßen vorzuziehen. Durch die Verwendung von Mikro- oder Nanosystemen ist es möglich, im Vergleich zu analytischen Dimensionen Nachweisgrenzen zu verringern, Trenneffizienzen zu erhöhen und geringe Konzentrationen und Volumina zu untersuchen, was einen essentiellen Vorteil in Anbetracht der Unterschiedlichkeit einzelner Zellen und daraus herrührender Heterogenität von Proteinextrakten aus Zellen darstellt. Neben dem geringeren Verbrauch an stationärer Phase pro Säule ist bei geeigneter Instrumentierung auch die Verringerung des benötigten Eluentenvolumens pro Analyse ein möglicher positiver Effekt.

Verschiedene Hersteller von HPLC-Systemen haben seit kurzem viel versprechende, ungesplittete Pumpsysteme für die Anwendung in der nano-HPLC mit konstanten Flussraten im Bereich weniger nL im Angebot. Abgesehen von diesen neusten

Entwicklungen im Bereich der mikro- und nano-HPLC Pumpstechniken, birgt die Instrumentierung mit analytischen Pumpenmaßstäben den schwierigsten Punkt in der Umsetzung einer Miniaturisierung. Analytische HPLC-Pumpen sind in der Lage, Flüsse von etwa 100 bis 5000 $\mu\text{L}/\text{min}$ pulsationsarm und mit konstanter Abmischung der Eluenten im Gradienten zu fördern. Für mikro-HPLC-Anwendungen werden jedoch geringere Flüsse benötigt, was durch Splitsysteme verwirklicht werden muss. Wie sehr sich die einzelnen vom Volumen abgeleiteten Parameter bei einer vorgesehenen Miniaturisierung ändern, lässt sich anhand des so genannten Downscaling-Faktors f erklären. Dieser ist allerdings nur bei der Verwendung derselben Phase und Säulenlänge wie im analytischen Vergleichssystem anwendbar [76-78]. Formel 1 zeigt den Zusammenhang zwischen einem analytischen und einem Mikrosystem. Um den berechneten Faktor sind im Mikrosystem die Fließgeschwindigkeit, das Injektionsvolumen sowie das Zellvolumen von benutzten Durchflusszellen zu verringern. Auch die Verbindungskapillaren müssen im Mikrosystem geringere Dimensionen aufweisen, um einer Bandenverbreiterung entgegen zu wirken [79-81].

Formel 1: Definition des Downscaling-Faktors f

$$f = \frac{d_{\text{micro}}^2}{d_{\text{conv}}^2}$$

d_{micro} als Innendurchmesser der Mikrosäule
 d_{conv} als Innendurchmesser der konventionellen Säule

Die Realisierung von Miniaturisierungen mittels des Downscaling-Faktors ist in Tabelle 5 anhand verschiedener Säulen-Innendurchmesser-Dimensionen dargestellt. Es wurde hierfür von einer analytischen Säule mit 4.6 mm Innendurchmesser ausgegangen, die mit einem Fluss von 1 mL/min betrieben wurde.

Bereits ab einem Innendurchmesser von 1 mm können konventionelle analytische Pumpen (von den Neuentwicklungen abgesehen) nicht mehr splitfrei betrieben werden, da eine kontinuierliche Eluentenabmischung nicht gewährleistet werden kann. Die benötigten Flussraten werden durch Flussteilung an der Pumpe noch vor der Probenaufgabe erreicht. Der Hauptteil des Eluenten wird dabei über ein T-Stück dem Abfall zugeführt und der geringere Anteil möglichst pulsationsarm über die Säule gefördert [82]. Ein solches Splitsystem ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Der erzeugte Gegendruck eines solchen Systems ist bei dieser Teilungstechnik hauptsächlich von der zur Teilung verwendeten Kapillare abhängig.

Die Einstellung des Säulenflusses erfolgt durch die Verwendung einer Splitkapillarlänge, die einen für die verwendete Pumpe akzeptablen Gegendruck bei realistischen Hauptflussraten liefert. Durch Messung des Säulenflusses und Regulierung des Hauptflusses wird die benötigte Flussrate über die Säule eingestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die mit dem Downscalingfaktor berechneten Ergebnisse einer Miniaturisierung

Säulen i.D.	f	Flussrate	Injektions- volumen	Detektions- volumen
4.6 mm	1	1 mL/min	5 µL	10 µL
4.0 mm	1 / 1.3	756 µL/min	4 µL	8 µL
2.0 mm	1 / 5	189 µL/min	95 µL	1.9 µL
1.0 mm	1 / 21	47 µL/min	240 nL	75 nL
200 µm	1 / 529	1.8 µL/min	9.5 nL	19 nL
100 µm	1 / 2116	470 nL/min	2.4 nL	4.7 nL
50 µm	1 / 8464	120 nL/min	0.6 nL	1.2 nL

Diese Art der Flussteilung ist aufgrund von Permeabilitätsänderungen der Säule und variierenden Eluentenviskositäten durch die Benutzung von Gradienten teilweise starken Schwankungen unterworfen. Durch die Benutzung einer zusätzlichen Restriktionskapillare (Kalibrator) zwischen dem T-Stück und der Probenaufgabe werden diese Schwankungen relativiert. Die beschriebene Anordnung ist in Abbildung 12 (a) gezeigt.

Durch die Entwicklung automatisch gesteuerter Flussmess- und Regulierungssysteme in den letzten Jahren wurden Mikro-HPLC-Analysen nicht nur vereinfacht, auch die Reproduzierbarkeit der Methoden wurde verbessert. Durch die Einführung variabler Restriktoren erfolgt die Steuerung der Menge des dem Abfall zugeführten Anteil des Eluenten. Durch leicht verändertes Öffnen oder Schließen des Restriktionsventils wird bei Bedarf der variierende Gegendruck ausgeglichen und somit die benötigte Flusskonstanz gewährleistet. Ein solches Prinzip ist in Abbildung 12 (b) skizziert.

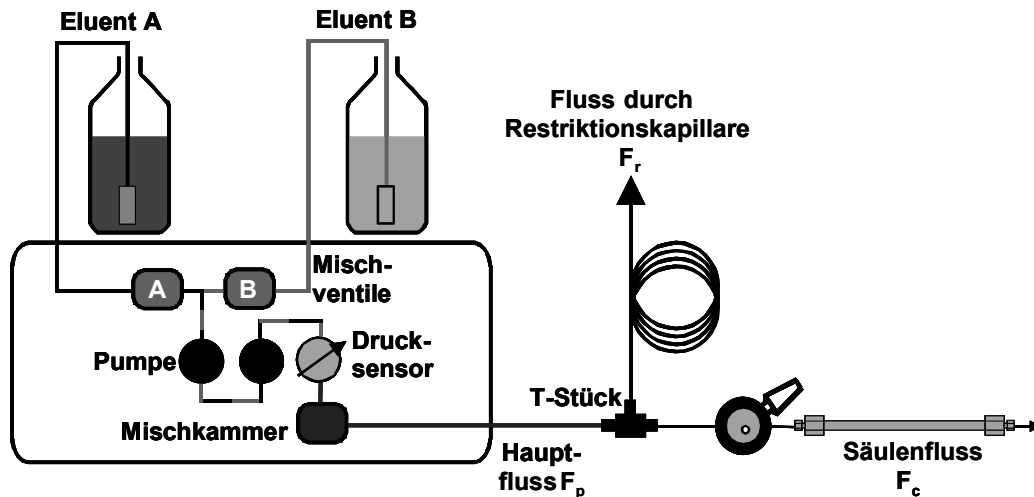


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Mikro-HPLC-Systems mit einfacher Flussteilung

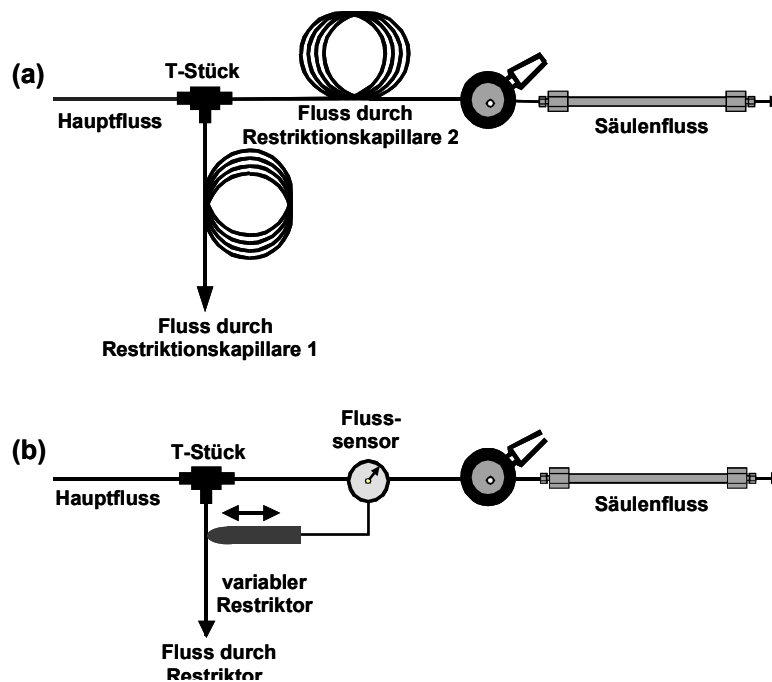


Abbildung 12: Flusssplitsysteme mit (a) Stabilisierung durch Restriktionskapillare und (b) automatisierter Flussregulierung

Die Injektion von 240 nL und weniger (vgl. Tabelle 5) muss durch geeignete Probenaufgabe-Systeme gewährleistet werden, da es sonst wegen zu hoher Volumina potentiell zu einer Überladung der Säule kommen könnte. Da jedoch auch in analytischen Systemen das maximal mögliche Injektionsvolumen in den wenigsten Methoden benutzt wird, ist dieser Parameter innerhalb der Miniaturisierung nicht

nötigerweise ein Absolutwert. Es muss allerdings beachtet werden, dass sich das Trennergebnis bezüglich der Retentionszeit der Analyten leicht ändert bei Vergrößerung des Loopvolumens.

Zur Detektion mittels UV-Absorption stehen verschiedene Durchflusszellen zur Verfügung, wobei sich die Z-Zellen zu einer Art Standardzelle entwickelt haben. Verschiedene Zellformen sind in Abbildung 13 dargestellt, wobei die geringste Empfindlichkeit aufgrund des geringen Lichtwegs den einfachen Kapillarfenstern (a) zugeschrieben werden muss. Z-förmige UV-Zellen (c) sind wiederum den so genannten Blasen- oder Bubble-Zellen^[83] (b) vorzuziehen, da sie einen maximalen Lichtweg gewährleisten^[84]. Die Herstellung ist jedoch weitaus aufwändiger, da sehr empfindliche, amorphe Quarzkapillaren in Z-Form gebogen werden müssen. Leider ist diese Zellform auch anfällig für Ablagerungen, die beispielsweise durch Abrieb an den Zellverbindungskapillaren bei Kopplung an andere Systemteile entstehen. In der Zelle kommt es daraufhin zu einer Druckerhöhung bis die Durchlässigkeit der Zelle nicht mehr gegeben ist. Es sind UV-Zellen mit Volumina von 1 μL (analytische und präparative Anwendungen), über 45 nL (analytisch, hoher Mikro-Bereich) bis zu 3 nL (mikro- und nano-HPLC-Anwendungen) kommerziell erhältlich. In dieser Arbeit wurden für analytische Anwendungen UV-Zellen mit 1 μL und bei mikro-HPLC-Trennungen solche mit 3 nL Volumen verwendet.

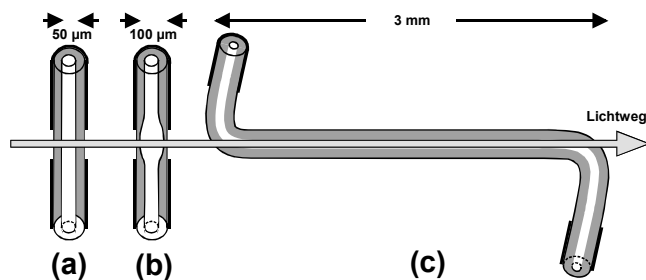


Abbildung 13: Zellformen für UV/VIS-Detektionen;

(a) einfaches Kapillarfenster, (b) Bubblezelle, (c) Z-Zelle

2.2.5 Methodenkombination

Mehrdimensionale Trennungen sind bei der Untersuchung von Proteomen aufgrund der komplexen und vielseitigen Zusammensetzung kaum zu umgehen, wie bereits einleitend in Kapitel 2 erwähnt wurde. Hierfür haben sich gerade flüssigchromatographische Methoden bewährt, wegen einfacher Kopplung an die

Masenspektrometrie ^[85]. Wie in den Strategien der Proteomanalyse (vgl. Abbildung 6) vorgesehen ist, wird durch die Kopplung von unterschiedlichen bzw. orthogonalen Trennmechanismen eine merkliche Erhöhung der Trenneffizienz erreicht, wodurch die Vereinzelung der Proteine oder Peptide verbessert und somit eine eindeutigere Detektion und Charakterisierung gewährleistet wird. In Kapitel 2.1 wurde bereits die elektrophoretische Methodenkopplung am Beispiel der zweidimensionalen Gelelektrophorese, der Kopplung von IEF- und SDS-PAGE-Methoden, beschrieben. Dieses Konzept lässt sich auf die Chromatographie übertragen, da auch hier orthogonale Methoden etabliert sind oder ihre Entwicklung möglich ist ^[86,87]. Die Orthogonalität von Methoden lässt sich in chromatographischen Maps darstellen, wie es in Abbildung 14 skizziert ist. Die Peakanzahl n_1 der ersten Trenndimension und die Anzahl n_2 der zweiten Dimension bedingen durch Multiplikation die Anzahl der vereinzelt Peaks also die Peakkapazität der Gesamtmethode, wie aus Formel 2 hervorgeht ^[88].

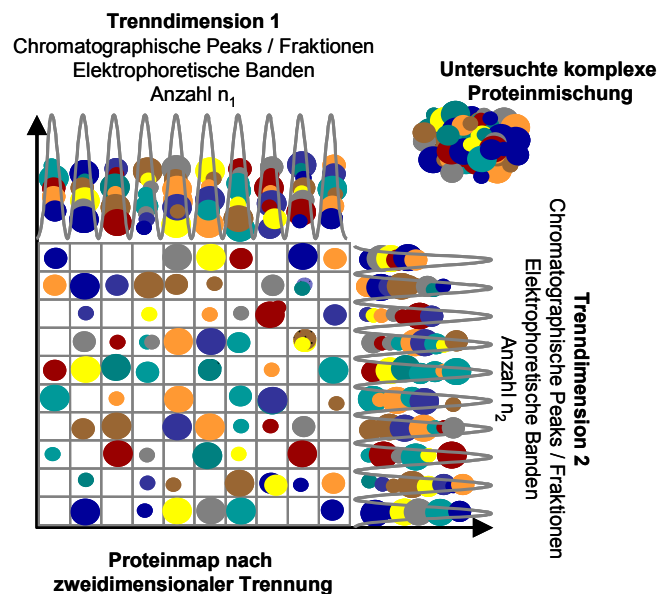


Abbildung 14: Darstellung einer theoretischen Trennung mit orthogonalen Trennmechanismen und Darstellung des Proteinmaps

Formel 2: Berechnung der theoretischen Peakkapazität bei mehrdimensionaler Analyse

$$P = n_1 * n_2$$

mit P als Peakkapazität,

n_1 und n_2 als Peakanzahl der definierten Trenndimensionen 1 bzw. 2

Die Formel ist um weitere Dimensionen erweiterbar, so dass auch für multidimensionale Trennungen Peakkapazitäten berechnet und als Methodenparameter angegeben werden können.

Die Kopplung von chromatographischen Trennmethode kann grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen: online und offline.

- Die online-Kopplung benötigt aufwändige Schaltungen und Anschlüsse, da in diesem Fall die Analyte von der Trennsäule der ersten Trenndimension portionsweise direkt auf die Säule der nächsten Trennmethode übergeleitet werden. Hierbei ist zu beachten, dass auch geringe Mengen der Eluenten der ersten in die nächste Dimension mit übergehen ^[89-91]. Dies kann je nach Methode zur Schädigung der stationären Phase oder zur Beeinflussung der Trennung führen, so dass auch die theoretisch erreichbare Peakkapazität nicht erzielt wird.
- Bei der offline-Kopplung werden Peaks oder Retentionszeitabschnitte aus der ersten Trennmethode durch Auffangen des Eluats isoliert. Dieser Vorgang kann durch Fraktionensammler automatisiert werden. Anschließend können die Fraktionen, wenn erforderlich, aufkonzentriert oder anderweitig behandelt werden, bis die Injektion in die zweite Trenndimension erfolgt ^[92].

Beide Kopplungsmethoden besitzen Vor- und Nachteile. Bei der online-Kopplung treten kaum Analytverluste auf, da das gesamte Eluat portionsweise direkt weiteranalysiert wird. Allerdings ist eine zwischenzeitliche Behandlung der Portionen nicht möglich. Bei offline-gekoppelten Methoden kann es zu Verunreinigungen und Verlusten bei der Isolation der Fraktionen kommen. Allerdings ist die Kombination beider Trenndimensionen einfacher, da vor der Reinjektion auf die zweite Trennsäule eine Entfernung der Eluenten der ersten Trennmethode ermöglicht wird.

Eine spezielle Form der online-Kopplung stellt die oncolumn-Trennung dar. Hierbei werden die unterschiedlichen stationären Phasen ohne Vermischung in einer Kapillare hintereinander als Segmente fixiert ^[93]. Die Trennung erfolgt nun schrittweise zunächst an der ersten Phase mit geeigneten Eluenten. Portionsweise werden die Analyten auf den zweiten Säulenabschnitt, in dem die zweite stationäre Phase lokalisiert ist, eluiert. Die Eluenten der ersten Trennmethode werden aus dem System gespült und die auf der zweiten stationären Phase adsorbierten Analyte werden mit für diesen Trennmechanismus geeigneten Eluenten getrennt und detektiert ^[94]. Die Benutzung dieser Methodik setzt voraus, dass die Eluenten der

ersten Dimension keinen trennenden Einfluss auf die Analyten in der zweiten Trenndimension besitzen und umgekehrt. Vor allem bei Verwendung von IEX als einem Mechanismus ist diese Methodik sehr anfällig für Auskristallisation der Analyte, wodurch es häufig zu Verblockungen in der Trennsäule kommt.

Innerhalb dieser Arbeit wurde für die Kopplung orthogonaler Trennmethode die offline-Kopplung gewählt, um die Aufkonzentration der Analyte sowie den Verdau in den Fraktionen zu ermöglichen.

2.2.6 Säulenkopplung

Neben den in Kapitel 2.2.5 bereits beschriebenen on- und off-line Kopplungstechniken zur Kombination verschiedener Trennmethode finden verschiedene Säulen-gekoppelte Systeme zur Aufreinigung oder Anreicherung in der modernen Analytik Anwendung. Solch ein System beschreibt auch die online Kopplung einer kürzeren Säule mit der gleichen stationären Phase zur Aufreinigung (speziell Entsalzung) und Aufkonzentrierung durch die Aufgabe großer Injektionsvolumina, die in einem eindimensionalen Trennsystem zu einer Volumensüberladung der Trennsäule führen würden.

Dieses so genannte *Trappen* der Proben vor der eigentlichen Trennung bedarf einer zweiten HPLC-Pumpe und einem 6- oder mehr-Wege Ventil. Die Anwendung erfolgt bevorzugt bei Verwendung eines mikro-HPLC-Systems. Die Probe wird mit einem die Analyten stark retardierenden Lösungsmittel im ersten Schritt bei vergleichsweise hohen Flussraten von 10 bis 20 μL auf die Trapsäule aufgebracht. Bei dieser Beladung kommt es dann zu Entsalzungseffekten oder zur Entfernung kleiner nicht retardierender Moleküle, die ohne diesen Schritt die Trennung oder die nachfolgende Detektion beeinflussen könnten. Nach Umschalten des Ventils können im zweiten Schritt die auf der Trapsäule befindlichen Analyten im Gegenstrom (*Backflush*) mit dem Trenneluenten auf die Trennsäule eluiert und dort getrennt werden. Die zwei beschriebenen Schritte sind in Abbildung 15 schematisch dargestellt ^[51].

Diese Trapmethodik wurde bei den meisten mikro-HPLC-Analysen in dieser Arbeit benutzt, da vor allem in Anschluss an eine IEC- oder CF-Methode durch Verwendung der Trapsäule auf eine Aufreinigung der Fraktionen beispielsweise durch Ultrazentrifugation verzichtet werden konnte.

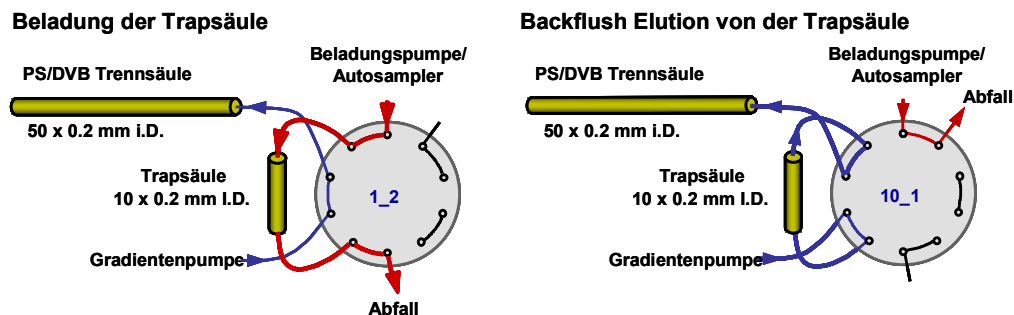


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Trapvorganges; Ventilschaltung bei Beladung und Elution

2.3 Gezielte Trennung von Proteinen

Die Chromatographie mit ihrer Vielfalt bot für diese Arbeit die optimale Plattform, die verschiedenen Charakteristika von Proteinen getrennt von einander darzustellen. Durch die Entwicklung verschiedener Trennmethode sollten die Eigenschaften der Proteine herausgearbeitet und einer massenspektrometrischen Detektion zugänglich gemacht werden. Die Ionenpaar-Umkehrphasen HPLC, die sich im Bereich der Analytik von Biomolekülen bereits bewährt hatte, sollte den ersten Schritt innerhalb der Entwicklung darstellen. Für die mehrdimensionale Trennung von Proteinen sollte sie die letzte Trennstufe vor der MS-Detektion darstellen, da sie aufgrund der verwendeten, leicht verdampfenden Eluentenzusammensetzungen eine sehr gute Möglichkeit für die Kopplung an ein Elektrospray-Ionisations Massenspektrometer besitzt und durch den anwendbaren Trap-Mechanismus auf verlustreiche Aufreinigungsschritte verzichtet werden konnte und sollte. Neben dem direkten Ionenaustausch, bei dem die unterschiedliche Ladung an Proteinen zur Trennung ausgenutzt wird, sollte eine pH-dynamische Trennmethode entwickelt und etabliert werden, die in Anlehnung an die elektrophoretische Methode der Isoelektrischen Fokussierung Aussagen über den pI-Wert liefern sollte. Die off-line-Kopplung dieser so genannten Chromatofokussierungs-Methode mit der IP-RP-HPLC und anschließender MS-Detektion sollte eine umfassende Möglichkeit bieten, die vereinzelt Proteine sowohl auf der Ebene der intakten Proteine zu charakterisieren als auch nach erfolgtem tryptischem Verdau Identifizierungen durchzuführen.

3 Detektionsmethoden

Zur Abbildung von getrennten Substanzen sind je nach Ziel spezifische oder allgemein wirksame Detektionsmethoden nötig. Dabei kann zwischen Methoden unterschieden werden, die zerstörungsfrei den Analyten wieder freisetzen, und solchen, die eine Zerlegung der Moleküle in kleinere Bestandteile oder Derivatisierungen erfordern. In den folgenden Kapiteln werden die photometrische als zerstörungsfreie und die massenspektrometrische Detektion als Vertreter der zerstörenden Form genauer betrachtet, da diese Methoden innerhalb dieser Arbeit auch verwendet wurden.

3.1 Photometrie

Unter Photometrie wird im Allgemeinen die Untersuchung und Darstellung von Substanzen anhand der Absorption von Lichtwellen definierter Wellenlänge und Intensität verstanden. Viele organische Substanzen besitzen auf Grund ihrer Struktur die Fähigkeit ultraviolettes (UV) oder sichtbares (VIS) Licht zu absorbieren, wie es durch das Lambert-Beer'sche Gesetz definiert ist. Eine Substanz besitzt einen spezifischen Absorptionskoeffizienten bei definierter Wellenlänge. In Proteinen und Peptiden können die Carbonylgruppen der Peptidbindungen durch Wellenlängen zwischen 205 und 220 angeregt und anhand des so absorbierten Lichtes detektiert werden.

Zur UV-Detektion für HPLC-Trennungen werden, wie in Kapitel 2.2.4 bereits behandelt, Durchflusszellen mit wenigen Nano- bis Mikrolitern Volumen bei maximalem Lichtweg zur Erhöhung der Empfindlichkeit verwendet. Die Verwendung in der Bioanalytik ist allerdings begrenzt, da keine Unterscheidung zwischen Analyten getroffen werden kann. Koelutionen sind somit nicht detektierbar. Allerdings ist die UV-Detektion die gängige Methode zur Darstellung von Trennungen, anhand derer offline-Fraktionierungen für mehrdimensionale Trennungen durchgeführt werden, um entweder die zu fraktionierenden Peaks zu erkennen oder bei zeitlichen Fraktionen einen Anhaltspunkt über die Analytmenge in den Fraktionen zu bekommen. Auch innerhalb der Methodenentwicklung und -prüfung hat sich die UV-Detektion bewährt. Anhand kleinerer, definierter Mischungen lassen sich diskrete Peaks darstellen und somit die Eignung der Trennmethode einschätzen.

Die Photometrie an sich eignet sich besonders gut zur Quantifizierung anhand externer Kalibriergeraden oder mittels Standardadditionsverfahren, da die gemessene Absorption direkt proportional zur Analytkonzentration ist. Dies wird beispielsweise zur Ermittlung des Gesamtproteingehaltes nach der Methode nach Bradford ausgenutzt, indem der Farbstoff Brilliantblau G im stark sauren Medium mit Proteinen stöchiometrisch umgesetzt wird, woraufhin sich die Absorptionswellenlänge des Farbstoffs im sichtbaren Wellenlängenbereich ändert. Die Auswertung erfolgt standardisiert anhand einer externen Kalibrierreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) durch lineare Regression^[95].

Innerhalb dieser Arbeit wurde die photometrische Detektion innerhalb der Methodenentwicklung, der Fraktionensammlung und zur Bestimmung von Gesamtproteingehalten angewendet.

3.2 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie (MS) handelt es sich um eine sehr empfindliche Detektionsmethode, die durch hohe Messgeschwindigkeiten sehr gute Darstellungen von chromatographischen Peaks liefern kann^[96]. Analytmengen bis in den Zeptomol-Bereich lassen sich im Falle von kleinen organischen Molekülen nachweisen und charakterisieren^[97]. Wie bereits aus Abbildung 6 hervorgeht, ist die Verwendung von Massenspektrometern als Detektoren auch in der Proteomanalytik gängig, vor allem seit der Entwicklung der Matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) und der Elektrospray Ionisation (ESI), die beide sehr schonende Ionisierungsmethoden darstellen, wie es für große Biomoleküle nötig ist. Andere Ionisationstechniken wie die Elektronenstoß-Ionisation (EI), bei der Ladung in Form von Elektronen durch Stöße mit Gasmolekülen in einer Ionisierungskammer auf den Analyten übertragen wird, führen vermehrt zu Gasphase-Fragmentierungen, so dass nur anteilig die Darstellung des intakten Moleküls erfolgen kann.

Im Allgemeinen besteht ein Massenspektrometer aus den in Abbildung 16 gezeigten Abschnitten. Die Ionisierung stellt den Übergang zwischen Probenreservoir (bei Analytdirektinfusion) bzw. Säulenausgang (HPLC- oder CE-Trennung) und dem Massenspektrometer dar. Es stehen ebenfalls verschiedene Massenanalysatoren für die Bioanalytik zur Verfügung. Am häufigste Anwendung finden zurzeit noch Ionenfallen Massenanalysatoren. Sie bieten die Möglichkeit der selektiven

Massenanalyse bei guter Massenstabilität. Gerade für die Peptidanalytik werden Ionenfallen-Analysatoren äußerst erfolgreich eingesetzt, da über zielgerichtete kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) oder als eine neuere Methode über Elektronentransfer (ETD) Fragmentationen aus den Analytmolekülen gebildet werden können. Allerdings sind sie in ihrer Auflösung gehemmt, so dass Isotopenanalyse nur bis zu einem fünffachen Ladungszustand erfolgen kann. Dieser Aspekt kann durch die Verwendung von Flugzeit (TOF)-Massenanalysatoren kompensiert werden. Mittels Flugzeit-Analyse werden eindeutige Isotopenauflösungen auch bei bis zu 50fach geladenen Ionen mit noch größerer Messgeschwindigkeit erreicht. Die jüngste Entwicklung ist die so genannte Orbitrap, die die positiven Eigenschaften der zuvor beschriebenen Massenanalysatoren vereint. Hohe Isotopenauflösung und Geschwindigkeit bei gleichzeitiger Fragmentierung sind erreichbar.

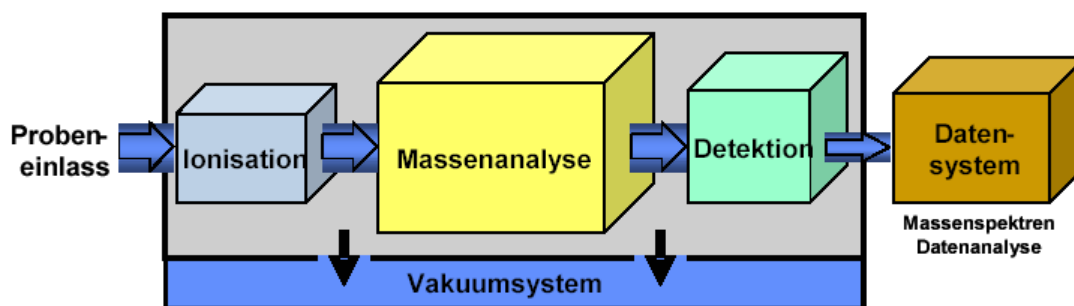


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Innerhalb dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt und angewendet, die auf Elektrospray Ionisation und Flugzeit- sowie Ionenfallen-Massenspektrometrie beruhen. Auf diese Techniken wird in den nächsten Kapiteln genauer eingegangen.

3.2.1 Elektrospray Ionisation

Die Ionisationsmethode hat einen essentiellen Anteil an der Detektierbarkeit von Substanzen, da nur geladene Teilchen mittels MS analysiert werden können. Außerdem ist die Landungsmenge relevant aufgrund der Darstellung der Ionen als Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z). So können durch mehrfache Ionisierung auch sehr große Moleküle (> 100 kDa) in kleinen m/z -Bereichen dargestellt und charakterisiert werden.

Bei der Elektrospray Ionisation erfolgt eine kontinuierliche Verneblung der gelösten Analyte in einem elektrostatischen Feld, das zwischen der Kapillarspitze und der Gegenelektrode, die sich um den Eingang des Massenspektrometers befindet, durch Anlegen einer Potentialdifferenz von bis zu 5 kV erzeugt wird. Die Ionisierung erfolgt durch diese Potentialdifferenz und wird nicht selten unterstützt und stabilisiert durch einen gleich- und/oder entgegengerichteten Gasfluss (beispielsweise Stickstoff). Die Polarität der Ionen entspricht der an der Kapillarspitze anliegenden Polarität. Nach Passieren der Gegenelektrode gelangen die Ionen in den Massenanalysator und werden dort anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses aufgetrennt ^[78].

Das Prinzip der ESI ist in Abbildung 17 skizziert ^[98]. An der Kapillarspitze wird der so genannte Taylor-Kegel gebildet, wenn die elektrostatische Anziehung der Gegenelektrode und die gegenseitige Abstoßung der gleichgeladenen Substanzen die Oberflächenspannung der Flüssigkeit überwinden ^[99].

Es bildet sich ein dünnes Flüssigkeitsfilament, das in geladene Tröpfchen zerfällt. Die enthaltenen Lösemittelmoleküle verdampfen bei der Wanderung zur Gegenelektrode, woraufhin die Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche erhöht wird. Die Abstoßung der Ionen in den Tröpfchen nimmt zu, bis die so genannte Rayleigh-Grenze überschritten ist, und die Tropfen zerfallen anschließend in kleinere Tropfen (Coulomb-Explosion) ^[100]. Diese Verdampfung und der Zerfall wiederholen sich gemäß dem *Charged-residue*-Modell so lang, bis nur noch sehr kleine Tröpfchen mit einem Durchmesser von etwa 1 nm bzw. einzelne Ionen in das Massenspektrometer gelangen ^[101].

Anhand des Schemas des schonenden Sprayprozesses ist zu erkennen, dass die ESI im Vergleich zu anderen Ionisierungen wie der Elektronenstoß-Ionisation keinen Einfluss auf die Analytstruktur in Form von Gasphasen-Fragmentierungen hat. Es wird zwar eine Ladung definierter Polarität durch Hinzufügen oder Entfernen von Protonen übertragen, allerdings werden keine Molekülbindungen gespalten, woraus Fragmente entstehen würden. Die ESI erzeugt außerdem mehrfach geladene Ionen desselben Analyten ^[102]. Es ist somit möglich, auch sehr große Moleküle wie Proteine in einem engen und niedrigen Messbereich von 500 bis 3000 m/z darzustellen.

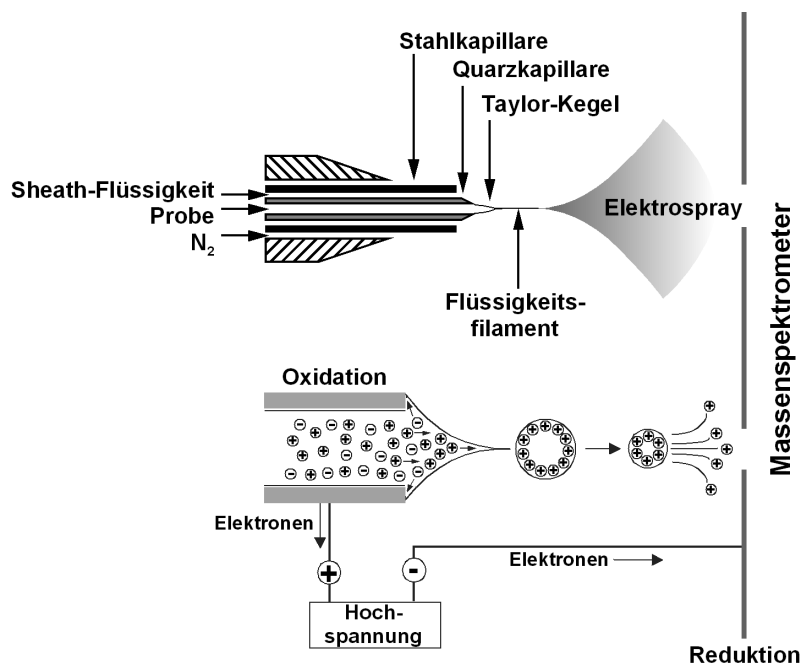


Abbildung 17: Prinzip der Elektrospray Ionisation

Andere Ionisationsmethoden wie MALDI übertragen normalerweise nur eine Ladung, so dass für große Moleküle ein sehr hoher Massenbereich zur Detektion benötigt würde ^[103]. Dies hat zur Folge, dass bei MALDI für die Analyse verschieden großer Moleküle ein sehr breiter Messbereich eingestellt werden muss und darunter sowohl die Messgeschwindigkeit als auch die Massengenauigkeit leidet, da die Kalibrierung des Massenanalysators umso genauer ist, je enger der Kalibrierbereich gehalten werden kann.

3.2.2 Massenanalyse

Nach der Ionisation liegen die Analytmoleküle als Ionen in der Gasphase vor und werden durch eine Öffnung in der Gegenelektrode über die Ionenoptik in den Massenanalysator geleitet. In der Ionenoptik erfolgen die Bündelung der Ionen und die Abscheidung letzter Neutralteilchen, die in der Ionenquelle ggf. noch nicht entfernt worden sind, sowie der Transport über verschiedene Potentialdifferenzen zum Massenanalysator.

Durch kleiner werdende Potentialdifferenzen innerhalb der Ionenoptik, beginnend bei der Ionisationsspannung bis zum Eintritt in den Massenanalysator, und stufenweise verstärktes Vakuum wird ein kontinuierlicher Ionenfluss durch das

Massenspektrometer gewährleistet. Die Potentialdifferenzen werden an einer Anordnung von Linsen und Multipolen angelegt, was zur Erhöhung oder Verringerung der Geschwindigkeit sowie Vereinheitlichung der kinetischen Energie gleichartiger Ionen führt. Die apparativen Anordnungen innerhalb der Ionenoptik sind zwar nicht einheitlich, die Wirkung ist jedoch bei allen Massenspektrometern vergleichbar.

Für die eigentliche Massenanalyse gibt es wie bei den Ionisationstechniken mehrere Möglichkeiten der Durchführung. Analytische Fragestellungen sind hierbei gute chromatographische Darstellung durch hohe Messgeschwindigkeit, benötigte Auflösung, Massengenauigkeit und Empfindlichkeit sowie die Breite des zu untersuchenden Massenbereichs. In Kopplung mit der ESI sind hauptsächlich vier Varianten von Analysatoren in Verwendung, die in Tabelle 6 aufgeführt sind. Da in dieser Arbeit jedoch nur Flugzeit- und Ionenfallen-Massenspektrometer verwendet wurden, wird nur auf diese Analysatoren näher eingegangen.

Tabelle 6: Eigenschaften von Massenanalysatoren

Analysatorform	Geschwindigkeit	Auflösung	Massengenauigkeit	Empfindlichkeit	Massenbereich
Quadrupol	gering	mittel	mittel	mittel	klein
Ionenfalle	mittel	mittel	mittel	hoch	mittel, variabel
Flugzeit	hoch	hoch	hoch	hoch	groß, variabel
Orbitrap	hoch	hoch	hoch	hoch	klein

3.2.2.1 Flugzeit Massenspektrometrie

Bei der Flugzeitanalyse werden die transferierten Ionen anhand der Zeit selektiert, die sie zur Überwindung einer definierten Strecke im Hochvakuum benötigen, da diese Driftdauer ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) proportional ist. Eine schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Flugzeit-Massenspektrometers ist in Abbildung 18 gezeigt. In Flugzeit-Massenspektrometern erfolgt eine simultane Anregung, Analyse und Detektion aller Ionen. Sie wirken daher nicht als

Massenfilter, in dem selektiv Ionen definierter Masse und Ladung der Detektion zugeführt werden.

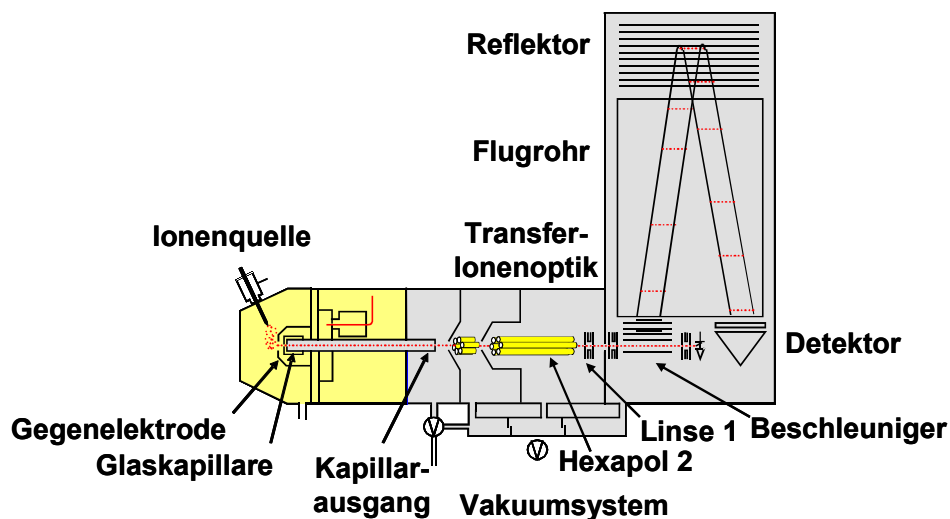


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Flugzeitmassenspektrometers mit ESI-Quelle, Ionenoptik, Flugrohr und Detektion

Nach dem Durchqueren der Ionenoptik wird die kinetische Energie der Ionen durch Anlegen eines elektrischen Feldes am Beschleuniger auf wenige keV angehoben, wodurch ihnen der Übergang aus der Ionenoptik in das Flugrohr, einem feldfreien Raum definierter Länge, ermöglicht wird. Die Ionen durchfliegen das Rohr, bis sie auf dem Detektor auftreffen. Ionen unterschiedlicher m/z -Verhältnisse aber gleicher kinetischer Energie besitzen unterschiedliche Geschwindigkeiten, so dass solche mit kleinen m/z -Verhältnissen das Flugrohr schneller durchqueren können. Bei Ionen, deren m/z -Verhältnisse gleich sind, die jedoch unterschiedlich stark angeregt worden sind, werden bei Verwendung von Reflektorfeldern (vgl. Abbildung 18) die erwarteten Verschiebungen in der Flugzeit der energetisch begünstigteren Ionen durch tieferes Eindringen in das Reflektorfeld ausgeglichen. Ionen mit höherer Energie und somit erhöhter Geschwindigkeit dringen tiefer in das Reflektorfeld ein, legen also eine weitere Strecke im Flugrohr zurück. Die Detektion der Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis kann dadurch energieunabhängig zum selben Zeitpunkt ohne Flugzeitvarianz erfolgen.

Im Fall des verwendeten TOF-Massenspektrometers benötigt ein Ion mit dem m/z -Verhältnis 3000 etwa $100 \mu\text{s}$ zur Durchquerung des Flugrohrs. Diese Zeit beinhaltet jedoch auch die Speicherzeit vor dem Beschleuniger im Hexapol 2 durch

Potentialänderungen an der Linse 1, die so genannte *pre-puls storage time*, über deren Größe sich teilweise die Massenselektivität und damit der zu analysierende Massenbereich steuern lassen. Abbildung 19 gibt Aufschluss über die zeitliche Abfolge und das Zusammenspiel von Ionenspeicherung, -Beschleunigung und Datenaufnahme. Eine sehr kleine Speicherzeit begünstigt diejenigen Ionen, die mit hoher Geschwindigkeit die Ionenoptik durchqueren und bei einer langen Speicherzeit vor der Anregung bereits weiter am Flugrohr vorbei wieder aus dem Speicherbereich heraus bewegt würden. Allerdings verringert eine kurze Speicherzeit auch die Wahrscheinlichkeit, dass langsamere Ionen, also solche mit hohem m/z -Verhältnis, in den Speicherbereich gelangen, bevor die Anregung und damit der Transfer ins Flugrohr erfolgt. Zur Untersuchung intakter Proteine, die vermehrt Ionen in einem m/z -Bereich zwischen 500 und 3000 generieren, wird somit eine Messzyklendauer von etwa 100 μs zur Darstellung der 3000 m/z als Maximalwert und eine nicht zu kleine Speicherzeit von 15 bis 30 μs benötigt zur Bevorzugung großer m/z -wertiger Ionen.

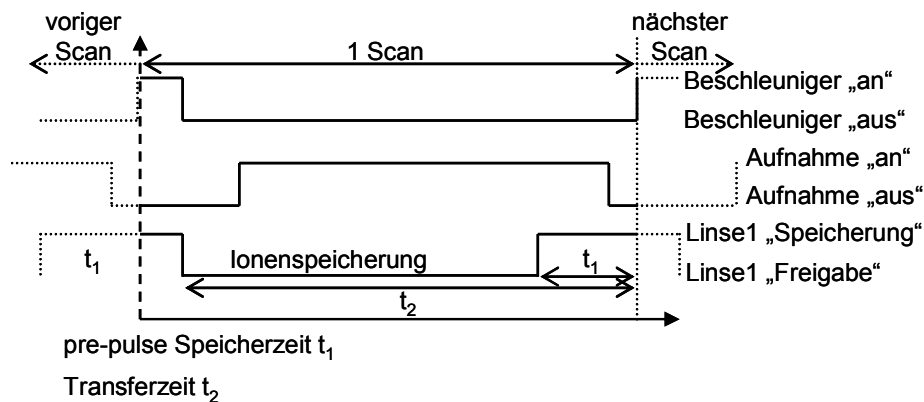


Abbildung 19: Zeitdiagramm der Vorgänge zur Messung eines Scans

Der Speicher- und Anregungsvorgang wird, je nach Messzyklendauer, zwischen 10,000 und 50,000 mal pro Sekunde wiederholt. Daraus resultiert eine große Anzahl von Einzelspektren, die zur besseren Abbildung in definierter Menge (10,000 bis 100,000 Spektren) aufsummiert werden können, ohne große Einbußen in der Messgeschwindigkeit hinnehmen zu müssen. Bei einer vorgeschalteten chromatographischen Trennung wird zumeist eine Summierung von 10,000 gewählt, die noch eine sehr gute punktuelle Abdeckung der einzelnen Peaks gewährleistet

[104]. Die Abbildung der Ionen erfolgt anhand der m/z -Verhältnisse, die nach Formel 3 quadratisch mit der gemessenen Flugzeit korreliert werden können.

Formel 3: Zusammenhang zwischen Flugzeitmessung und m/z -Verhältnis

$$\frac{m}{z} = \frac{2 * U}{L^2} * t^2$$

mit m als Masse des Ions in kg,
 z als Ladung in C,
 U der Beschleunigungsspannung in V,
 L der Länge der Driftstrecke in m
und t der benötigten Driftzeit in s

Innerhalb des Massenspektrometers herrschen verschiedene Vakuumstufen bzw. Restdrücke. Die Ionenquelle sowie der Bereich der beheizten Glaskapillare werden noch unter Normaldruck-Bedingungen betrieben. Anschließend wird durch eine Vakuumpumpe am Ausgang der beheizten Kapillare ein Vorvakuum von etwa 2 bis 3 mbar (~1.5 bis 2.3 torr) erzeugt. Die anschließenden drei Vakuumstufen werden durch eine interne Turbopumpe realisiert, so dass um den ersten Hexapol ein Restdruck von etwa 10^{-2} mbar (~7.5 mtorr) und um den zweiten Hexapol ein Restdruck von etwa 10^{-4} mbar (~75 μ torr) herrscht. In der letzten Stufe befindet sich das Flugrohr unter einem Restdruck von etwa 10^{-7} mbar (~75 ntorr) (vgl. Abbildung 18).

3.2.2.2 Ionenfallenmassenspektrometrie

Bei der Ionenfallen-Massenanalyse werden alle generierten Ionen durch Anlegen eines elektrischen Feldes eingefangen und auf stabilen Bahnen fixiert. Durch kontrollierte Änderung der Feldstärke werden die Ionen selektiv nach ihrer potentiellen Energie, die proportional zu ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ist, aus der Falle ausgeschleust und der Detektion zugeführt. Abbildung 20 zeigt schematisch den Aufbau eines linearen Ionenfallen-Massenspektrometers [105]. Die Bestandteile der Ionenoptik sind in Abbildung 21 vergrößert gezeigt. Die an beiden Seiten der Ionenfalle angebrachten Detektoren ermöglichen die nahezu komplette Detektion und simultane Darstellung aller ejizierter Ionen einer Spezies, was eine

deutliche Steigerung der Empfindlichkeit im Vergleich zu Geräten in älterer Bauweise mit nur einem Detektor zur Folge hat ^[105].

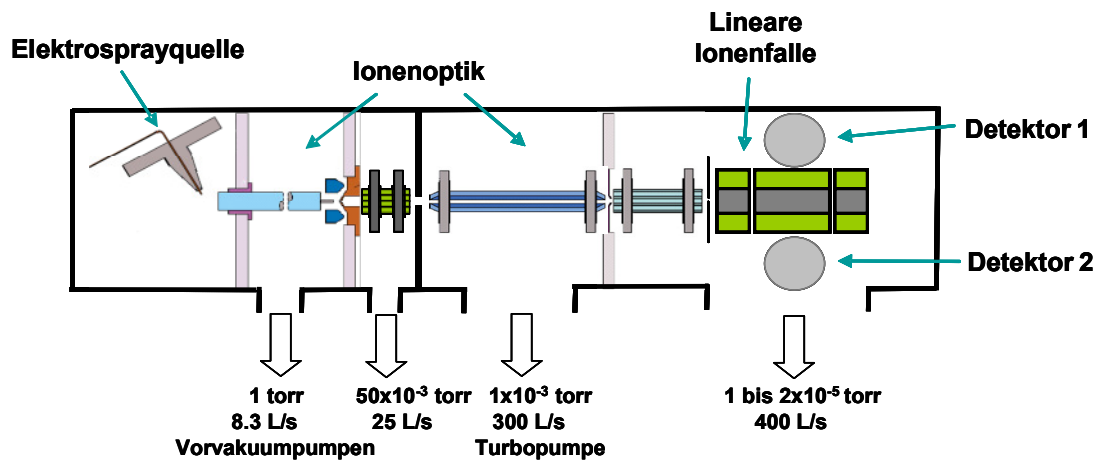


Abbildung 20: Schematischer Aufbau eines ESI-Ionenfallen Massenspektrometers

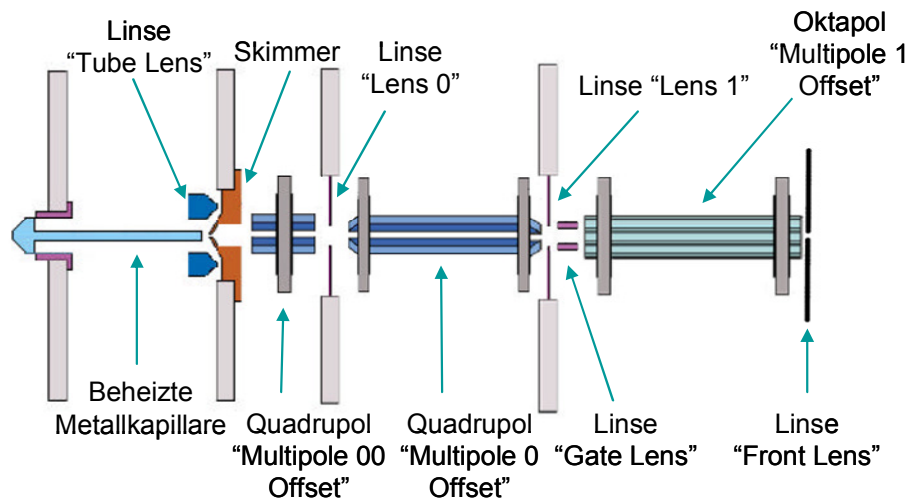


Abbildung 21: Bauteile der Ionenoptik des linearen Ionenfallen-Massenspektrometers

Die Ejektion der Ionen erfolgt im 90°-Winkel zur Längsachse der Ionenfalle. In Abbildung 22 ist der Aufbau der Ionenfalle des beschriebenen Massenspektrometers gezeigt ^[105]. Durch Erzeugung einer Potentialmulde zwischen vier hyperbolischen Polen werden die Ionen in Z-Richtung durch ein quadrupolares Feld stabilisiert und somit eingefangen. Zur Ejektion wird eine in X-Richtung wirkende, definiert steigende Resonanzfrequenz angelegt, durch die den Ionen kinetische Energie zugeführt und somit die Ionenflugbahn destabilisiert wird, wodurch sie die Ionenfalle durch die

Ejektionsöffnungen verlassen können. Eine Bewegung in y-Richtung wird durch Anlegen eines Grundpotentials verhindert.

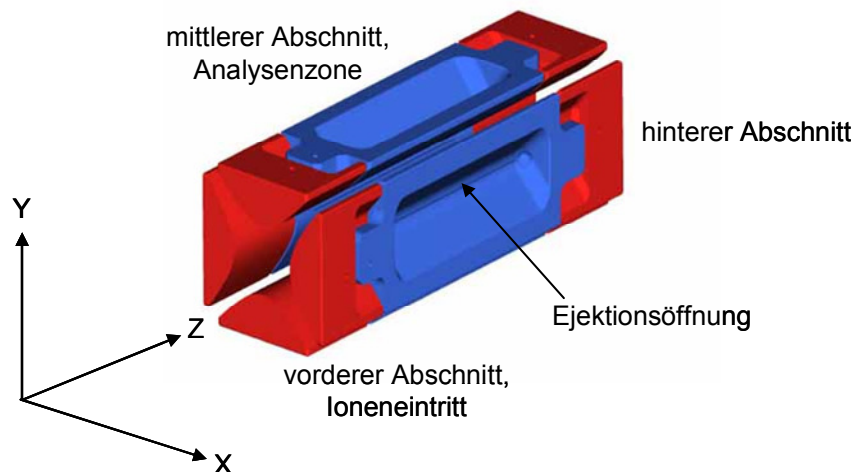


Abbildung 22: Aufbau der linearen Ionenfalle des LTQ-XL

Bei der Verwendung von 3D-Ionenfallen, die aus einer Ringelektrode und zwei so genannten Endkappen bestehen, erfolgt die Ejektion gleichgerichtet zum Analysationsweg mittels nur einer Detektionseinheit. Der Aufbau eines solchen ESI-Ionenfallen-Massenspektrometers ist in Abbildung 23 dargestellt.

Durch Anlegen von Wechselspannungen an die Ringelektrode und die Endkappen und die daraus resultierende Potentialmulde wird wiederum die Fixierung der Ionen auf stabilen Flugbahnen gewährleistet. Die Ejektion erfolgt anhand einer Resonanzfrequenz, die zwischen den Endkappen aufgebaut wird. Durch die Destabilisierung der Flugbahnen verlassen die Ionen die Ionenfalle durch Öffnungen in den Endkappen und können detektiert werden. Unabhängig vom Ionenfallenmodell können die zur Etablierung stabiler Flugbahnen nötigen Spannungen durch die Mathieuschen Bewegungsgleichungen berechnet werden ^{[[106,107]]}.

Die Heliumatome werden benutzt, um die kinetische Energie der eingefangenen Ionen durch leichte, nicht-fragmentierende Stöße zu verlangsamen. Das Einfangen der Ionen benötigt pro Messzyklus eine maximale Injektionszeit, die häufig zwischen 0.1 und 100 ms beträgt. Anschließend wird die Ionenfalle „geschlossen“, indem durch Veränderung der Potentiale in der Ionenoptik ein weiterer Transfer in die Ionenfalle verhindert wird. Dies hat eine definierte Füllung der Ionenfalle zur Folge, so dass es weder zu einer Überfüllung noch zu Ungenauigkeiten in der Detektion

durch nachfolgende Ionen kommen kann. Neben dieser maximalen Füllzeit ist ein Messzyklus dadurch limitiert, dass ein maximales Füllvolumen definiert werden kann, wodurch sich der Messzyklus zeitlich stark verringern kann, wenn das maximale Füllvolumen vor der maximalen Füllzeit erreicht wird.

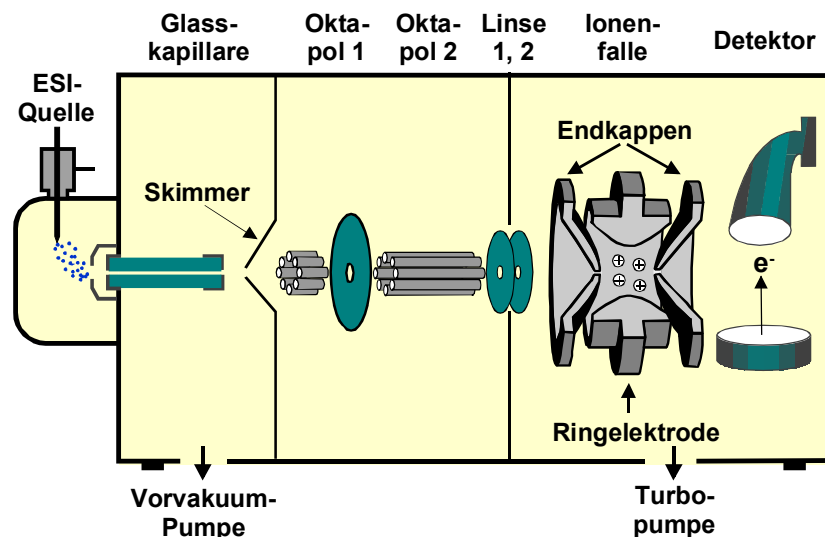


Abbildung 23: Schematische Darstellung eines ESI-3D-Ionenfallen-Massenspektrometers mit Ringelektrode und individuellem Detektor

In beiden apparativen Anordnungen wird die Ionenfalle mit Heliumgas geflutet, so dass ein konstantes Restvakuum in einer Größenordnung von 10^5 Torr erzielt wird. Zur Identifizierung von Proteinen ist die weithin gebräuchlichste Methode die Untersuchung von Verdaupeptiden des Proteins mittels Massenspektrometrie. Hierbei erfolgt im ersten Schritt die Darstellung der Peptidionen zum so genannten Peptidmassen Fingerprint (PMF). In einem weiteren Schritt werden automatisiert selektiv die im PMF gemessenen Massen nacheinander isoliert (Vorläuferion) und durch kollisionsinduzierte Dissoziation fragmentiert, anhand des m/z -Verhältnisses ejiziert und detektiert. Zur Isolation wird das entsprechende Vorläuferion in der Ionenfalle stabilisiert und die übrigen Ionen werden durch Anregung mittels Resonanzfrequenz aus der Falle entfernt ohne erneut der Detektion zugeführt zu werden. Durch Anlegen einer definierten Resonanzfrequenz wird anschließend die kinetische Energie des isolierten Vorläuferions so stark erhöht, dass es zu Stößen mit den in der Ionenfalle enthaltenen Heliumatomen kommt, wodurch das Ion eine starke Erhöhung seiner potentiellen Energie erfährt und in strukturspezifische Fragmente zerfällt.

Die Ejektion der Fragmentionen erfolgt erneut durch Steigerung der Resonanzfrequenz und Destabilisierung der stabilen Flugbahnen der Ionen. Die Messung der Fragmentionen aus Vorläuferionen wird als Peptidfragment Fingerprint (PFF) bezeichnet. Theoretisch besteht auch die Möglichkeit der Fragmentierung der Fragmentionen auf dieselbe Weise, dies ist jedoch nur selten erforderlich bei der Untersuchung von Peptiden und würde außerdem die Geschwindigkeit eines Messzyklus zu stark herabsetzen. Allerdings greift man bei der direkten Untersuchung von PTMs auf die mehrfache Fragmentierung zurück, da mit geeigneten Fragmentierungsspannungen auch die PTMs selbst einer Fragmentanalyse unterzogen werden können. Statt der mehrfachen Fragmentierung geht man jedoch meistens dazu über, pro erhaltener PMF-Messung mehrere Fragmentierungen verschiedener nachgewiesener Ionen durchzuführen, was zur Folge hat, dass auch bei Koelution von beispielsweise drei Peptiden nicht ausschließlich das intensivste Peptid einer PFF-Messung unterzogen wird. Die soeben beschriebenen Vorgänge sind in Abbildung 24 zusammengefasst.

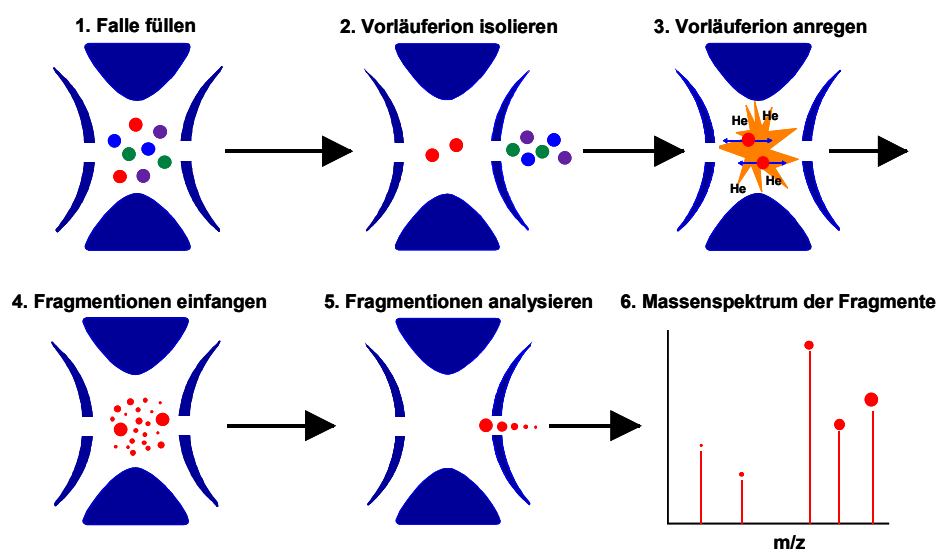


Abbildung 24: Schematischer Vorgang der Isolierung und Fragmentierung von Vorläuferionen zur Erstellung von PFFs

Innerhalb dieser Arbeit wurden intakte Proteine unter Verwendung eines linearen Ionenfallen- und eines Flugzeit-Massenspektrometers untersucht. Die Durchführung von Peptidanalysen wurde unter Verwendung der Ionenfalleninstrumentierung mit Ringelektrode und Endkappen realisiert.

3.2.3 Detektion

Die Detektion der ejzierten Ionen wird häufig mit so genannten Sekundärelektronen-Vervielfachern realisiert. Durch Auftreffen der Ionen auf eine ungeladene Oberfläche werden Elektronen aus dieser Fläche herausgelöst und über weitere Teile der Oberfläche reflektiert, wobei bei jedem Auftreffen auf die Fläche Elektronen herausgelöst werden. So kommt es zu einer exponentiellen Zunahme an detektierbaren Elektronen an der Anode, woraus die Verstärkung des Signals und eine Steigerung der Empfindlichkeit resultieren. Weitere Detektorarten sind beispielsweise Kanaleleronenvervielfacher (KEV) und Faraday-Auffänger^[106].

Ein Mikrokanalplattenvervielfacher (*micro channel plate*) wurde zur Detektion der Ionen nach Flugzeitanalyse benutzt. Diese Platte besitzt eine Vielzahl zylinderförmiger Kanäle, die mit einer halbleitenden Schicht ausgekleidet sind und Elektronen emittieren können, wodurch sie als Sekundärelektronen-Emitter und -Vervielfacher wirken^[106].

3.3 Darstellung und Charakterisierung als Ziel der Proteinanalyse

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Zielen dieser Arbeit sollte die Darstellung von Proteinen mittels ESI-MS etabliert werden. Hierzu eignen sich bereits bewährte Massenanalysatoren zur Flugzeitbestimmung und in Form einer Ionenfalle. Die Darstellung intakter Proteine nimmt in der Proteinanalytik an Häufigkeit zu, da sie eine Charakterisierung der Proteinmodifikationen erlaubt. Durch die Ermittlung der intakten Proteinmassen sollten sowohl Modifikationen erkannt und charakterisiert, als auch Zuordnungen zu theoretischen Massen identifizierter Proteine getroffen werden können. Anhand der Vergleiche von gemessenen und theoretischen Massen bekannter Proteine sollten die zwei Massenspektrometer, die in ihrer Massenanalyse wie bereits beschrieben sehr unterschiedlich sind, auf ihre Eignung bezüglich der Analytik intakter Proteine eingeschätzt werden. Die direkte Quantifizierung unmarkierter, intakter Proteine anhand externer Kalibrierreihen sollte die Anwendung dieser Analytik für die Proteomanalyse ergänzen und einen weiteren Vergleich der MS-Methoden erlauben.

4 Massenspektrometrische Analyse und Interpretation der Daten

Um eine Substanz oder eine Substanzklasse massenspektrometrisch eindeutig darstellen zu können, müssen verschiedene Instrumentenparameter auf die bestimmten Analyten hin optimiert werden. Vor allem die Einstellungen der Elektrospray Ionisation und der Ionenoptik müssen somit auf die Proteinanalytik angepasst werden. Es gibt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten der erhaltenen Daten, die sich schon anhand der Durchführung der MS-Experimente unterscheiden. So werden Messungen intakter Proteine anders ausgewertet als Tandem-MS-Experimente von Peptiden.

Innerhalb der Methodenentwicklung gibt es verschiedene Parameter, die die Anwendbarkeit der Methode einzuschätzen erlauben und die Überprüfung der Methode innerhalb von Serienmessungen oder nach Umbaumaßnahmen ermöglichen. Diese Methodeigenschaften lassen sich anhand statistischer Größen auch mathematisch beschreiben. Sollte eine Methode diesen Ansprüchen nicht mehr entsprechen, kann eine Fehlerbehebung durchgeführt werden, die im schwerwiegendsten Fall einer erneuten Optimierung der Gesamtmethode bzw. der Einzelmethoden gleichkommen kann.

4.1 Parameteroptimierung

Für die Einstellungen (Tuning) der ESI-Quellen der in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer sind die jeweilige optimale Stellung der Spraykapillare sowie die Verwendung von Stickstoff als Sprühgas und die Stärke der Kapillarspannung sowie im Bereich der Ionenoptik die Temperatur der beheizten Kapillare ausschlaggebende Optimierungsparameter, die einer manuellen Einstellung bedürfen. Das Tuning der weiteren Ionenoptik erfolgt im Gegensatz zur Optimierung der erstgenannten Parameter automatisch und semi-automatisch mit Hilfe der zugehörigen Steuerungsprogramme. Die Optimierungen werden mittels Direktinfusion von reinen Standardsubstanzen gelöst in einer Mischung aus Wasser und einer organischen Komponente mit einem konstanten Fluss durchgeführt. Sofern eine Kopplung mit der HPLC vorgesehen ist, sollten die Lösungsmittelmischung und der Fluss auf die HPLC-Methode angeglichen sein, so dass eine direkte Übertragung der reinen MS-Methode auf die HPLC-MS-Methode erfolgen kann. Durch die

Direktinfusion erfolgt die Darstellung der Analyten bzw. der verschiedenen Ionen als Auftragung der Intensität gegen das jeweilige m/z -Verhältnis. Bei der Optimierung werden die Parameter nacheinander derart verändert, dass die resultierende Intensität maximal wird. Für Peptide kann anstatt der Intensität auch die Isotopenauflösung als Variable für die Parametereinstellung gewählt werden, da sie vermehrt als ein bis vierfach geladene Ionen dargestellt werden, bei denen eine Isotopenauflösung noch sehr gut erkennbar ist. Durch Selektion eines Vorläuferions aus den dargestellten Ionenserien lässt sich auch die optimale Fragmentierung der Ionen einstellen.

4.2 Chromatogrammerzeugung mit massenspektrometrischer Detektion

HPLC-MS-Messungen können unterschiedlich dargestellt werden. Die Standardform ist das Totalionenstrom- oder auch rekonstruierte Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC, *total ion current*, bzw. RTICC *reconstructed total ion current chromatogram*), bei dem alle je Zeitpunkt gemessenen m/z -Verhältnisse mit summierter Intensität gegen die Zeit aufgetragen werden. Da auch alle Massen des Untergrundrauschens mit in die Chromatogrammgenerierung eingehen, ist diese Darstellungsform teilweise ungenau, da selbst angetrennte Peaks des Öfteren als ein breiter Peak abgebildet werden.

Eine Vereinfachung des RTICC ist das Basispeak Chromatogramm (BPC, *basepeak chromatogram*). Hier wird die Intensität des je Zeitpunkt intensivsten m/z -Verhältnisses gegen die Zeit aufgetragen. Für kleine Moleküle, die nur anhand eines Ions detektiert werden, ist dies die Darstellungsmethode der Wahl. Bei Proteinen eignet sich das BPC unterschiedlich gut. Kleine Proteine oder solche, die mit einem Hauption und weniger intensiven Nebenionen dargestellt werden, bilden in dieser Chromatogrammform diskrete Peaks, die gut erkennbar und auch integrierbar sind. Je gleichmäßiger die Verteilung der Ionenserie ist, desto geringer ist die Intensität im BPC und somit die chromatographische Nachweisbarkeit. Gerade für große Proteine, die mit sehr vielen (bis zu 20) Ladungszuständen pro Ionenserie abgebildet werden, kann dies ein Problem darstellen. In diesem Fall ist das RTICC dem BPC manchmal vorzuziehen.

Die substanzspezifischste Darstellung ist das extrahierte Ionenstrom Chromatogramm (EIC, *extracted ion current chromatogram*). Hier besteht die

Möglichkeit, mindestens ein Ion durch direkte Eingabe des m/z-Verhältnisses abzubilden. Im Gegensatz zum RTICC und dem BPC wird aber nur der eingegebene Ladungszustand im Chromatogramm abgebildet und nicht alle detektierten Substanzen. Es lässt sich pro EIC also nur eine Substanz chromatographisch darstellen. Zur Ermittlung von Peakflächen für Quantifizierungen ist diese Darstellungsform allerdings optimal, da Koelutionen und Rauschsignale nicht in die Generierung einbezogen werden. Ganz exakte m/z-Verhältnisse lassen sich jedoch nicht eingeben, es können aber sehr geringe Massenbereiche bis zu ± 0.001 Da definiert werden.

Die Darstellung der Ladungsverteilungen bzw. Ionen erfolgt entweder durch Aufrufen einzelner gemessener Spektren oder durch Summierung von zeitlichen Bereichen wie Peaks oder definierten Zeitabschnitten. Bei der Summierung von Spektren handelt es sich genau genommen um die Bildung eines Mittelwertes der Intensität für jede einzelne gemessene Masse über die Anzahl der Spektren innerhalb des gewählten zeitlichen Bereiches (Direktinfusion: 0.5 bis 1 min; Chromatogramm: Peakanfang bis Peakende).

Anhand aufsummierter Spektren lässt sich eine methodenspezifische Nachweisgrenze für die Analyten berechnen. Diese wurde für die reine MS-Methode definiert als Konzentration, bei der der Analyt in einer Direktinfusionsaufnahme von 1 min bei einem Fluss von 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ einen Signal-zu-Rauschen-Wert von 3 hervorruft. Für die HPLC-MS-Methodik ergibt sich die Nachweisgrenze entsprechend aus dem Summenspektrum des Substanzpeaks. Die Summierung von Spektren unter einem Peak hat den Vorteil der automatischen Relativierung des Rauschens, was in Bezug auf die Analyse von chromatographischen Peaks auf Basis von Massenspektren relevant ist. Abbildung 25 zeigt beispielhaft die Einzelspektren zu Beginn, in der Mitte und am Ende des Peaks sowie das Summenergebn aller den Peak bildenden Messpunkte bzw. Spektren des Proteins α -Lactalbumin, das mit seinen Ladungszuständen 8 bis 11 im positiven Ionenmodus dargestellt wurde.

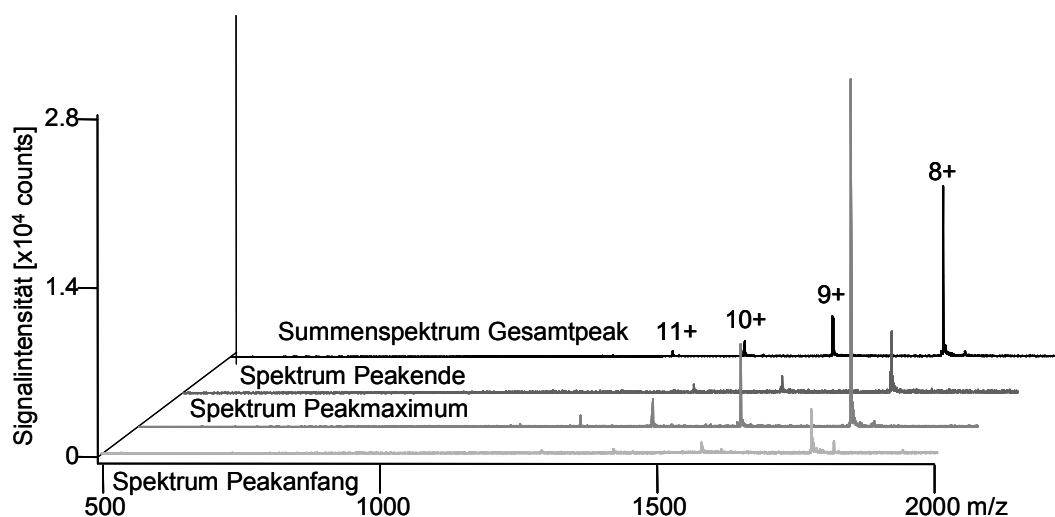


Abbildung 25: Spektrenverlauf innerhalb eines chromatographischen Peaks von 73.8 fmol α -Lactalbumin und Darstellung als Summenspektrum; Gemessen am LTQ-XL nach IP-RP-mikro-HPLC-Trennung an einem PS/DVB-Monolith

Bereits ohne Vergrößerung zeigt sich, dass im summierten Spektrum eine deutlich einheitlichere Basislinie des Spektrums (Rauschen) zu erkennen ist. Da eine Art Mittelwert aller gemessenen Massen generiert wird, nimmt zwar die Intensität der Ladungszustände um etwa 50 % ab gegenüber der Intensität am Peakmaximum, dies wird jedoch über die Vereinheitlichung und teilweise Abnahme der Rauschintensität kompensiert. Somit lassen sich in summierten Spektren die Ladungszustände der Analyte deutlicher detektieren und es resultieren höhere Signal-zu-Rauschen-Werte, was wiederum zu einer Verringerung der Nachweisgrenze für den betreffenden Analyten führt.

4.3 Charakterisierung von intakten Proteinen

Zur Charakterisierung intakter Proteine wird die so genannte Dekonvolution verwendet. Dabei wird aus den dargestellten Ionenserien auf die Massen der einfach geladenen bzw. ungeladenen Proteine zurückgeschlossen. Im Fall von Peptiden, die isotopenaufgelöst dargestellt werden, ist die Ermittlung der Ladungszahl der Ionen einfach: eine Differenz in den m/z -Werten zwischen Isotopensignalen von 1 weist auf einfache Ladung hin, $1/2$ zeigt eine zweifache Ladung an, $1/3$ entspricht einer dreifachen Ladung etc. die m/z -Differenz entspricht somit $1/z$.

Für die Analytik intakter Proteine, also hochgeladener Ionen gestaltet sich dies komplizierter, da eine isotopenaufgelöste Darstellung nicht so klar realisiert werden kann, wie es für dieses Vorgehen nötig wäre. In Formel 4 ist die mathematische Darstellung der Proteinladungszustände $(m/z)_1$ und $(m/z)_2$ gezeigt, wobei $(m/z)_2 > (m/z)_1$. Graphisch wird die Zuordnung der Ladungszustände nochmals in Abbildung 26 gezeigt anhand des Spektrums einer Direktinfusion von Lysozym (1 min Summenspektrum).

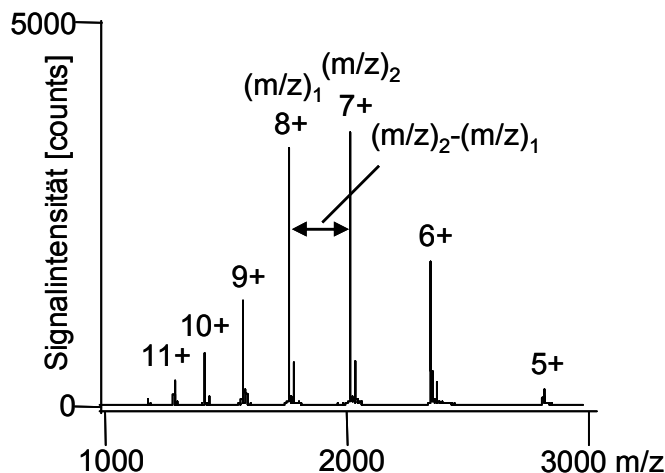


Abbildung 26: Ladungsverteilung und Ionenzuordnung zur Berechnung der dekonvolutierten Masse anhand eines TOF-Massenspektrums von Lysozym (240 fmol) in 20 % wässrigem Acetonitril mit 0.05 % TFA, Direktinfusion 2 μ L/min

Formel 4: Berechnung des m/z-Verhältnisses von Proteinionen

$$(m/z)_1 = \frac{M + n \cdot x}{n} \quad (m/z)_2 = \frac{M + (n-1) \cdot x}{n-1}$$

- mit m als Masse des Ions in Da,
z als Ladung in C,
M der durchschnittlichen Proteinmasse in Da,
n der Ladungsanzahl
und x der Masse eines Protons in Da (positiver Ionenmodus)
bzw. negativierte Masse eines Protons (negativer Ionenmodus)

Durch den Bezug der zwei benachbarten Ladungszustände aufeinander erhält man die Anzahl der Ladungen n, wie es in Formel 5 beschrieben ist ^[108].

Formel 5: Berechnung der Ladungsanzahl n aus benachbarten Ionen einer Serie

$$n = \frac{(m/z)_2 - x}{(m/z)_2 - (m/z)_1}$$

Aus der Größe n und dem zugehörigen m/z -Verhältnis lässt sich nun die ungeladene Masse des Proteins berechnen, wie es Formel 6 angibt.

Formel 6: Berechnung der Molekülmasse aus einem Ladungszustand

$$M = n * ((m/z)_1 - x)$$

Es gibt verschiedene Programme, die diese Berechnungen schnell und unter Einbeziehung aller gemessenen Ladungszustände vornehmen können. Hierbei erfolgt auch die Abbildung von Dekonvolutionsspektren in Form eines Massenspektrums als Funktion der nun durchschnittlichen Intensitäten von den durchschnittlich berechneten Massen. Es wird also ein Massenpeak mit Streuung um das Peakmaximum anstelle nur einer absoluten Masse erhalten.

Anhand von Vergleichen der gemessenen Massen mit theoretischen Proteinmassen lassen sich teilweise Identifizierungen vornehmen, die jedoch anhand einer Sequenzanalyse abzusichern sind, sofern es sich um unbekannte Proben handelt.

Einen großen Nutzen kann man aus der intakten Proteinanalyse und der Dekonvolution der Spektren bei der Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen ziehen. Es ist möglich, verschiedene Modifikationsstadien massenspektrometrisch darzustellen und durch Differenzbildung der dekonvolvierten Massen eine Einschätzung der Modifikationsunterschiede zu treffen

[109]

4.4 Identifizierung von Proteinen mit Tandem-Massenspektrometrie

Zur Sequenzanalyse erfolgt die Untersuchung der Verdaupeptide von Proteinen mittels Tandem-Massenspektrometrie. Auf diesem Wege lassen sich Proteine eindeutig identifizieren und auch Modifikationsstellen sowie -arten qualitativ nachweisen.

Die Bildung sequenzspezifischer Fragmente durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) wurde in Kapitel 3.2.2.2 bereits erwähnt und soll an dieser Stelle genauer ausgeführt werden ^[110]. Entlang des Peptidrückgrats gibt es drei Möglichkeiten, die Peptidkette zu spalten: vor (a- bzw. x-Ion) oder nach (c- bzw. z-Ion) der Peptidbindung oder die Bindung selbst (b- bzw. y-Ion) wird gespalten. Anhand des Ortes der verbleibenden Ladung erfolgt die Einteilung der Fragmente in die N-terminal geladenen Sequenzionen a_n , b_n , c_n und die C-terminal geladenen Sequenzionen x_m , y_m , z_m ^[111,112]. Die Bildung und Einteilung der Ionen ist in Abbildung 27 nochmals gezeigt. Bei Kollisionsenergien unter 200 eV entstehen hauptsächlich die N-terminalen Fragmentenserien. Allerdings kann es auch zu sequenzspezifischen Abspaltungen an den Aminosäureseitenketten und zur Eliminierung kleiner Moleküle wie Wasser oder Kohlenmonoxid kommen.

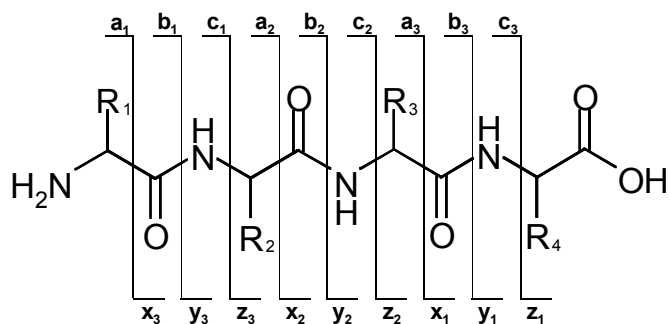


Abbildung 27: Fragmentationbildung mittels CID

Anhand der reinen Peptidmassen-Analyse, dem PMF, kann ein Datenbank-unterstützter Vergleich mit theoretischen Massenspektren von *in silico* verdauten Proteinen durchgeführt werden. Hierzu sind genaue Angaben über die chemischen und enzymatischen Vorgänge bei der Herstellung des untersuchten Verdaus nötig: Reduzierung, Alkylierungsmittel, Restriktionsenzym, Markierungen etc. Es stehen hierfür verschiedene Programme wie Mascot ^[113] oder Sequest ^[114,115] zur Verfügung, die mit umfassenden Proteindatenbanken in Verbindung stehen. Eine Suche innerhalb der kompletten Datenbanken kann einige Zeit in Anspruch nehmen, wodurch es sich bewährt hat, eingrenzende Parameter wie beispielsweise die Spezies, aus der die Proteine extrahiert wurden, zu definieren und die Datenbanken dahingehend zu vereinfachen.

Da nur die Darstellung der Peptidmassen wegen erschwerter Detektion aufgrund von Koelution oder fehlender Massengenauigkeit sehr oft nicht ausreicht, wird meistens die Analyse der Fragmentationen als PFF zur Auswertung mit herangezogen. Auch hierfür stehen einige Programme zur Verfügung, u.a. auch Mascot^[113] und Sequest^[114,115], die die Tandem-MS-Analysenergebnisse optional in der Auswertung berücksichtigen können.

Innerhalb dieser Arbeit wurde Mascot als Auswertungsprogramm benutzt. Anhand des programmspezifischen MOWSE (Molecular Weight Search)-Scores wird eine Einschätzung der Übereinstimmungen zwischen gemessenen und simulierten Spektren getroffen. Die Wahrscheinlichkeit eines Zufallstreffers bei der Peptid-Protein-Zuordnung sinkt mit steigendem Score, was u.a. von der Anzahl identifizierter Fragmentationen abhängig ist^[113].

4.5 Der Weg zur genauen Charakterisierung

Die beschriebenen Auswertungsmöglichkeiten sollten je nach Fragestellung die Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen ermöglichen. Durch Dekonvolution von Summenspektren der chromatographischen Peaks sollte die intakte Masse des detektierten Proteins ermittelt und so ein Vergleich mit theoretischen Proteinmassen aus Datenbankeinträgen ermöglicht werden. Die MS- und Tandem-MS-Analyse von Verdaupeptiden mit anschließender Datenbanksuche als Proteinidentifikation sollte für Proteome die Basis dieser Vergleiche bilden. Es sollte untersucht werden, ob der Vergleich von theoretischer und gemessener intakter Masse eine Erhöhung der Sicherheit bei Identifizierungen bieten konnte.

Diese Arbeit umfasste die Entwicklung und Optimierung einer kompletten Methodik zur Aufklärung der Zusammensetzung von Proteomen unter den Aspekten der Protein-angepassten chromatographischen, mehrdimensionalen Trennung mit anschließender schonender Ionisierung mittels ESI und Detektion mit Flugzeit- und Ionenfallen-MS zur Darstellung und Charakterisierung intakter Proteine. Außerdem sollte die Möglichkeit untersucht werden, die Ergebnisse der Proteinmessungen auf intakter Ebene mit denen der Identifizierung anhand tryptisch verdauter Proteine abzugleichen. Auch für die Darstellung und Charakterisierung glycosylierter, intakter Proteine sollte eine umfassende Methode etabliert werden.

5 Referenzen

- 1 Stryer, L. *Biochemistry*, 4th ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 1995.
- 2 Tirumalai, R. S.; Chan, K. C.; Prieto, D. A.; Issaq, H. J.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D. *Mol Cell Proteomics* **2003**, 2, 1096-103.
- 3 Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J. *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. ed.; Georg Thieme Verlag Stuttgart: New York, 1994.
- 4 Dell, A.; Morris, H. R. *Science* **2001**, 291, 2351-6.
- 5 Weckwerth, W.; Willmitzer, L.; Fiehn, O. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, 14, 1677-81.
- 6 Toll, H., Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Germany, 2005.
- 7 Apfel, A.; Chakel, J. A.; Hancock, W. S.; Souders, C.; M'Timkulu, T.; Pungor, E. Jr *J Chromatogr A* **1996**, 732, 27-42.
- 8 Meloun, B.; Kluh, I.; Kostka, V.; Moravek, L.; Prusik, Z.; Vanecek, J.; Keil, B.; Sorm, F. *Biochim Biophys Acta* **1966**, 130, 543-6.
- 9 Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3265-66.
- 10 McLafferty, F. W.; Horn, D. M.; Breuker, K.; Ge, Y.; Lewis, M. A.; Cerda, B.; Zubarev, R. A.; Carpenter, B. K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, 12, 245-9.
- 11 Lottspeich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2476-92.
- 12 Anderson, N. L.; Anderson, N. G. *Mol Cell Proteomics* **2002**, 1, 845-67.
- 13 Harry, J. L.; Wilkins, M. R.; Herbert, B. R.; Packer, N. H.; Gooley, A. A.; Williams, K. L. *Electrophoresis* **2000**, 21, 1071-81.

- 14 Bergen, H. R.; Lacey, J. M.; O'Brien, J. F.; Naylor, S. *Anal. Biochem.* **2001**, *296*, 122-9.
- 15 Renner, F.; Kanitz, R. D. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 485-90.
- 16 *Specificity of proteolysis Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York* **1992**.
- 17 Barrett, A.; Rawlings, N. D.; Woessner, J. F. *Handbook of proteolytic enzymes*, Academic Press, 1998
- 18 Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R. *Nat. Biotech.* **1999**, *17*, 994-99.
- 19 Mann, M. *Nat. Biotech.* **1999**, *17*, 954-55.
- 20 Griffin, T. J.; Gygi, S. P.; Rist, B.; Aebersold, R. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 978-86.
- 21 Stenman, U. H.; Bidart, J. M.; Birken, S.; Mann, K.; Nisula, B.; O'Connor, J. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **1993**, *216*, 42-78.
- 22 Smolka, M. B.; Zhou, H.; Purkayastha, S.; Aebersold, R. *Anal. Biochem.* **2001**, *297*, 25-31.
- 23 Wu, S. L.; Choudhary, G.; Ramstrom, M.; Bergquist, J.; Hancock, W. S. *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 383-93.
- 24 Schmidt, A.; Kellermann, J.; Lottspeich, F. *Proteomics* **2005**, *5*, 4-15.
- 25 Hsu, J.-L.; Huang, S.-Y.; Chow, N.-H.; Chen, S.-H. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6843-52.
- 26 Peters, E. C.; Horn, D. M.; Tully, D. C.; Brock, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2387-92.

- 27 Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlet-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A.; Pappin, D. J. *Mol. Cell Proteomics* **2004**, *3*, 1154-69.
- 28 Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376-86.
- 29 Washburn, M. P.; Ulaszek, R. R.; Yates III, J. R. *Anal. Chem.* **2003**, *75* , 5054-61.
- 30 Wu, C. C.; MacCoss, M. J.; Howell, K. E.; Matthews, D. E.; Yates, J. R. 3rd *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4951-9.
- 31 Washburn, M. P.; Ulaszek, R.; Deciu, C.; Schieltz, D. M. ; Yates, J. R. III *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1650-7.
- 32 Gu, S.; Pan, S.; Bradbury, E. M.; Chen, X. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 1-7.
- 33 Bantscheff, M.; Dimpfelfeld, B.; Kuster, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 869-76.
- 34 Yao, X.; Freas, A.; Ramirez, J.; Demirev, P. A.; Fenselau, C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2836-42.
- 35 Stewart, I. I.; Thomson, T.; Figeys, D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2456-65.
- 36 Micinski, S.; Grønvald, M.; Compton B. J. *Methods Enzymol.* **1996**, *270*, 342-58.
- 37 Huber, C. G.; Schley, C.; Delmotte, N. *Proteomics and Peptidomics. New Technology Platforms Elucidating Biology*, Marko-Varga, G., Elsevier, 2005.
- 38 Reid, G. E.; McLuckey, S. A. *J. Mass. Spectrom.* **2002**, *37*, 663-75.

- 39 Bogdanov, B.; Smith, R. D. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 168-200.
- 40 Millea, K. M.; Krull, I. S.; Cohen, S. A.; Gebler, J. C.; Berger, S. J. *J Proteome Res* **2006**, *5*, 135-46.
- 41 Kelleher, N. L. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 197A-203A.
- 42 O'Farrell, P. H. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007-21.
- 43 Klose, J.; Kobalz, U. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1034-59.
- 44 Huber, C. G.; Premstaller, A. *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 161-73.
- 45 Chen, H.; Horváth, C. *Anal. Meth. Instr.* **1993**, *1*, 213-22.
- 46 Hearn, M. T. W. *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, VCH Publishers: New York, 1991.
- 47 Mant, C. T.; Hodges, R. S. *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins*, CRC Press: Boca Ranton, 1991.
- 48 Katz, E. D. *High-Performance Liquid Chromatography: Principles and Methods in Biotechnology*, John Wiley and Sons: Chichester, 1996.
- 49 Creighton, T. E. *Proteins: Structures and molecular properties*, 2nd ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 1993.
- 50 Kastner, M. *Protein liquid chromatography*, Elsevier: Amsterdam, 2000.
- 51 Schley, C. Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Germany, 2007.
- 52 Kalghatgi, K.; Horváth, C. *Analytical Biotechnology-Capillary Electrophoresis and Chromatography*, American Chemical Society: Washington, DC, 1990.
- 53 Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820-22.

- 54 Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *J. Chromatogr. A* **1996**, 752, 59-66.
- 55 Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3498-501.
- 56 Hansen, L. C.; Sievers, R. E. *J. Chromatogr.* **1974**, 99, 123-33.
- 57 Hjerten, S.; Liao, J.-L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, 473, 273-75.
- 58 Meyers, J. J.; Liapis, A. I. *J. Chromatogr. A* **1999**, 852, 3-23.
- 59 Horvath, C.; Melander, W.; Molnar, I. *J. Chromatogr.* **1976**, 125, 129-56.
- 60 Geng, X.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr.* **1984**, 296, 15-30.
- 61 Heftman, E. *Chromatography, 5th edition*, Elsevier: Amsterdam, 1992.
- 62 Patthy, M. *J. Chromatogr. A* **1994**, 660, 17-23.
- 63 Melander, W. R.; El Rassi, Z.; Horváth, C. *J. Chromatogr.* **1989**, 469, 3.
- 64 Bartha, A.; Stahlberg, J. *J. Chromatogr. A* **1994**, 668, 255-84.
- 65 Chen J.-G.; Weber, S. G.; Glavina, L. L.; Cantwell, F. F. *J. Chromatogr. A* **1993**, 656, 549-76.
- 66 Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 675-79.
- 67 Banks, J. F. *J. Chromatogr. A* **1996**, 743, 99-104.
- 68 Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, 78, 53-68.
- 69 Kopaciewicz, W.; Rounds, M. A.; Fausnaugh, J.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr.* **1983**, 266, 3-21.

- 70 Shan, L.; Anderson, D. J. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5641-9.
- 71 Zhao, J.; Zhu, K.; Lubman, D. M.; Miller, F. R.; Shekhar, M. P.; Gerard, B.; Barder, T. J. *Proteomics* **2006**, *6*, 3847-61.
- 72 Pepaj, M.; Holm, A.; Fleckenstein, B.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 519-28.
- 73 Andersen, T.; Pepaj, M.; Trones, R.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1025*, 217-26.
- 74 Greibrokk, T.; Pepaj, M.; Andersen, T.; Novtna, K. *LCGC Europe* **2005**, *18*, 355-60.
- 75 Kang, X.; Frey, D. D. *Biotechnol. Bioengineering* **2004**, *87*, 376-87.
- 76 Novotny, M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 500A-10A.
- 77 Scott, R. P. W.; Simpson, C. F. *J. Chromatogr. Sci.* **1982**, *20*, 62-66.
- 78 Lottspeich, F. ; Zorbas, H. *Bioanalytik*, ed.; Spektrum: Heidelberg, 1998.
- 79 Chervet, J. P. ; Ursem, M.; Salzmann, J. P. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1507-12.
- 80 Scott, R. P. W. *Adv. Chromatogr.* **1983**, *22*, 246-95.
- 81 Beisler, A. T.; Schaefer, K. E.; Weber, S. G. *J. Chromatogr. A* **2002**, *986*, 247-51.
- 82 Chervet, J. P.; Meijvogel, C. J.; Ursem, M.; Salzmann, J. P. *LC GC* **1992**, *10*, 140-48.
- 83 Oberacher, H.; Krajete, A.; Parson, W.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2000**, *893*, 23-35.
- 84 Chervet, J. P. and van Soest, R. E. J.; Patent 1993.

- 85 Opiteck, G. J.; Lewis, K. C.; Jorgenson, J. W.; Anderegg, R. J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1518-24.
- 86 Yoo, C.; Patwa, T. H.; Kreunin, P.; Miller, F. R.; Huber, C. G.; Nesvizhskii, A. I.; Lubman, D. M. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 312-34.
- 87 Linke, T.; Ross, A. C.; Harrison, E. H. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1123*, 160-9.
- 88 Giddings, J. C. *J. Chromatogr. A* **1995**, *703*, 3-15.
- 89 Mitulovic, G.; Stingl, C.; Smoluch, M.; Swart, R.; Chervet, J. P.; Steinmacher, I.; Gerner, C.; Mechtler, K. *Proteomics* **2004**, *4*, 2545-57.
- 90 Wienkoop, S.; Glinski, M.; Tanaka, N.; Tolstikov, V.; Fiehn, O.; Weckwerth, W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 643-50.
- 91 Vollmer, M.; Nagele, E.; Horth, P. *J. Biomol. Tech.* **2003**, *14*, 128-35.
- 92 Shen, Y.; Jacobs, J. M.; Camp, D. G. 2nd; Fang, R.; Moore, R. J.; Smith, R. D.; Xiao, W.; Davis, R. W.; Tompkins, R. G. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1134-44.
- 93 Wolters, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, J. R. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683-90.
- 94 Motoyama, A.; Venable, J. D.; Ruse, C. I.; Yates, J. R. 3rd *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5109-18.
- 95 Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-54.
- 96 Price, P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, *2*, 336-48.
- 97 Andren, P. E.; Emmett, M. R.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 867-69.
- 98 Mayr, B. M., Universität der Saarlandes, Saarbrücken, Germany, 2005.

- 99 Wilm, M. S.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes* **1994**, *136*, 167-80.
- 100 Tang, K.; Gomez, A. *Phys. Fluids* **1994**, *6*, 2317-32.
Notes: English Article.
- 101 Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240.
- 102 Fenn J. B. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1993**, *4*, 524.
- 103 Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-301.
- 104 Lehmann, W. D. *Massenspektrometrie in der Biochemie*, ed.; Spektrum Akademischer Verlag: 1996.
- 105 European Training Institute, Finnigan LTQ Operation Course Thermo Fisher Scientific Germany **2007**.
- 106 Gross, J. H. *Mass Spectrometry*, Springer: 2004.
- 107 Paul, W. *Rev. Mod. Phys.* **1990**, *62*, 531-42.
- 108 de Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 2nd Edition ed.; Wiley VCH: New York, 2002.
- 109 McLafferty, F. W.; Breuker, K.; Jin, M.; Han, X.; Infusini, G.; Jiang, H.; Kong, X.; Begley, T. P. *FEBS J* **2007**, *274*, 6256-68.
- 110 Yates, J. R.; Morgan, S. F.; Gatlin, C. L.; Griffin, C. L.; Eng, J. K. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3557-65.
- 111 Roepstorff, P.; Fohlman, J. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- 112 Hunt, D. F.; Yates III, J. R.; Shabanowitz, J.; Winston, S.; Hauer, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6233-37.

- 113 Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-67.
- 114 Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R. III *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 976-89.
- 115 Yates III, J. R.; Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Schieltz, D. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1426-36.

Teil II

Methodenentwicklung zur Darstellung und Trennung von Proteinen

1 Apparative Anforderungen und Chemikalien

1.1 Apparative Systeme für die Methodenentwicklung

Mikro-HPLC-Flugzeit-MS

Die Flugzeit-massenspektrometrische Detektion wurde mit dem micrOTOF Flugzeit-Massenspektrometer mit integriertem 6-Wege-Ventil (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) und externer Spritzenpumpe Cole Parmer Serie 74900 (Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA) durchgeführt. Für die mikro-HPLC-Methodenentwicklung und zur Kopplung an das TOF-Massenspektrometer wurde ein Ultimate3000 mikro-HPLC-System verwendet bestehend aus Probengeber, Säulenofen mit 10-Wege-Schaltventilen, Pumpensystem und Entgaser (Dionex Benelux, Amsterdam, NL). Für die mikro-HPLC-Trennung chromatofokussierter Fraktionen und die Kopplung an das TOF-Massenspektrometer wurde ein mikro-HPLC-System verwendet bestehend aus Probengeber der Serie Famos und Pumpsystem mit integriertem Split und Säulenofen der Ultimate-Serie (beide Dionex Benelux, Amsterdam, NL) sowie einer analytischen HPLC-Pumpe Model K-1001 (Knauer, Berlin, Deutschland) und einem 10-Wege-Schaltventil (VICI AG, Schenkon, Schweiz).

Mikro-HPLC-Ionenfallen-MS

Die Ionenfallen-massenspektrometrische Detektion wurde mit dem LTQ-XL Ionenfallen-Massenspektrometer mit integriertem 6-Wege-Ventil und integrierter Spritzenpumpe (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Der mikro-HPLC Aufbau zur Kopplung an das LTQ-XL bestand aus einer Rheos 2000-Pumpe mit Mischkammer und Entgaser (Flux Instruments, Reinach BL, Schweiz), mit manuellem Splitsystem und dem internen 6-Wege-Ventil des LTQ-XL (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) zur manuellen Probenaufnahme sowie einem Säulenofen (Eigenbau). Das mikro-HPLC Trap-System bestand zusätzlich aus einer Accela-Pumpe zur Beladung, einem Accela Autosampler zur Probenaufnahme (beide Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) und einem 10-Wege-Ventil (VICI AG, Schenkon, Schweiz) zur Säulenschaltung. Als Detektor für UV-photometrische Untersuchungen wurde ein Ultimate-UV-Detektor mit einer 3 nl Durchfluss-UV-Zelle verwendet (Dionex Benelux, Amsterdam, NL).

Chromatofokussierung

Zur Chromatofokussierung wurden eine analytische HPLC-Pumpe High Precision Pump Model 480 (Gynkotek, Germering, Deutschland) mit variablem Wellenlängen-Detektor und Entgaser (beide Knauer, Berlin, Deutschland) sowie ein manuelles Injektionsventil (Rheodyne, IDEX® Corporation, Oak Harbor, WA, USA) verwendet. Die pH-Messung des Eluenten erfolgte mit einer Durchfluss-pH-Elektrode (Lazar Research Laboratories, Los Angeles, CA, USA) und einem pH-Meter (WTW, Weilheim, Deutschland), dessen Messwerte mittels der Chromeleon Software ausgelesen und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wurden. Zur Chromatofokussierung wurde eine starke Anionenaustauscher-Phase ProPac SAX-10 von (Dionex, Amsterdam, NL) mit den Säulenlängen 50 mm (Vorsäule) und 250 mm (Trennsäule) und Innendurchmessern von 4 und 2 mm verwendet.

Trennsystemunabhängige Accessiores

Für Direktinfusionen wurden gasdichte 250 und 500 µL-Spritzen der Serie 1700 von Hamilton (Hamilton Company, Bonaduz, Schweiz) benutzt. Für die mikro-HPLC-Trennungen wurden monolithische Kapillarsäulen mit 200 µm Innendurchmesser auf Poly(Styrol-Divinylbenzol)-Basis sowohl als Trenn- als auch als Trapsäule verwendet, die innerhalb des Arbeitskreises hergestellt wurden. Die verwendeten Fused Silika Kapillaren waren Produkte von Polymicro Technologies (Pheonix, AZ, USA), Peek-Kapillaren und Verbindungsutensilien wie Unions und Fingertights wurden von Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA) bezogen. Die Deglycosylierung wurde im Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

1.2 Chemikalienliste

Verwendete Chemikalien

Destilliertes Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von ELGA (Siershahn, Deutschland) hergestellt. Imidazol (p.a., >99.5 % (GC)), Trizma (p.a., >99.8 % (T)), Methylpiperazin (>99 % (GC)), Ethanolamin (puriss, >99 % (GC/NT)), Diethanolamin (p.a., >99 % (GC)), ortho-Phosphorsäure (85 %), Trifluoressigsäure (TFA, ≥ 99.5 %, for protein sequence analysis) und Heptafluorbuttersäure (HFBA, ≥ 99.0 %, for protein sequence analysis) wurden von Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), Piperazin

(99 %), Ameisensäure (FA, 100 % p.a.), Acetonitril (ACN E Chromasolv, for HPLC, far UV) und das Deglycosylierungs Kit (Glycoprofile™ II, Enzymatic In-Solution-N-Deglycosylation K) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen, Methanol (HPLC-gradient grade) und Ethanol (100 % absolute) stammten von VWR (Leuven, Belgien).

Proteinstandards

Als Standardproteine (verwendete Abkürzung - Datenbank-Index, Spezies) dienen Aldolase (Ald - P00883, Kaninchen) von Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), Hämoglobin (Hem (Ketten a - P69905 und b - P68870), Mensch) und Transferrin (Trf - P02788, Mensch) von Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland), sowie α -Amylase (α -Amy - P0C1B3, *aspergillus oryzae*), β -Amylase (β -Amy, Süßmandel), Carboanhydrase (Cah - P00921, Rind), β -Casein (Cas - P02666, Rind), α -Chymotrypsinogen (Chy - P00766, Rind), Conalbumin (Con - P02789, Huhn), Cytochrom C (CytC, Pferdeherz - P00004 und Rinderherz - P62894), β -Galactosidase (β -Gal - P00722, *escherichia coli*), α_1 -acid-Glycoprotein (α_1 -GP - P02763, Mensch), Hämoglobin (Hem (Ketten a - P01966 und b - P02070), Rind), Insulin (Ins - P01308, Mensch), Kreatin-Phosphokinase (KrPh - P00567, Kaninchen), α -Lactalbumin (Lal - P00711, Rindermilch), β -Lactoglobulin A (LacA - P02754, Rindermilch), β -Lactoglobulin B (LacB - P02754, Rindermilch), Lysozym (Lys - P00698, Hühnereiweiß), Myoglobin (Myo - P68082, Pferdemuskel), Myosin (Mys (verschiedene Ketten) - P02602, P02603, P02608, P35748, Q28641, P04460, P04461, P02562, Kaninchen), Ovalbumin (Ova - P01012, Hühnereiweiß), Phosphorylase b (Phos - P00518, Kaninchen), Ribonuklease A (RibA - P61823, Rind), Serumalbumin (HSA - P02768, Mensch), Serumalbumin (BSA - P02769, Rind), Trypsin (Trp - P00760, Rind) und Urease (Ure - P07374, Jack-Bohne) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland).

1.3 Zur Einschätzung der Methoden verwendete Formeln und Berechnungen

Nachweisgrenzen (NWG) für massenspektrometrische Methoden wurden durch die Berechnung jener Konzentration ermittelt, die ein Signal-zu-Rauschen von 3 ($s/n = 3$) erzeugte. Für Direktinfusionen wurde dazu die intensivste Ionen-Masse (m/z) aus

dem Summenspektrum einer Aufzeichnung von 1 Minute benutzt. Bei chromatographischen Trennungen wurde die intensivste Ionen-Masse (m/z) aus dem Summenspektrum des chromatographischen Peaks benutzt. Es wurden jeweils die Intensitäten jener Ionen mit einer Rausch-Intensität in unmittelbarer Nähe des Ions korreliert (Signalintensität/Rauschintensität). Durch den Bezug auf die untersuchte Konzentration des Analyten erfolgte anschließend die Berechnung der NWG. Formel 7 fasst die Berechnung nochmals mathematisch zusammen.

Formel 7: Berechnung der Nachweisgrenze NWG aus den Intensitäten I des Signals und des Rauschens, der Konzentration c [fmol/ μ L] des Analyten

$$NWG = \frac{I_{\text{Rauschen}} * c_{\text{Protein}} * 3}{I_{\text{Signal}}} = \frac{c_{\text{Protein}} * 3}{s/n}$$

Der Vertrauensbereich eines Mittelwertes beinhaltet im Gegensatz zur einfachen Standardabweichung die Wahrscheinlichkeit P , mit der der berechnete Mittelwert kein Zufallstreffer bzw. nicht falsch-positiv ist. Innerhalb der Methodenentwicklung wurden für alle berechneten Werteschwankungen der Vertrauensbereich um den Mittelwert gemäß Formel 8 berechnet und angegeben.

Formel 8: Berechnung des Vertrauensbereichs um einen arithmetisch gemittelten Mess- bzw. Ergebniswert

$$V_b = s * t$$

mit V_b als Vertrauensbereich
 s als Standardabweichung des Mittelwertes
und t dem Studentfaktor, beidseitiger Test mit der Wahrscheinlichkeit P (meist 95%) und den Freiheitsgraden f (Anzahl Messwerte - 1)

2 Entwicklung und Optimierung einer Methodik zur Proteinanalyse mittels mikro-HPLC-TOF-MS

Um eine Substanz oder eine Substanzklasse massenspektrometrisch darstellen zu können, müssen verschiedene Instrumentenparameter optimiert werden. Die Parameter des TOF-Massenspektrometers und die Massenkalisierung wurden mittels Direktinfusion von Standardproteinen optimiert. Die optimalen Bedingungen der mikro-HPLC-Trennung wurden anhand von Proteinstandardmischungen ermittelt. Nach Kopplung mit der TOF-MS wurde die Methode auf Reproduzierbarkeit der Retention sowie Massenstabilität und -genauigkeit überprüft ^[1].

2.1 Parameteroptimierung und Massenkalisierung am micrOTOF

Die Parameter der Ionenquelle und der Ionenoptik wurden durch die Verwendung von verschiedenen Proteinen mittels Direktinfusion optimiert. Da dieses Tuning des Massenspektrometers das Gelingen der Analytik stark beeinflusst, wird im folgenden Kapitel detailliert darauf eingegangen. Die Massenkalisierung wurde mittels Direktinfusion von Lysozym durchgeführt.

Zur Optimierung der Sprayeinstellungen wurden ein Standard mit 10.5 pmol Lysozym und 8 pmol Cytochrom C (Pferd) je μL Lösungsmittel (20 % Acetonitril in 0.05 % wässriger Trifluoressigsäure-Lösung) mit konstantem Fluss von 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ direkt injiziert und die Intensitäten der so erhaltenen Ladungszustände betrachtet. Aus jeweils 20,000 Microscans wurde ein Spektrum durch Aufsummierung gebildet, welches einem abgebildeten Messpunkt entspricht.

Mit den Cytochrom C-Ladungszuständen wurde eine MS-Methode optimiert, die als Basismethode der weiteren Optimierungsschritte diente. Anhand der Intensitäten der dargestellten Ladungsverteilungen wurden die Position der Fused Silica-Spraykapillare mit den Maßen 90/20 μm Außen-/Innendurchmesser und die benötigten Stickstoffflüsse für Sprüh- (*Spray-*) und Trockengas (*dry gas*) ermittelt. In einem zweiten Schritt wurde die Optimierung der Parameter zur Darstellung höherer m/z -Werte (1000-2000 m/z) mit dem Lysozym-Standard durchgeführt. Die Ionisations-Parameter wurden überprüft und die Parameter der Ionenoptik wurden halbautomatisch optimiert. Durch diese Optimierungsschritte ergaben sich die in Tabelle 7 dargestellten Parameter. Die Direktinfusion des Lysozym/Cytochrom C-

Standards ist in Abbildung 28 dargestellt. Gezeigt sind das Totalionenstromchromatogramm und das Summenspektrum von einer Minute Aufzeichnung sowie das daraus resultierende Dekonvolutionspektrum.

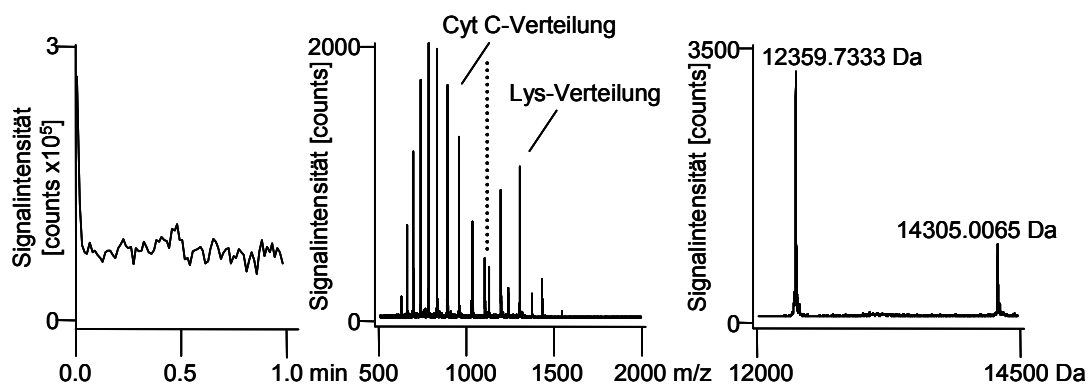


Abbildung 28: Totalionenstrom (links), Ladungsverteilung (mittig) und Dekonvolutionspektrum (rechts) einer Direktinfusion des Lys/Cyt C-Standards

Mittels Direktinfusionen des beschriebenen Standards wurden tägliche Massenkaliierungen bzw. Kalibrierungsprüfungen durchgeführt. Die Kalibriermassen sind anhand der m/z-Werte der Lysozym-Ionen in Tabelle 8 dargestellt. Kalibrierungen wurden als nutzbar interpretiert bei Massenabweichungen, die unter 100 ppm für jedes Protein waren. Die in Abbildung 28 gezeigte Messung ergab eine Abweichung von -4.86 ppm für Lysozym und eine Abweichung von -29.67 ppm für Cytochrom C.

Tabelle 7: Optimierte Parameter am micrOTOF nach Tuning mit Cytochrom C und Lysozym

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.3 bar	Pulsar Push/Pull	400 V
Dry Gas	4.0 L/min	Corrector Fill	60 V
Dry Temperature	210 °C	Reflector	1300 V
End plate offset	-500 V	Flight Tube:	9000 V
Capillary	3500 V	Corrector Extract	900 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	2100 V

Tabelle 7 (Fortsetzung)

Parameter der Ionenoptik

Capillary exit	150.0 V	Lens 1 storage	40.0 V
Skimmer 1	50.0 V	extraction	20.2 V
Hexapole 1	17.5 V	Lens 2	18.0 V
Skimmer 2	25.4 V	Lens 3	-26.2 V
Hexapole 2	20.7 V	Lens 4	-26.2V
Hexapole RF	600 V	Lens 5	25.1 V
Pre Puls Storage Time	15.0 μ s	Focus	aktiv
		Transfer Time	69.0 μ s

Tabelle 8: Liste der Kalibriermassen des Lysozyms; hervorgehoben sind die anhand des Spektrums zur Kalibrierung verwendbaren Ionen

Ladung	m/z	Ladung	m/z
0	14305.076	8+	1789.142
1+	14306.084	9+	1590.461
2+	7153.546	10+	1431.516
3+	4769.367	11+	1301.469
4+	3577.277	12+	1193.098
5+	2862.023	13+	1101.398
6+	2385.187	14+	1022.799
7+	2044.590	15+	954.680

Um genaue NWGs berechnen zu können, ohne die Beeinflussung der Detektierbarkeit durch ein weiteres vorhandenes Protein in Kauf nehmen zu müssen, wurden die zwei Proteine als Einzelstandards untersucht, wobei das Pferde-Cytochrom C nun gegen Rinder-Cytochrom C ausgetauscht wurde. Dies erlaubte einen gleichzeitigen Vergleich beider Proteine und ihrer MS-Darstellbarkeit. Beide Proteine (Cyt C aus Pferdeherz und Cyt C aus Rinderherz) verhalten sich deutlich vergleichbar bei MS-Detektion. Abbildung 29 zeigt die Spektren der Untersuchungen der Einzelproteine.

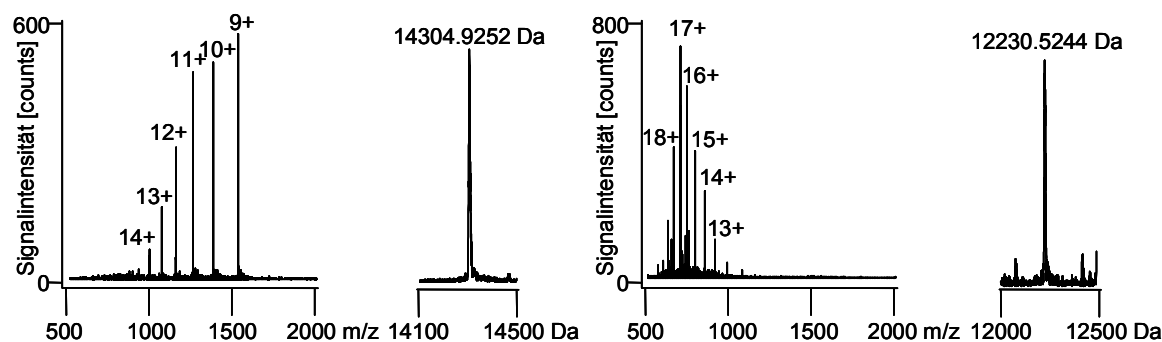


Abbildung 29: Spektren und Dekonvolutionsspektren von Lysozym (links) und Rinder-Cytochrom C (rechts)

Anhand der Untersuchung von 910 fmol/ μ L Lysozym ergab sich für das intensivste Ion ein s/n von 66 und eine NWG von 42 fmol/ μ L nach Formel 7. Cytochrom C (84 fmol/ μ L) zeigte ein s/n von 36, was eine NWG von 7 fmol/ μ L ergab. Die Proteine lagen gelöst in 20 % ACN in 0.05 % wässriger TFA-Lösung vor.

Im anschluss an die Optimierung der massenspektrometrischen Parameter konnte die Kopplung mit der mikro-HPLC durchgeführt werden.

2.2 Entwicklung einer mikro-HPLC-Trennmethode für intakte Proteine

Es wurden zwei mikro-HPLC-Methoden für die Trennung von Proteinen untersucht und auf Reproduzierbarkeit der Retention sowie auf Massengenauigkeit und -stabilität bezüglich der massenspektrometrischen Detektion geprüft. Da sich die Verwendung von Acetonitril-Wasser-Gradienten in der Peptidanalytik bereits bewährt hat ^[2-4], wurden nur die Ionenpaarreagenzien Trifluoressigsäure (TFA) und Ameisensäure (FA) auf ihre Eignung als Additive zur Trennung und Detektion von Proteinen getestet ^[1].

Steuerungsmethoden mittels Chromeleon waren für das verwendete Ultimate3000-System bereits für die Peptidanalytik als Standard- und Trap-System-Methodik etabliert, so dass auf einen kompletten Systemtest verzichtet werden konnte.

2.2.1 TFA als Ionenpaarreagenz

TFA wurde in einer Konzentration von 0.05 % den Eluenten Wasser und Acetonitril zugesetzt. Es wurden zwei Proteinstandard-Mischungen zusammengestellt, deren Zusammensetzungen in Tabelle 9 angegeben sind. Die zur Berechnung der theoretischen Massen verwendeten Proteinsequenzen sind in Form der Datenbankeinträge (Indices) in Kapitel 1.2 angegeben. Jede Mischung wurde mit drei verschiedenen Gradienten dreifach analysiert. Die Gradienten verliefen von 20 % bis 50 % ACN in wässriger 0.05 % TFA in 15 (Gradient 1), 30 (Gradient 2) und 60 min (Gradient 3). Es wurde ein PS/DVB-Monolith (50 x 0.2 mm i.D.) als stationäre Phase mit einem Fluss von 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei 50°C benutzt. Als Detektion diente die in Kapitel 2.1 in Tabelle 7 angegebene TOF-MS-Methode. Das Injektionsvolumen betrug 1 μL .

Tabelle 9: Zusammensetzung der 10- und 8-Proteinstandard-Mischungen, Konzentration und theoretische Massen der Proteine (für Transferrin ist nur die Sequenzmasse angegeben)

Protein	Theoretische Masse in Da	Konzentration in der 10-Proteinstandard-Mischung in fmol/ μL	Konzentration in der 8-Proteinstandard-Mischung in fmol/ μL
Ribonuclease A	13682.3	790	1975
Cytochrom C (Pferd)	12360.1	177	441
Lysozym	14306.2	238	596
Myoglobin	16951.5	162	406
β -Lactoglobulin B	18276.3	150	376
β -Lactoglobulin A	18362.4	104	260
Insulin	5806.6	536	-
α -Lactalbumin	14180.2	148	-
Hämoglobin a	15053.2	175	-
Hämoglobin b	15954.4	175	-
Transferrin	76960	-	326
Carboanhydrase	29022.7	-	416

In Abbildung 30 ist jeweils eine Analyse je verwendetem Gradient der 10-Proteinstandard-Mischung (links) und der 8-Proteinstandard-Mischung (rechts) mit TFA als Additiv vergleichend zusammengestellt.

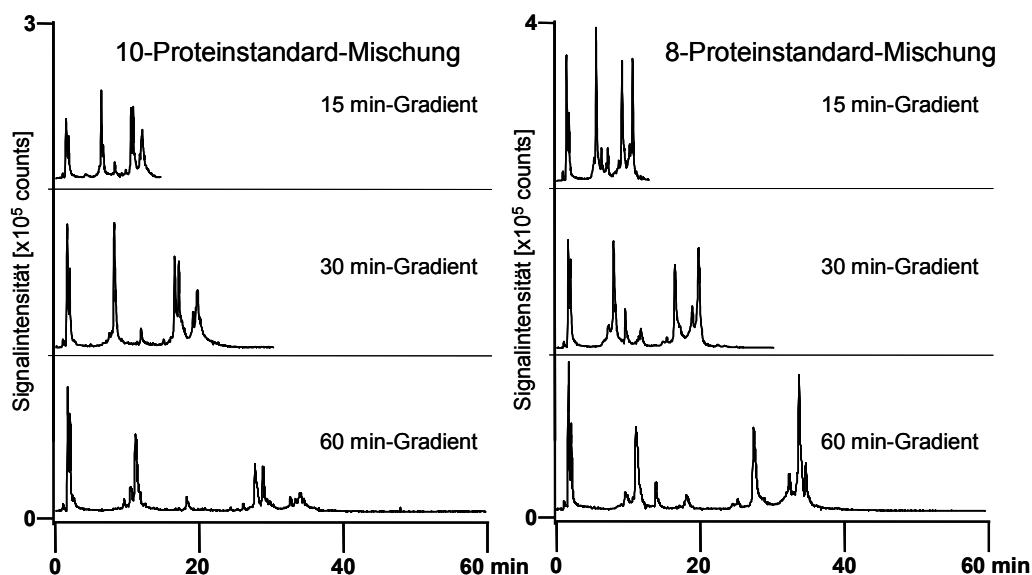


Abbildung 30: Trennungen mit TFA als Ionenpaarreagenz der 10- und 8-Proteinstandard-Mischungen in 15, 30 und 60 min, TIC der TOF-MS-Detektion

Mittels TOF-MS-Detektion konnten in beiden Mischungen alle Proteine mit Ausnahme von α -Lactalbumin, Hämoglobin b und Transferrin nachgewiesen werden. Auf die erhaltenen Spektren der Proteine wird in Kapitel 2.2.3 eingegangen. Mit allen drei Gradienten wurden für beide Proteinstandard-Mischungen keine ganz optimalen Trennungen erzielt, die Proteine wurden jedoch überwiegend getrennt voneinander als scharfe Peaks detektiert. TFA eignet sich somit als Additiv zur Trennung von Proteinen.

2.2.2 FA als Ionenpaarreagenz

Analog zu Kapitel 2.2.1 wurden die in Tabelle 9 beschriebenen Proteinstandard-Mischungen unter Verwendung von 0.1 % Ameisensäure als Additiv getrennt und mittels TOF-MS detektiert. Alle Methodenparameter entsprechen den in Kapitel 2.2.1 angegebenen Vorgehensweisen, mit Ausnahme des Additivs.

In Abbildung 31 ist jeweils eine Analyse je verwendetem Gradient der 10-Proteinstandard-Mischung (links) und der 8-Proteinstandard-Mischung (rechts) vergleichend zusammengestellt.

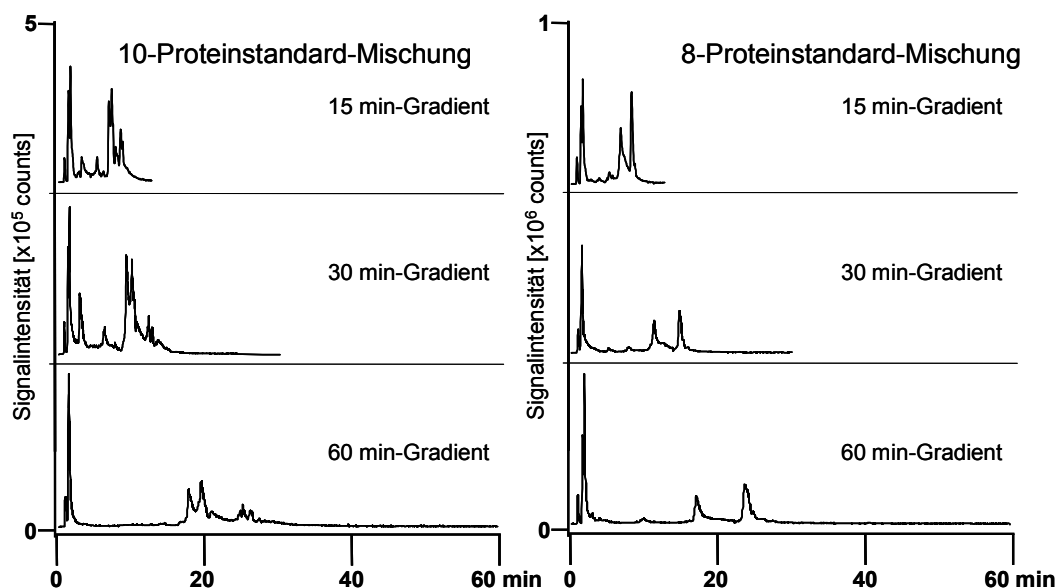


Abbildung 31: Trennungen mit FA als Ionenpaarreagenz der 10- und 8-Proteinstandard-Mischungen in 15, 30 und 60 min, TICs der TOF-MS-Detektion

Schmale, diskrete Peaks wurden bei der Trennung mit FA als Additiv nicht erhalten. Auch wurde ein erhöhtes Maß an Koelution festgestellt. Mittels der TOF-MS-Detektion konnten mit Ausnahme von α -Lactalbumin, Hämoglobin b und Transferrin alle in den Mischungen enthaltenen Proteine dargestellt werden. Auf die Spektren der Proteine wird in Kapitel 2.2.3 eingegangen.

2.2.3 Eluentenvergleich – TFA vs. FA

Die Eignung der Methoden aus den Kapiteln 2.2.1 mit 0.05 % TFA und 2.2.2 mit 0.1 % FA wurden auch mit einem System mit integrierter Aufkonzentrierung über eine Trap-Säule am Ultimate3000 gekoppelt mit dem micrOTOF untersucht. Es wurden wieder die in Tabelle 9 angegebenen Proteinstandard-Mischungen mit einem Injektionsvolumen von 1 μ L analysiert. Die Trenbedingungen wurden wie bereits beschrieben beibehalten, nur dass vor der eigentlichen Trennung eine dreiminütige Trap-Phase an einem PS/DVB-Monolithen (10 x 0.2 mm i.D.) mit 0.1 % wässriger Heptafluorbuttersäure (HFBA) als Fließmittel (10 μ L/min Fluss) programmiert wurde. Die MS-Chromatogramme der Trennungen der 10-Proteinstandard-Mischung sind in Abbildung 32 gezeigt.

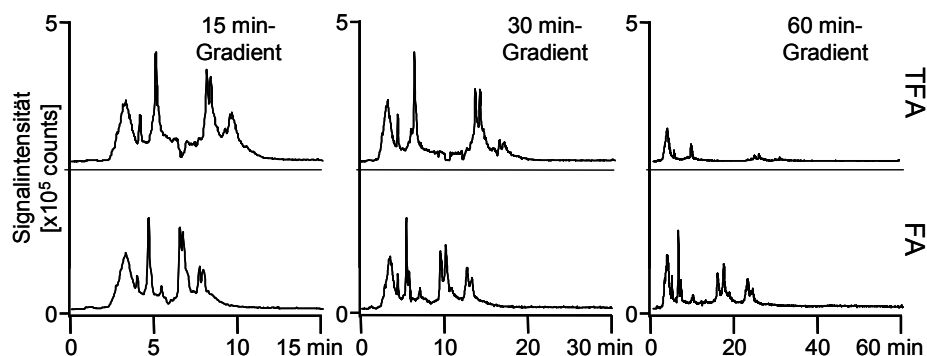


Abbildung 32: Chromatogramme der Trennungen der 10-Proteinstandard-Mischung bei 15 (links), 30 (mittig) und 60 min (rechts) Gradientenlaufzeit; oben: TFA-Eluenten, unten: FA-Eluenten; TIC der TOF-MS-Detektion

Wie bereits bei den nicht-getrappten Analysen der 10-Proteinstandard-Mischung fiel auf, dass durch die Verwendung von FA als Additiv eine schnellere Trennung erzielt wurde, wodurch die Anwendung auf biologische Proben limitiert ist. Optimale Trennungen wurden mit dem Trapsystem jedoch weder bei der Verwendung von TFA noch mittels FA als Additiv beobachtet. Mit keinem der Additive konnten alle 10 untersuchten Proteine als chromatographischer Peak dargestellt werden. Die Chromatogramme zeigten des Weiteren als TIC keine eindeutige Basislinie, so dass selbst die detektierten Peaks nicht grundsätzlich basisliniengetreunt dargestellt werden konnten. Die entsprechenden Chromatogramme aus den Messungen der 8-Proteinstandard-Mischung zeigt Abbildung 33. Auch anhand der Untersuchung der 8-Proteinstandard-Mischung ließ sich keine konkrete Aussage über die Eignung der Methoden für die Proteintrennung treffen.

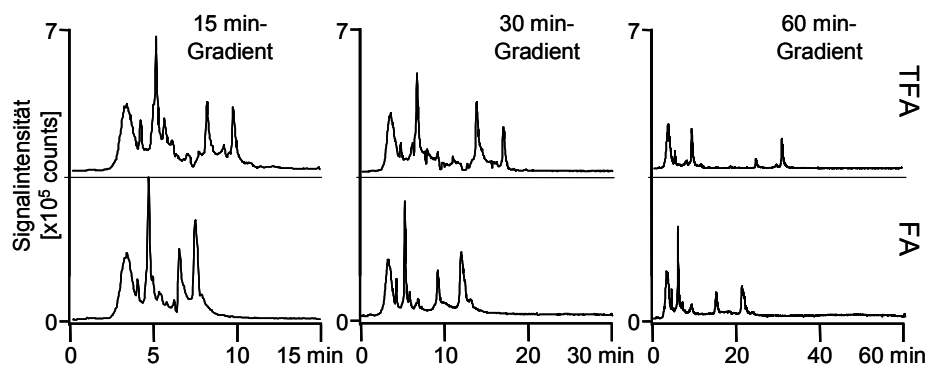


Abbildung 33: Chromatogramme der Trennungen der 8-Proteinstandard-Mischung mit dem Trap-System bei 15 (links), 30 (mittig) und 60 min (rechts) Gradientenlaufzeit; oben: TFA-Eluenten, unten: FA-Eluenten; TIC der TOF-MS-Detektion

Da auch die Detektion der Proteine mit dem jeweiligen Additiv klare Aussagen liefern musste, sollten die Spektren einem Vergleich unterzogen werden. In Abbildung 34 sind die Chromatogramme der 10-Proteinstandard-Mischung mit beiden Trennmethoden und den 15-min-Gradienten nochmals als Basispeakchromatogramm (Basepeak Chromatogramm, BPC) dargestellt. Die nachgewiesenen Proteine sind annotiert, die Spektren aus der 10-Proteinstandard-Mischung sind in der Proteinreihenfolge ihrer Retention, die mit beiden Additiven gleich ausfiel, in Abbildung 35 gezeigt. Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen die entsprechenden Darstellungen für die 8-Proteinstandard-Mischung.

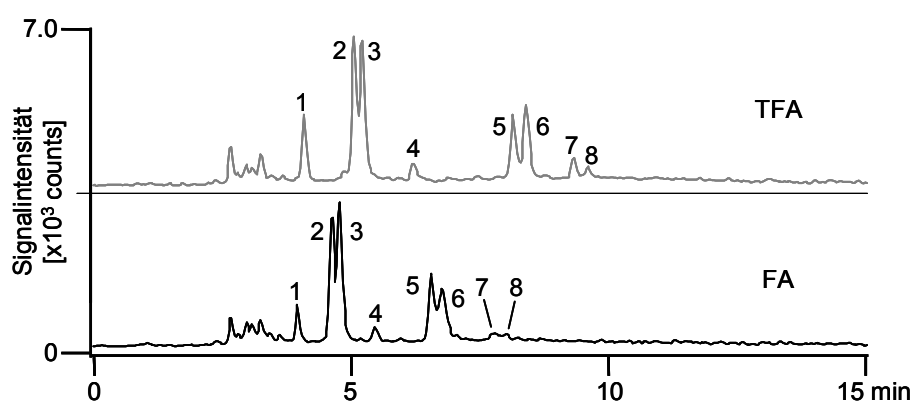


Abbildung 34: Trennung der 10-Proteinmischung mit TFA (oben) und FA (unten), BPC der Trennungen mit dem 15-min-Gradienten, annotiert sind die nachgewiesenen Proteine (vgl. Abbildung 35)

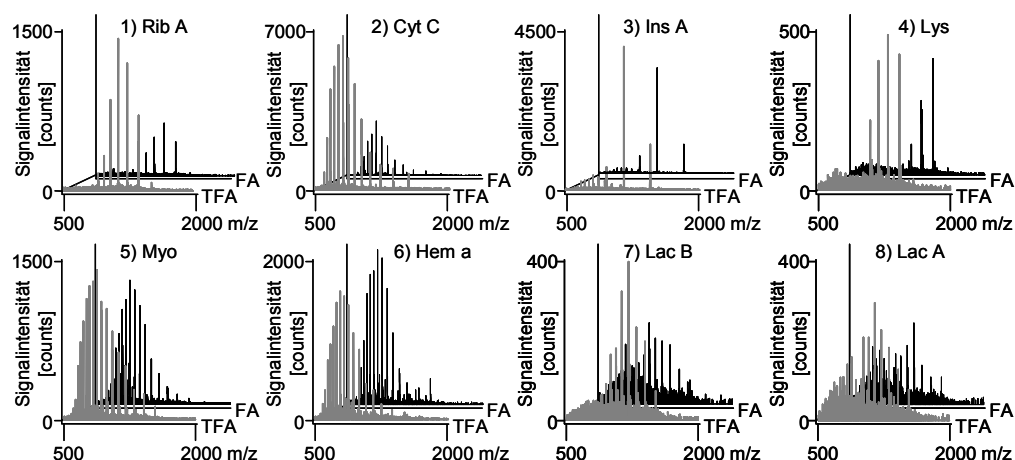


Abbildung 35: Spektren der Analysen der 10-Proteinstandard-Mischung nach Trennung mit dem 15-min-Gradienten mit TFA (vordere Achse) und FA (hintere Achse)

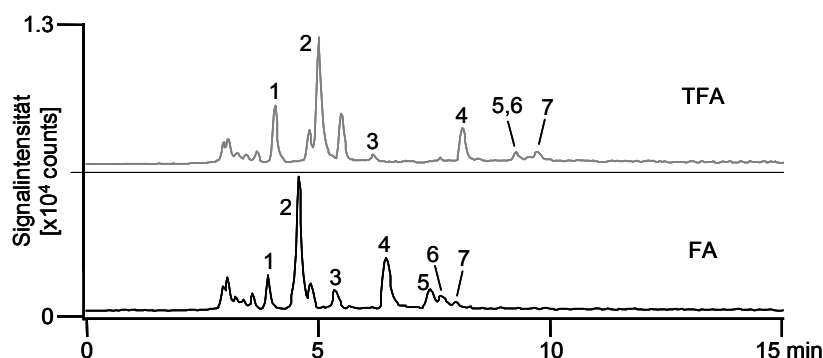


Abbildung 36: Trennung der 8-Proteinmischung mit TFA (oben) und FA (unten), BPC der Trennungen mit dem 15-min-Gradienten, annotiert sind die nachgewiesenen Proteine (vgl. Abbildung 37)

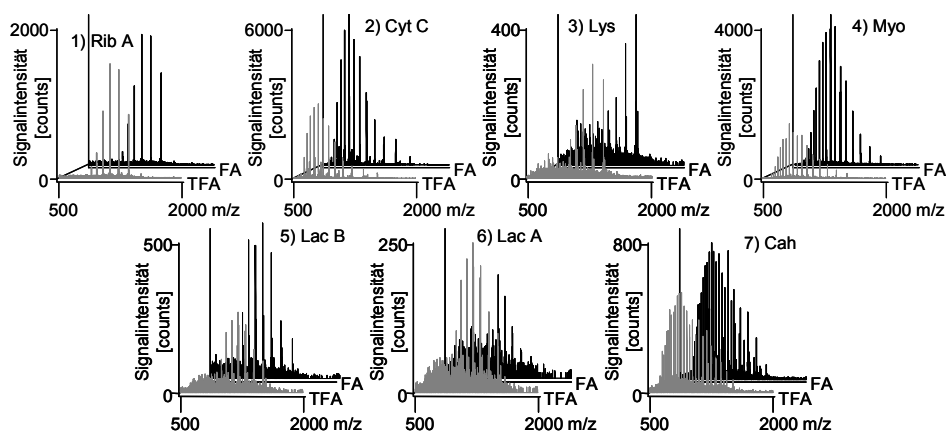


Abbildung 37: Spektren der Analysen der 8-Proteinstandard-Mischung nach Trennung mit dem 15-min-Gradienten mit TFA (vordere Achse) und FA (hintere Achse)

Anhand der 10-Proteinstandard-Mischung wurden intensivere Ladungszustände unter den TFA-Trennbedingungen im Vergleich zu der Trennung mit FA als Additiv beobachtet. Die gemittelte Intensität des Hauptions aller nachgewiesenen Proteine betrug bei der Analyse mit TFA etwa 2100 counts, was fast doppelt so intensiv war, wie die gemittelte Intensität der mit FA detektierten Hauptionen der Proteine (etwa 1200 counts). Mit der Untersuchung der 8-Proteinstandard-Mischung konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden, die gemittelten Intensitäten betragen hier mit der FA-Methode etwa die doppelte Intensität (mit TFA: 800 counts, mit FA: 1700 counts). Die Qualität der Spektren ausgedrückt durch eine breite Verteilung der Ladungszustände war unter Benutzung beider Additive zufrieden stellend und vergleichbar. Das Rauschverhalten war ebenfalls vergleichbar, wodurch sich die Signal-zu-Rauschen-Werte der Proteine nur aufgrund der Signalintensität unterschieden, was bereits aus

der Intensitätsdarstellung in Abbildung 36 und Abbildung 37 hervorgeht. Die Darstellung der Proteine α -Lactalbumin, Hämoglobin b und Transferrin war mit beiden Methoden nicht erfolgreich. Chromatographisch zeigte jedoch TFA als Additiv Vorteile: es wurden schärfere Peaks erhalten und die Gesamtretentionszeit war im 15-min-Gradienten etwa um 2 min erhöht, jedoch noch innerhalb der Gradientenzeit. Daraus lässt sich schließen, dass die TFA-Methode eine höhere Peakkapazität erzeugt, wodurch sich diese Methode in Hinblick auf die Untersuchung komplexer biologischer Proben als effizientere Trennmethode, gemessen an der gleichwertigen FA-Methode, darstellte ^[1].

2.3 Reproduzierbarkeit von Trennung und Detektion

Wie aus Kapitel 2.2.3 hervorgeht, war die verwendete MS-Methode noch nicht optimal um eine Vielzahl von Proteinen mit einem Analysenlauf zu charakterisieren. Die Parameter des micrOTOF's wurden daher erneut wie in Kapitel 2.1 beschrieben durch Direktinfusion von Lysozym optimiert, so dass auch die bislang nicht detektierbaren Proteine α -Lactalbumin, Hämoglobin b und Transferrin nachweisbar wurden. Transferrin sollte in der 8-Proteinstandard-Mischung sowohl zur Prüfung der Detektierbarkeit großer Proteine dienen, als auch einen Test für die potentielle Charakterisierung von glycosylierten Proteinen darstellen. Bei dem neuen Tuning des micrOTOF's wurde verstärkt auf die Generierung breiter Ladungsverteilungen im Massenbereich von 500 bis 3000 m/z geachtet, um auch sehr große Proteine darstellen zu können, deren intensive Ionen im Bereich von 2000 bis 3000 m/z liegen. Diese Optimierung ergab die in Tabelle 10 gezeigten Werte für die MS-Parameter.

Mit diesen MS-Einstellungen wurden anhand der in Kapitel 2.2 vorgestellten Proteinstandard-Mischungen statistische Parameter die Trennung, Massengenauigkeit und Massenstabilität betreffend ermittelt. Dazu wurden die Mischungen mit den in Tabelle 11 angegebenen Trennparametern analysiert. Die Zusammensetzung der Mischungen ist in Tabelle 12 angegeben, wobei der 10-Proteinstandard-Mischung Trypsin als weiterer Analyt zugesetzt wurde, somit handelte es sich bei diesen Analysen um eine 11-Proteinstandard-Mischung. Jede Proteinstandard-Mischung wurde 10fach mit den beschriebenen Trenn- und Detektionsparametern analysiert.

Tabelle 10: Optimierte TOF-MS-Parameter nach erneutem Tuning mit Lysozym

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.2 bar	Pulsar Push/Pull	389 V
Dry Gas	3.0 L/min	Corrector Fill	95 V
Dry Temperature	300 °C	Reflector	1300 V
End plate offset	-500 V	Flight Tube:	9000 V
Capillary	3500 V	Corrector Extract	849 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	1990 V
Parameter der Ionenoptik			
Capillary exit	230.5 V	Lens 1 storage	40.0 V
Skimmer 1	49.2 V	extraction	21.8 V
Hexapole 1	17.5 V	Lens 2	3.8 V
Skimmer 2	24.2 V	Lens 3	13.7V
Hexapole 2	22.3 V	Lens 4	-30.0V
Hexapole RF	637.1 V	Lens 5	16.6 V
Pre Puls Storage Time	30 µs	Focus	aktiv
		Transfer Time	100.0 µs

Tabelle 11: Trennparameter zur Ermittlung der Reproduzierbarkeiten

Stationäre Phase	PS/DVB-Monolith, 50 x 0.2 mm i.D
Eluent A	0.05 % TFA in Wasser
Eluent B	0.05 % TFA in Acetonitril
Gradient	20-50 % B in 15 min
Fluss	2 µL/min
Temperatur	50°C
Injektionsvolumen	1 µL

Tabelle 12: Zusammensetzung der Proteinstandard-Mischungen für die Reproduzierbarkeitsstudien

Protein	Theoretische Masse in Da	Konzentration in der 11-Proteinstandard-Mischung in fmol/μL	Konzentration in der 8-Proteinstandard-Mischung in fmol/μL
Ribonuclease A	13682.3	1975	1975
Cytochrom C	12360.1	441	441
Lysozym	14306.2	596	596
Myoglobin	16951.5	406	406
β-Lactoglobulin B	18276.3	376	376
β-Lactoglobulin A	18362.4	260	260
Insulin	5806.6	1341	-
α-Lactalbumin	14180.2	369	-
Hämoglobin a	15053.2	438	-
Hämoglobin b	15954.4	438	-
Trypsin	23293.3	1239	
Transferrin	79593.3	-	326
Carboanhydrase	29022.7	-	416

2.3.1 11-Proteinstandard-Mischung

Die ermittelten TICs und BPCs von drei Injektionen sind für die 11-Proteinstandard-Mischung beispielhaft in Abbildung 38 dargestellt.

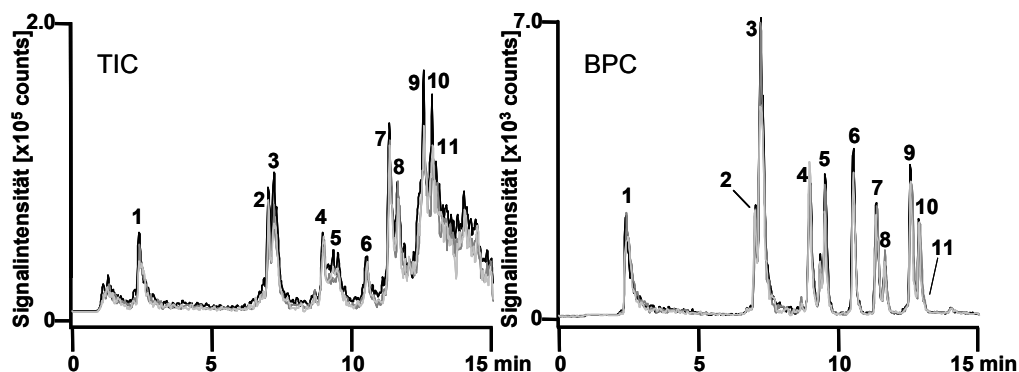


Abbildung 38: Chromatogramme von 3 Injektionen der 11-Proteinstandard-Mischung; TIC (links) und BPC (rechts), annotiert sind die zugeordneten Peaks (vgl. Abbildung 39)

Mit dieser optimierten MS-Methode konnten alle untersuchten Proteine anhand ihrer Spektren den Peaks zugeordnet werden. Abbildung 39 zeigt die gemessenen Spektren und Dekonvolutionsspektren der untersuchten 11-Proteinstandard-Mischung in der Elutionsreihenfolge wie in Abbildung 38 annotiert.

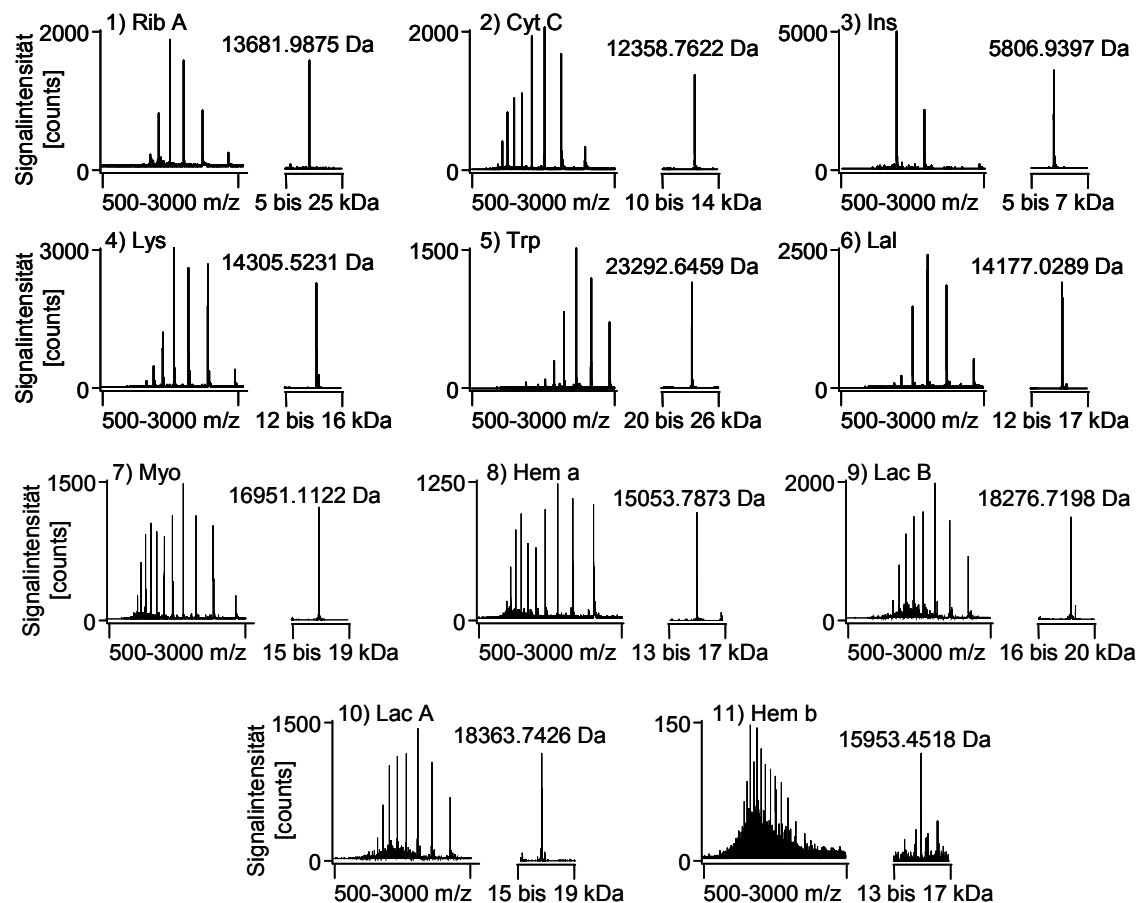


Abbildung 39: Spektren und Dekonvolutionsspektren der 11 Proteine aus der 11-Proteinstandard-Mischung

Durch die überlagerten Chromatogramme (Abbildung 38) konnte schon graphisch auf eine gute Reproduzierbarkeit der Trennung geschlossen werden. Um diesen Eindruck abzusichern, wurden die 10 Messungen zur Erstellung von Retentionsmittelwerten benutzt. Außerdem wurde anhand dieser Analysen die Massengenauigkeit der TOF-MS-Methode bestimmt, indem die gemessenen Massen bzw. intensivsten Ionen pro Protein mit theoretischen Massen korreliert wurden. Hierzu wurden von den bestimmten Parametern die arithmetischen Mittelwerte der 10 Parallelmessungen und der dazugehörige Vertrauensbereich nach Formel 8 berechnet.

Die Retentionszeiten bei 10facher Injektion der Proteine schwankten um weniger als 0.1 min, mit Ausnahme von Ribonuklease A, dessen Retentionsschwankung geringfügig über 0.1 min lag. Auch die Abweichungen der Massen des intensivsten Ions und der Dekonvolutionsmasse waren mit unter 20 bzw. 100 ppm gering und die Massengenauigkeit somit zufrieden stellend. Über die Abweichungen in der Retentionszeit und der gemessenen Massen gibt Tabelle 13 Aufschluss.

Tabelle 13: 10fache Messung der 11-Protein-Standardmischung; Abweichungen der Retentionszeit und Massen der Proteine; jeweils gemittelttes Ergebnis und Vertrauensbereich für P = 95 % und f = 9 (relative Standardabweichung)

Protein	Retentionszeit in min	Massenabweichung des intensivsten Ions in Da // ppm	Massenabweichung der Dekonvolutionsmasse in Da // ppm
Ribonuklease A	2.4 ± 0.12 (2.1 %)	-0.03 ± 0.065 // -17.8 ± 37.77	18.1 ± 128.92 // -22.8 ± 9422.13
Cytochrom C	7.0 ± 0.03 (0.2 %)	-0.17 ± 0.063 // -101 ± 33.74	-1.0 ± 0.69 // -80.2 ± 55.83
Insulin	7.2 ± 0.07 (0.5 %)	0.08 ± 0.008 // 53.6 ± 5.81	0.6 ± 0.74 // 100.3 ± 127.69
Lysozym	9.0 ± 0.04 (0.2 %)	-0.03 ± 0.039 // -18.5 ± 21.78	-0.05 ± 0.872 // -3.2 ± 60.93
Trypsin	9.5 ± 0.03 (0.1 %)	0.10 ± 0.086 // 12.6 ± 36.86	1.7 ± 1.04 // 71.1 ± 44.73
α-Lactalbumin	10.5 ± 0.05 (0.2 %)	-0.01 ± 0.097 // -3.8 ± 47.72	0.2 ± 0.78 // 13.8 ± 55.14
Myoglobin	11.3 ± 0.04 (0.1 %)	-0.01 ± 0.040 // -7.8 ± 21.22	-0.1 ± 0.54 // -6.6 ± 31.72
Hämoglobin a	11.6 ± 0.02 (0.1 %)	0.11 ± 0.081 // 56.2 ± 42.79	1.0 ± 0.84 // 68.0 ± 55.63
β-Lactoglobulin B	12.6 ± 0.05 (0.2 %)	0.02 ± 0.062 // 7.8 ± 30.58	-0.1 ± 1.19 // -4.9 ± 65.24
β-Lactoglobulin A	12.9 ± 0.05 (0.2 %)	-0.15 ± 0.058 // -72.6 ± 28.33	-1.3 ± 0.71 // -70.4 ± 38.78
Hämoglobin b	14.0 ± 0.05 (0.2 %)	0.15 ± 0.901 // 99.1 ± 620.72	0.8 ± 1.76 // 50.5 ± 110.58

Aus Abbildung 40 geht die Retentionsverschiebung nochmals graphisch hervor, hierfür wurden die Mittelwerte der Retentionszeiten von den Einzelretentionszeiten subtrahiert und diese Differenzen gegen die Injektionsnummer aufgetragen.

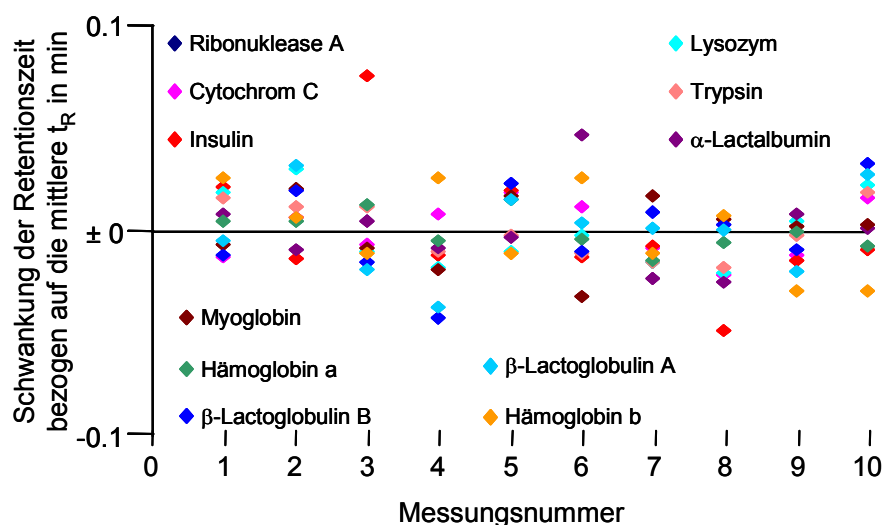


Abbildung 40: Retentionsverschiebung der 11-Proteinstandard-Mischung, Schwankungstrend

In Tabelle 14 sind die Nachweisgrenzen der einzelnen Proteine aus der 10fachen Untersuchung der Standardmischung anhand von drei Auswertungsmöglichkeiten aufgeführt: Berechnung der Konzentration, bei der die Substanz ein Signal-zu-Rauschen (s/n) von 3 hervorruft anhand des TIC's, des BPC's und des intensivsten Ions im Spektrum.

Tabelle 14: Nachweisgrenzen (NWG) der 11 Standardproteine berechnet aus dem TIC, dem BPC und dem intensivsten Ladungszustand des jeweiligen Spektrums; jeweils gemitteltes Ergebnis der 10 Messungen \pm Vertrauensbereich für P = 95 %

Protein	NGW in fmol TIC	NGW in fmol BPC	NGW in fmol Spektrum
Ribonuklease A	343.9 \pm 107.94	299.0 \pm 72.64	97.4 \pm 20.56
Cytochrom C	50.2 \pm 14.53	60.6 \pm 24.82	13.9 \pm 6.69
Insulin	141.2 \pm 57.21	71.3 \pm 20.72	22.0 \pm 16.72
Lysozym	96.7 \pm 40.33	56.2 \pm 20.74	14.6 \pm 14.30
Trypsin	305.6 \pm 126.03	129.0 \pm 37.53	43.5 \pm 26.37
α-Lactalbumin	85.8 \pm 33.95	33.4 \pm 18.92	10.5 \pm 8.58

Tabelle 14 (Fortsetzung)

Protein	NGW in fmol TIC	NWG in fmol BPC	NWG in fmol Spektrum
Myoglobin	29.0 ± 9.16	52.1 ± 19.47	13.8 ± 9.96
Hämoglobin a	43.3 ± 15.26	117.3 ± 41.53	30.2 ± 21.28
β-Lactoglobulin B	22.5 ± 7.93	40.3 ± 16.05	16.4 ± 8.65
β-Lactoglobulin A	17.4 ± 6.32	39.8 ± 14.53	14.3 ± 4.43
Hämoglobin b	51.6 ± 18.68	627.7 ± 243.43	398.3 ± 144.18

Es zeigte sich, dass die aus den Spektren berechneten Nachweisgrenzen mit Ausnahme der NWG des Hämoglobin b die geringsten Werte aufwiesen. Je nach Breite der Ladungsverteilung des Proteins wurden auch unterschiedliche NWGs aus dem TIC und dem BPC berechnet. Dies lässt sich dahingehend erklären, dass bei geringer Verteilung die Intensität des Hauptions verglichen zu breiten Verteilungen sehr hoch ist und damit das resultierende s/n ebenfalls groß ist, was zu einer kleinen Nachweisgrenze führt. Die Schwankungen von bis zu 50 % der mittleren NWG aus den chromatographischen Darstellungen zeigen die potentiellen Schwierigkeiten bei der Ermittlung der Rauschintensität, die manuell als ungefähres Mittel je Aufnahme abgelesen und für die Berechnungen verwendet wurde. Die Intensitäten der detektierten Ionen in den Wiederholmessungen wiesen nur geringe Schwankungen auf, wodurch die Genauigkeit der Rauschintensität bei der NWG-Berechnung an Bedeutung gewann. Schwankungen bis zu 67 % der mittleren Nachweisgrenze bei der Ermittlung aus den Spektren wiesen auf eine noch erhöhte Problematik bezüglich des Ablesens der Rauschintensität hin. Auch hier wurde das Rauschen als mittlerer Wert beidseitig um den intensivsten Ladungszustand abgelesen.

2.3.2 8-Proteinstandard-Mischung

Die ermittelten TICs und BPCs von drei Parallelmessungen des Standards sind in Abbildung 41 dargestellt, Abbildung 42 zeigt die Spektren und Dekonvolutionsspektren der 8-Proteinstandard-Mischung.

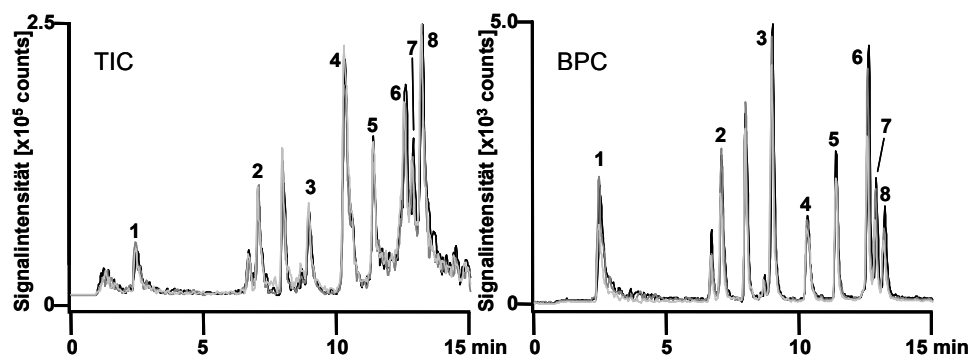


Abbildung 41: Chromatogramme von 3 Injektionen der 8-Proteinstandard-Mischung; TIC (links) und BPC (rechts), annotiert sind die zugeordneten Peaks (vgl. Abbildung 42)

Anhand der überlagerten Chromatogramme konnte auch in diesem Fall schon graphisch auf eine gute Reproduzierbarkeit der Trennung geschlossen werden. Um diesen Eindruck abzusichern, wurden die 10 Messungen zur Erstellung von Retentionsmittelwerten benutzt. Außerdem wurde anhand dieser Analysen die Massengenauigkeit der TOF-MS-Methode bestimmt, indem die gemessenen Massen bzw. intensivsten Ionen pro Protein mit theoretischen Massen korreliert wurden.

Abbildung 42 zeigt die gemessenen Spektren und Dekonvolutionsspektren der untersuchten 8-Proteinstandard-Mischung in der Elutionsreihenfolge wie in Abbildung 41 annotiert. Über die Abweichungen der Retentionszeiten und der gemessenen Massen gibt Tabelle 15 Aufschluss.

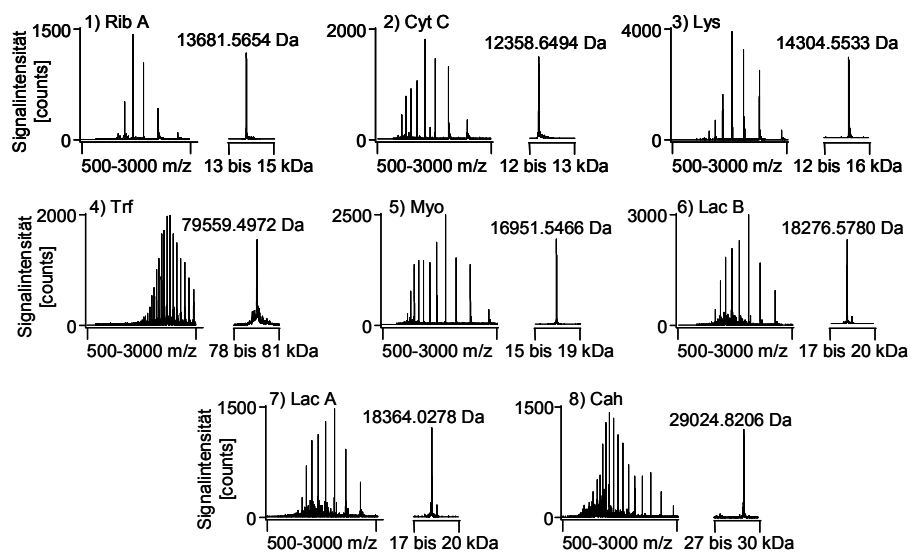


Abbildung 42: Spektren und Dekonvolutionsspektren der 8 Proteine aus der 8-Proteinstandard-Mischung

Tabelle 15: 10fache Messung der 8-Protein-Standardmischung; Abweichungen der Retentionszeit und Massen der Proteine; jeweils gemitteltetes Ergebnis der 10 Messungen \pm Vertrauensbereich für P = 95 % (relative Standardabweichung)

Protein	Retentionszeit in min	Massenabweichung des intensivsten Ions in Da // ppm	Massenabweichung der Dekonvolutionsmasse in Da // ppm
Ribonuklease A	2.5 \pm 0.28 (4.9 %)	-0.06 \pm 0.027 // -35.8 \pm 15.54	-0.4 \pm 0.93 // -28.5 \pm 68.19
Cytochrom C	7.0 \pm 0.22 (1.4 %)	-0.15 \pm 0.021 // -97.6 \pm 30.31	-1.2 \pm 0.76 // -97.8 \pm 61.11
Lysozym	9.0 \pm 0.22 (1.1 %)	-0.03 \pm 0.057 // -18.5 \pm 21.78	-0.3 \pm 0.78 // -24.2 \pm 54.23
Transferrin	10.3 \pm 0.22 (0.8 %)	-1.09 \pm 0.106 // -459.6 \pm 54.27	-35.6 \pm 5.34 // -447.6 \pm 67.07
Myoglobin	11.4 \pm 0.21 (0.8 %)	-0.01 \pm 0.043 // -6.6 \pm 21.29	-0.1 \pm 0.82 // 3.7 \pm 48.23
β -Lactoglobulin B	12.6 \pm 0.18 (0.6 %)	0.01 \pm 0.043 // -6.6 \pm 21.29	-0.2 \pm 1.11 // -9.8 \pm 60.88
β -Lactoglobulin A	12.9 \pm 0.18 (0.6 %)	-0.17 \pm 0.095 // -84.0 \pm 46.54	-1.0 \pm 0.40 // -54.3 \pm 21.72
Carboanhydrase	13.2 \pm 0.18 (0.6 %)	0.14 \pm 0.045 // 91.7 \pm 29.49	2.5 \pm 1.74 // 87.5 \pm 59.94

Aus Abbildung 43 geht die Retentionsabweichung nochmals graphisch hervor, hierfür wurden erneut die Mittelwerte der Retentionszeiten von den Einzelretentionszeiten subtrahiert und diese Ergebnisse gegen die Injektionsnummer aufgetragen.

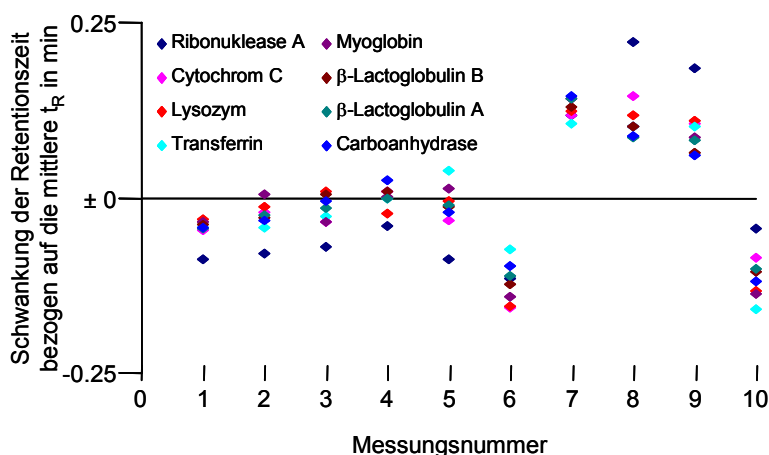


Abbildung 43: Retentionsverschiebung der 8-Proteinstandard-Mischung, Schwankungstrend

Die Retentionszeiten bei 10facher Injektion der Proteine schwankten um etwa 0.2 min, mit Ausnahme von Ribonuklease A, dessen Retentionsschwankung bei etwa 0.3 min lag. Die Abweichungen der Massen des intensivsten Ions und der Dekonvolutionsmassen waren mit unter 100 ppm als nutzbar zu betrachten und die Massengenauigkeit war somit noch zufrieden stellend. Die höhere Abweichung im Falle des Transferrins ergab sich aus der nicht exakten theoretischen Masse, da die genaue Glycan-Zusammensetzung des Standards unbekannt war und somit nicht in die Berechnung der theoretischen Masse einbezogen werden konnte. In Tabelle 16 sind die Nachweisgrenzen der einzelnen Proteine aus der 10fachen Untersuchung der Standardmischung anhand der drei beschriebenen Auswertungsmöglichkeiten aufgeführt:

Tabelle 16: Nachweisgrenzen (NWG) der 11 Standardproteine berechnet aus dem TIC, dem BPC und dem intensivsten Ladungszustand des jeweiligen Spektrums; jeweils gemittelttes Ergebnis der 10 Messungen \pm Vertrauensbereich für P = 95 %

Protein	NGW in fmol TIC	NGW in fmol BPC	NGW in fmol Spektrum
Ribonuklease A	409.0 \pm 189.96	65.6 \pm 148.22	90.4 \pm 40.67
Cytochrom C	43.4 \pm 16.58	46.4 \pm 21.89	13.0 \pm 8.59
Lysozym	80.9 \pm 45.25	38.4 \pm 14.14	16.3 \pm 2.82
Transferrin	15.6 \pm 6.94	69.5 \pm 30.19	24.8 \pm 13.23
Myoglobin	36.6 \pm 14.50	50.2 \pm 17.11	17.5 \pm 16.31
β-Lactoglobulin B	22.4 \pm 9.03	29.3 \pm 11.46	10.2 \pm 5.88
β-Lactoglobulin A	21.2 \pm 8.83	38.5 \pm 16.03	13.6 \pm 3.46
Carboanhydrase	18.9 \pm 6.98	94.3 \pm 41.26	43.9 \pm 20.61

Es zeigte sich auch hier, dass die aus den Spektren berechneten Nachweisgrenzen die geringsten Werte aufwiesen. Die Abhängigkeit der chromatographischen Nachweisgrenzen von der Verteilung der Ladungszustände im Spektrum zeigte sich hier besonders an den Beispielen Transferrin und Carboanhydrase, die mit ihren sehr breiten Verteilungen (vgl. Abbildung 42) merklich geringere NWGs anhand des TIC gegenüber dem BPC aufwiesen. Auch bei diesen Berechnungen traten erneut Schwankungen von bis zu 50 % des Mittelwertes auf (bzw. > 200 % bei Ribonuklease A anhand des BPC's). Diese Tatsache kann erneut mit der Ermittlung der Rauschintensität begründet werden, da auch innerhalb dieser

Wiederholmessungen vergleichbare Intensitäten der Ladungsverteilungen erhalten wurden.

2.4 Massenstabilität

Nachdem sowohl chromatographisch gute Reproduzierbarkeiten von Retention als auch massenspektrometrisch eine gute Massengenauigkeit ermittelt wurde, musste noch eine Aussage über die Massenstabilität getroffen werden. Vor allem in Hinblick auf Serienmessungen galt es herauszufinden, wie lang die Massenkalisierung des Gerätes mit der ermittelten Genauigkeit arbeitet ohne rekaliert werden zu müssen. Da die Raumtemperatur einen großen Einfluss auf die Kalibrierung besitzt, wurde parallel zur Messung von Proteinstandard-Mischungen die umgebende Temperatur ermittelt und deren Schwankung in Relation zur Massenabweichung des intensivsten Ions im Lysozym-Spektrum aufgetragen. Die Proteinstandard-Messungen erfolgten durch Injektion der 10-Proteinstandard-Mischung aus Kapitel 2.2 unter Verwendung der unter Kapitel 2.3 beschriebenen Trenn- und TOF-MS-Methoden. Die Injektionen erfolgten im Abstand von 30 min, somit erfolgte die Messwertermittlung auch im Abstand von 30 min. Abbildung 44 zeigt die Relation zwischen Raumtemperatur und Masse bei 50facher Messung der 10-Proteinstandard-Mischung. Außerdem diente diese Untersuchung gleichermaßen der erwähnten Studie und der Überprüfung der verwendeten Klimaanlage.

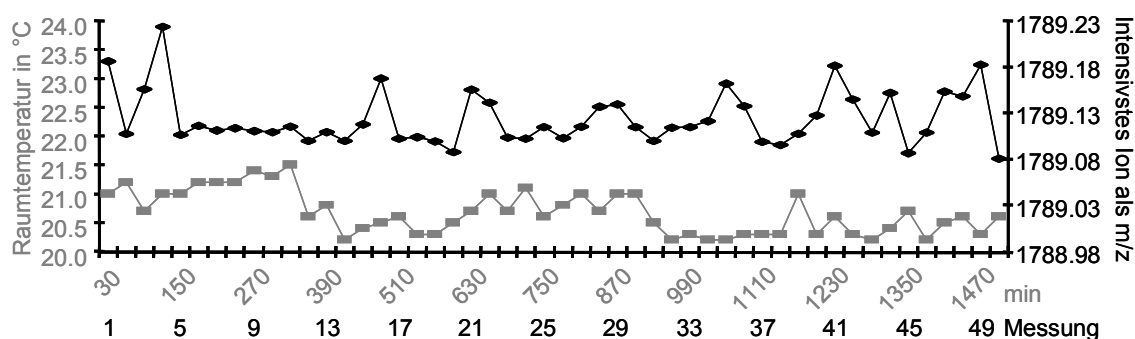


Abbildung 44: Massenstabilität in Abhängigkeit von der Raumtemperatur; hell: Temperaturverlauf, gemessen alle 30 min; dunkel: gemessene Masse des 8fach positiv geladenen Ions von Lysozym, gemessen im Summenspektrum des Lysozympeaks einer 30 min-Trennmethode der 10-Proteinstandard-Mischung, angegeben ist die Messungsnummer

Aufgrund der geringen Temperaturschwankungen über die Zeit von nicht einmal 2°C konnte die Leistung der Klimaanlage als stabil interpretiert werden. Außerdem konnte keine Verbindung zwischen der Temperatur und der gemessenen Masse ermittelt werden. Trendlose Schwankung der Ionenmasse von 0.15 Da bei 50facher Messung weist auf eine gute Massengenauigkeit hin. Durch tägliche Prüfung der Proteinmassen der 10-Proteinstandard-Mischung zeigte sich, dass eine wöchentliche Kalibrierung durchaus ausreichend war, um eine gute Massengenauigkeit gewährleisten zu können.

3 Entwicklung und Optimierung einer Methodik zur Proteinanalyse mittels mikro-HPLC-Ionenfallen-MS

Auch zur Analyse mittels Ionenfallen-MS mussten verschiedene Instrumentenparameter auf die Analyten hin optimiert werden. Die Parameter des Ionenfallen-Massenspektrometers wurden mittels Direktinfusion von Standardproteinen optimiert. Es wurden ein mikro-HPLC-System (ohne und mit Analyt-*Trapping*) mit manuellem Split aufgesetzt und anhand der Trennung von Proteinstandmischungen getestet. Nach Kopplung mit der MS wurde die Methode auf Reproduzierbarkeit der Retention und Massenstabilität und -genauigkeit überprüft.

3.1 Optimierung der massenspektrometrischen Parameter

Die Kalibrierung der Ionenfallen- und Detektorparameter erfolgte wie durch den Hersteller vorgegeben (Kalibrierungsmasse) mit Koffein (195.1 Da), MRFA (Tetrapeptid Met-Arg-Phe-Ala, 524.4 Da) und Ultramark ($C_{18+2x}H_{19}O_6N_3P_3F_{24+4x}$ ($x=1$ bis 11) Kalibriermassen: 1522.0, 1622.0 und 1822.0 Da). Eine Massenkalisierung mit anderen Analyten war von Herstellerseite bei dem verwendeten Ionenfallen-MS LTQ-XL nicht vorgesehen und daher nicht durchführbar. Die Parameter der Ionenquelle und der Ionenoptik wurden durch die Verwendung von verschiedenen Proteinen mittels Direktinfusion optimiert. Da dieses Tuning des Massenspektrometers das Gelingen der Analytik stark beeinflusst, wird im folgenden Kapitel detailliert darauf eingegangen.

Im Fall des LTQ-XL wurden vor allem die Einstellungen der Elektrosprayionisation und der Ionenoptik auf die Proteinanalytik angepasst. Für die Einstellung der ESI-Quelle sind die Stellung der Spraykapillare, die bei der verwendeten Ionenquelle mittels Schrauben dreidimensional verändert werden kann, sowie die Verwendung von Stickstoff als Sprühgas und die Stärke der Kapillarspannung sowie aus dem Bereich der Ionenoptik die Temperatur der beheizten Kapillare ausschlaggebende Optimierungsparameter, die einer manuellen Einstellung bedürfen. Das Tuning der Ionenoptik erfolgte im Gegensatz zur Optimierung der Ionenquellenparameter

automatisch und semi-automatisch mit Hilfe der Tune-Page der Steuerungssoftware XCalibur.

3.1.1 Optimierung der Ionisierungsparameter

Zur Optimierung der Sprayeinstellungen wurden ein Standard mit 325 fmol Lysozym je μL Lösungsmittel (20 % Acetonitril in 0.05 % wässriger Trifluoressigsäure-Lösung) mit konstantem Fluss von 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ direkt injiziert und die Intensitäten der so erhaltenen Ladungszustände betrachtet. Die maximale Injektionszeit der Ionenfalle wurde auf 200 ms und das Füllvolumen (AGC Target) auf 30,000 Ionen pro Microscan eingestellt, was nahezu den Standardeinstellungen und für die Ionenfalle und die Detektoren schonenden Parametern entspricht. Aus jeweils drei Microscans wurde ein Spektrum durch Aufsummierung gebildet, welches einem abgebildeten Messpunkt entspricht.

Durch Verkleinerung oder Vergrößerung des Abstandes des Spraykapillarauslasses und der beheizten Kapillare des Massenspektrometers sowie durch Verschiebung des Sprayers nach links oder rechts relativ zur beheizten Kapillare wurde die optimale Sprayposition ermittelt. Diese sollte maximale Intensität der Ladungszustände des Lysozyms und minimale sowie gleich bleibende Injektionszeit (IT, *injection time*) bezüglich der Füllung der Ionenfalle aufweisen.

Als Spraykapillare wurde in Hinblick auf die anschließende Kopplung mit der HPLC eine Fused Silica Kapillare mit 20 μm Innen- und 90 μm Außendurchmesser verwendet, um einer Bandenverbreiterung durch Volumensvergrößerung vorzubeugen und eine einheitliche Verneblung am Kapillarauslass zu unterstützen. An der Sprayauslass-Seite wurde die Kapillare mittels heißer Schwefelsäure von der äußeren Polyimidschicht befreit, dadurch wurden sowohl das Quellen der Beschichtung durch Lösungsmiteleinfluss als auch die Gefahr von Verunreinigungen durch Zersetzen des Polyimids und daraus resultierende Kontamination des Massenspektrometers verhindert. Nach dem Einsetzen in die Ionenquelle wurde die Spraykapillare über eine weitere Fused Silica Kapillare (360x50 μm i.D.) mit einer 500 μL Spritze von Hamilton für die Direktinfusion von Tuning-Substanzen verbunden. Der Aufbau des beschriebenen Sprayers ist in Abbildung 45 skizziert.

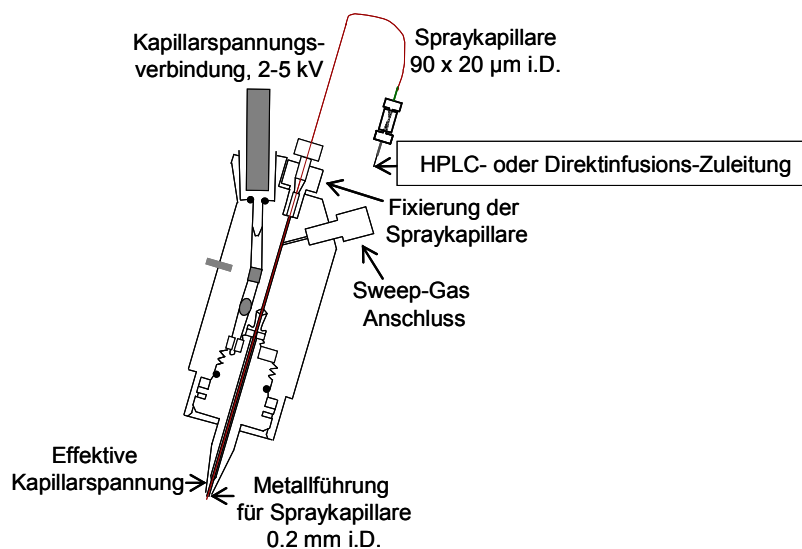


Abbildung 45: Schematische Darstellung des Sprayers

Die genaue Stellung der Fused Silika Spraykapillare innerhalb des Sprayergehäuses konnte wegen der kleinen Kapillardimensionen nur schlecht eingestellt werden. Daher wurde eine kleine Modifikation des Sprayers vorgenommen, indem die 1 cm lange $\frac{1}{4}$ Zoll-Peekverschraubung zur Fixierung der Spraykapillare um 0,5 cm verlängert wurde. Die Fixierung erfolgte nun nicht mehr durch Festdrehen der Schraube im Sprayergehäuse sondern durch Feststellen mit zwei zusätzlichen Schraubmuttern mit einer Stärke von jeweils 2 mm. Den Aufbau dieses Sprayers zeigt Abbildung 46. Eine 360°-Drehung der beschriebenen Einstellschraube führt zu einer Verschiebung der Kapillarposition um 1 mm entweder aus dem Gehäuse heraus (Rechtsdrehung) oder in das Gehäuse hinein (Linksrotation).

Diese Modifikation erwies sich als sehr nützlich, da nicht nur die Position des Sprayergehäuses sondern auch die Auslassposition der Kapillare einen großen Einfluss auf die Ionisierung der Analyten zeigte. Ausgehend von einem genauen Abschluss der Spraykapillare an der Metallführung des Gehäuses wies auch nach mehrfachem Wechsel der Kapillare eine Schraubdrehung um 120° im Uhrzeigersinn stabile und reproduzierbare Ionenströme auf. Somit wurde die Position des Kapillarauslasses auf eine Kapillarlänge von 0,33 mm außerhalb der Metallführung optimiert und für alle weiteren Untersuchungen eingestellt.

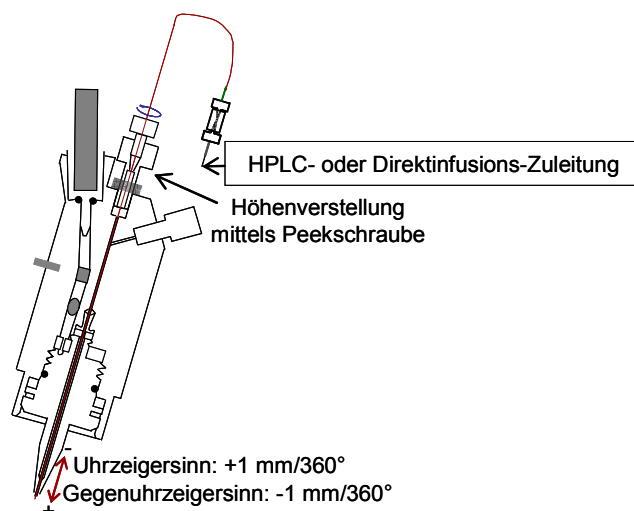


Abbildung 46: Modifizierter Sprayer für genauere Einstellung der Kapillarposition

Für die weiteren Positionseinstellungen des Sprayers (Sprayergehäuse relativ zur Öffnung der beheizten Kapillare) wurden die folgenden Parameter definiert:

Höhe (z-Richtung, Ringdefinition am Sprayergehäuse):	B, mittig
Nähe (y-Richtung, Mikrometerschraube an der Quelle):	0.06 Skt
Verschiebung (x-Richtung, grob skalierte Schraube an der Quelle):	mittig

Um einer ungewollten Fragmentierung der Analyten vorzubeugen wurden sowohl für die Sprayspannung als auch für die Temperatur der beheizten Kapillare keine extremen Werte eingestellt. Die Spannung betrug vor der Sprayoptimierung 2.8 kV und die Temperatur war eingestellt auf 320°C, nach der Optimierung blieb die Sprayspannung bei 2.8 kV und die Temperatur wurde auf 290°C gesenkt.

Zur Unterstützung der Verneblung wurde Stickstoff als Sprüh- und Hilfsgas (sheath und auxiliary gas) verwendet. Das Sprühgas tritt die Spraykapillare umgebend aus der inneren Metallführung des Sprayers heraus, das Hilfsgas strömt entlang der Sprayerspitze und stabilisiert den gebildeten Flüssigkeits- bzw. generierten Ionennebel, wie in Abbildung 47 schematisch gezeigt wird. Beide Gasflüsse wurden gegenseitig angepasst bis ein stabiles Spray mit maximaler Intensität der Ladungszustände des versprühten Analyten massenspektrometrisch gemessen wurde. Gasflüsse von 27 arb (beliebige Einheit, engl.: *arbitrary unit*) für das Sprühgas und 16 arb für das Hilfsgas zeigten hierbei eine stabile Verneblung und gleich bleibende Injektionszeit. Die optimierten Parameter der Ionenquelle sind in Tabelle 17 nochmals aufgelistet.

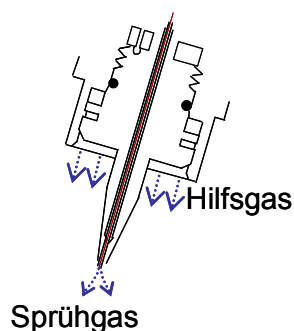


Abbildung 47: Gasauslass am Sprayergehäuse

Tabelle 17: Optimierte Ionenquellenparameter

Sprayspannung	2.8 kV	Kapillarlänge	0.33 mm
Sprühgas	27 arb	Sprayer z-Richtung	B-Ring mittig
Hilfsgas	16 arb	Sprayer y-Richtung	0.06 Skt
Kapillartemperatur	290°C	Sprayer x-Richtung	mittig

3.1.2 Optimierung der Ionenoptik-Parameter und Prüfung der Einstellungen

Anschließend an die Spray-Optimierung wurden die Parameter der Ionenoptik automatisch auf den 9-fach positiven Ladungszustand des Lysozyms optimiert. Dadurch wurden die in Tabelle 18 erhaltenen Spannungen ermittelt, mit denen Lysozym wie in Abbildung 48 gezeigt dargestellt wurde.

Tabelle 18: Optimierte Parameter der Ionenoptik

Kapillarspannung	33.0 V	Tube Lens	85.2 V
Multipole 00 offset	-1.8 V	Multipole RF	400 Vp-p
Lens 0	-9.5 V	Front Lens	-7.8 V
Multipole 0 offset	-11.6 V	Front Section offset	-9.0 V
Lens 1	-36.8 V	Center Section offset	-12.0 V
Gate Lens	-57.7 V	Back Section offset	-7.0 V
Multipole 1 offset	-18.0 V	Back Lens	0.0 V

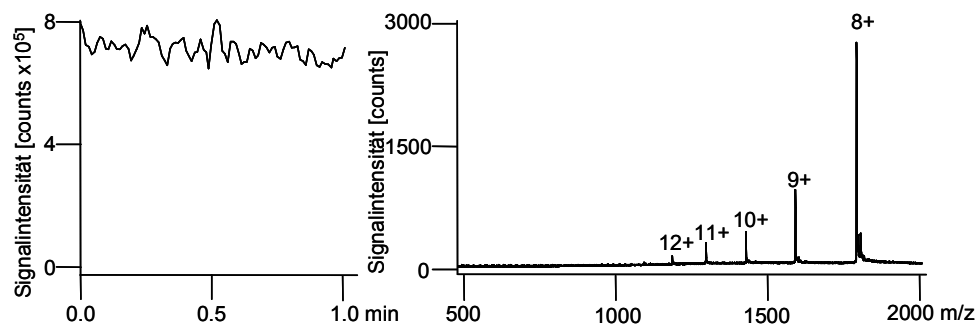


Abbildung 48: Ionenstrom (links) und summiertes Spektrum (rechts) von 1 min Direktinfusion (96 Scans) bei 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ von 280 $\text{fmol}/\mu\text{L}$ (entspricht 4 $\text{ng}/\mu\text{L}$) Lysozym in 20 % Acetonitril mit 0.05 % wässriger TFA nach Optimierung aller massenspektrometrischen Parameter unter Verwendung des Ladungszustandes 9+ des Lysozyms

In Abbildung 48 ist links der Totalionenstrom von einer Direktinfusionsmessung des Lysozyms in 1 min abgebildet. Es zeigte sich hierbei ein nicht ganz optimales aber für weitere Untersuchungen des Tunings vertretbares Sprayverhalten. Die Injektionszeit (it) der Ionenfalle wies einen einheitlichen Wert um die 10 ms auf. Des Weiteren ist in Abbildung 48 das durch Aufsummieren der in 1 min gemessenen Einzelspektren entstandene Summenspektrum des Lysozyms gezeigt. Die Darstellung dieses Proteins mit den verwendeten MS-Parametern wies typische Ladungszustände im höheren Massenbereich mit guter Intensität auf.

Neben Lysozym sollten auch weitere Proteine mit den optimierten Einstellungen nachweisbar bzw. darstellbar sein. Als weitere Testproteine mittels Direktinfusion wurden Ribonuklease A, Cytochrom C und Carboanhydrase gewählt, die erhaltenen aufsummierten Spektren der Direktinfusionsmessungen (jeweils 1 min) sind in Abbildung 49 dargestellt. Die Darstellbarkeit von Ribonuklease A und Cytochrom C war zufrieden stellend. Es konnten mehrere charakteristische Ladungszustände im Bereich von 1000 m/z bis 2000 m/z detektiert werden. Eine Dekonvolution dieser Spektren und damit Ermittlung der intakten Proteinmasse stellte für diese Proteine keine Schwierigkeit dar. Im Fall der Carboanhydrase wurde ein deutlich schlechteres Spektrum erhalten. Es fielen zwei Ladungszustände auf, die intensiver waren als die zuordbare Ladungsverteilung des eigentlichen Analyten. Da mittels Direktinfusion keine Trennung bzw. Reinigung von Substanzen erfolgt, konnte davon ausgegangen werden, dass weitere Substanzen oder ggf. Zerfallsprodukte der Carboanhydrase in dem verwendeten Standard vorlagen, der die Detektion dieses Proteins beeinflusste.

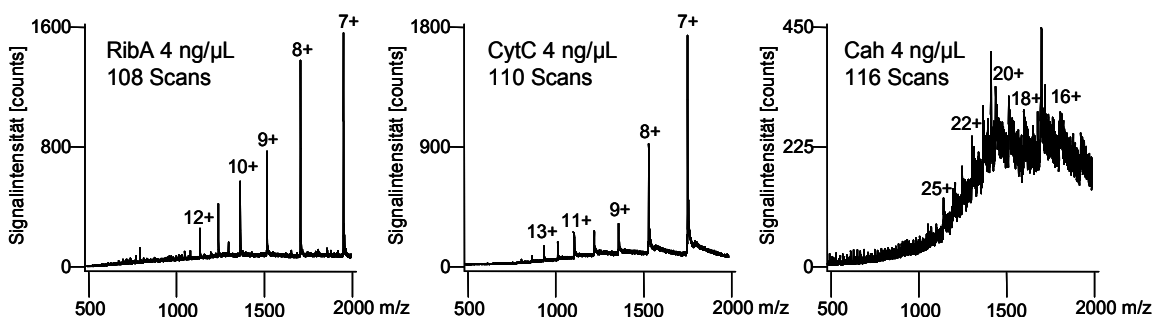


Abbildung 49: summierte Spektren (ca. 110 Scans) von jeweils 1 min Direktinfusion bei 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ von Ribonuklease A (RibA), Cytochrom C (CytC) und Carboanhydrase (Cah) in 20 % Acetonitril mit 0.05 % wässriger TFA

Anhand des aufsummierten Lysozym-Spektrums (1 min) wurde die Nachweisgrenze für das Protein berechnet. Die untersuchte Lysozym-Lösung in 20 % Acetonitril mit 0.05 % TFA hatte eine Konzentration von 280 $\text{fmol}/\mu\text{L}$ und erzeugte ein Signal-zu-Rauschen von 46. Bezogen auf die Konzentration berechnete sich die Nachweisgrenze zu 18 $\text{fmol}/\mu\text{L}$.

3.2 Etablierung eines mikro-HPLC-Systems zur Trennung intakter Proteine

Da für die Kopplung mit dem LTQ-XL kein kommerzielles mikro-HPLC-System zur Verfügung stand, wurde eine analytische Pumpe mit Mikropumpenköpfen mittels Flussteilung zu einem mikro-HPLC-System umgebaut und mit dem LTQ-XL gekoppelt.

3.2.1 Flussteilung an der Rheos 2000 Zweikanal Gradientenpumpe

Als stationäre Phase wurde eine monolithische Poly(Styrol-Divinylbenzol)-Kapillarsäule mit den Maßen 50x0.2 mm i.D benutzt. Die benötigte Flussrate wurde durch einfache Flussteilung an der Pumpe noch vor der Probenaufgabe erreicht. Der erzeugte Gegendruck eines solchen Systems ist bei dieser Teilungstechnik hauptsächlich von der zur Teilung verwendeten Kapillare abhängig. Die Einstellung des Säulenflusses erfolgte durch die Verwendung einer Splitkapillarlänge, die einen für die verwendete Pumpe akzeptablen Gegendruck bei realistischen

Hauptflussraten lieferte: Fused Silika, 50 µm Innendurchmesser, 360 µm Außendurchmesser, 75 cm Länge. Anschließend wurde durch Messung des Säulenflusses und Regulierung des Hauptflusses eine Flussrate über die Säule von 2 µL/min eingestellt. Somit ergab sich für einen Säulenfluss von 2 µL/min ein Hauptfluss von 176 µL/min bei einem Druckabfall von 102 bar für das System. Als Eluent für die Flussmessung wurden 20 % wässriges Acetonitril mit Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure als Ionenpaarreagenz eingesetzt, da dies die Anfangszusammensetzung des zur Proteintrennung benötigten Gradienten ist.

Als Probenaufgabe wurde das 6-Wege-Ventil des LTQ-XL verwendet, indem die Injektionsschleife von 1 µL an den Positionen 2 und 5, die Pumpenzuleitung an Position 3 und die Weiterleitung zur Säule an Position 4 eingerichtet wurde. Auf Position 6 wurde eine Spritzenhalterung für die manuelle Injektion mittels Mikroliterspritze eingeschraubt. Überschüssiges Injektionsvolumen wurde über Position 1 dem Abfall zugeführt. Das Beladen der Injektionsschleife konnte somit in 1_2-Position des Ventils und die Injektion in 6_1-Position des Ventils erfolgen, was durch Knopfdruck am Gehäuse des Massenspektrometers oder durch elektronische Steuerung über die XCalibur-Software durchführbar war. Abbildung 50 zeigt schematisch das beschriebene Trennsystem.

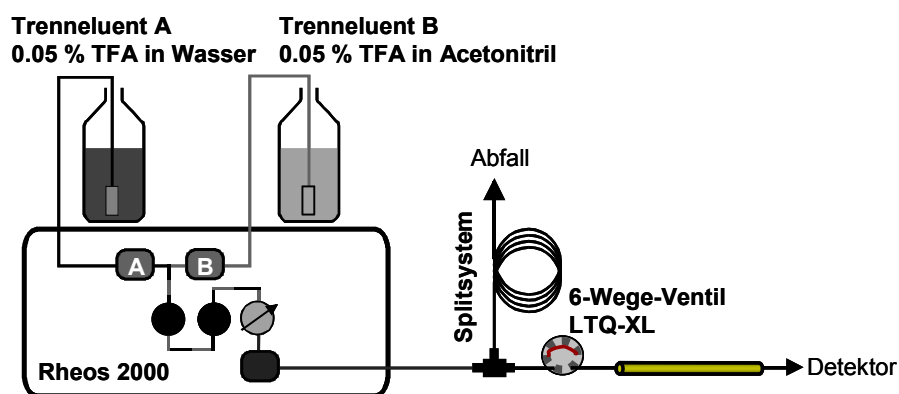


Abbildung 50: Schematischer Aufbau des Rheos-HPLC-Trennsystems mit manueller Injektion

Alle verwendeten Zuleitungen aus Fused Silika-Kapillaren, die nach dem Passieren der Säule von den Analyten und dem Lösungsmittel durchquert wurden, hatten einen Innendurchmesser von 20 µm und einen Außendurchmesser von 360 µm. Als Detektion wurde zunächst die UV-Photometrie gekoppelt. Der Gradientstart der Rheospumpe wurde durch manuelle Eingabe ausgelöst. Mit einer nicht konstanten

Zeitverzögerung wurde anschließend die UV-Detektion bei 214 nm gestartet. Die Datenaufnahme der UV-Messungen erfolgte mit Chromeleon. Ebenfalls manuell erfolgte daraufhin die Injektion der Probe durch Schaltung des am LTQ-XL befindlichen 6-Wege- bzw. in dieser Anordnung Injektions-Ventils. Es wurden 20-50 % Acetonitril in 0.05 % wässriger Trifluoressigsäurelösung als linearer Gradient mit einem Säulenfluss von 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ gewählt. Die Injektion erfolgte im Full-Loop-Modus, so dass genau das Schleifenvolumen (1 μL) auf die Säule aufgegeben wurde. Da die Temperatur der stationären Phase einen großen Einfluss auf die Trennung von Analyten hat, wurde die Säule mittels eines Säulenofens auf 50°C temperiert. Zur Prüfung des Systems wurde zunächst eine Proteinmischung aus 10 Standardproteinen mittels IP-RP-mikro-HPLC getrennt und bei 214 nm UV-photometrisch detektiert.

In Abbildung 51 ist das UV-Chromatogramm dieser Trennung dargestellt. Es konnten alle 10 Proteine mit guter Trennung nachgewiesen werden, selbst die β -Lactoglobuline B und A, die auf Grund ihrer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz nur schwer zu trennen sind und daher als kritisches Peakpaar auf Seiten der Chromatographie zu betrachten sind ^[5]. Die Konzentrationen der in 0.05 % wässriger TFA gelösten Proteine sowie die Retentionsreihenfolge sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Mit diesem Flussteilungssystem konnte die Kopplung mit dem Massenspektrometer durchgeführt werden.

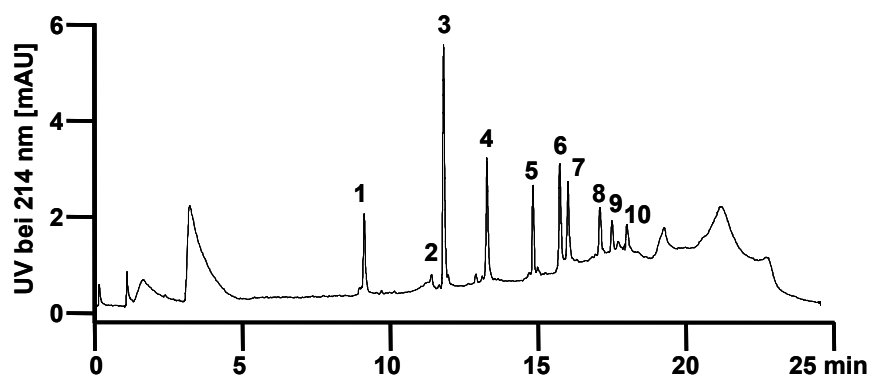


Abbildung 51: UV-Chromatogramm bei 214 nm einer 10-Proteinstandard-Mischung, Gradient: 20-50 % ACN in wässriger TFA in 15 min, 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$, 50°C, PS/DVB monolithische Säule 50x0.2 mm Innendurchmesser; 1 μL Injektionsvolumen

Tabelle 19: Zusammensetzung und Elutionsreihenfolge des 10-Protein-Standards

<i>Elutionsreihenfolge</i>	Protein	Konzentration in fmol/ μ L	Konzentration in ng/ μ L
1	Ribonuklease A	1580	21.62
2	Cytochrom C	353	4.36
3	Insulin	1073	6.23
4	Lysozym	477	6.82
5	α-Lactalbumin	295	4.18
6	Myoglobin	324	5.50
7	Hämoglobin a	350	5.58
8	β-Lactoglobulin B	301	5.50
9	β-Lactoglobulin A	208	3.82
10	Hämoglobin b	350	5.27

3.2.2 Aufrüstung zum System mit Vorkonzentrierung

Bei dem zuvor in Kapitel 3.2.1 vorgestellten Trennsystem konnte die Injektion von Proben nur manuell erfolgen, da kein mikro-Probengeber zur Verfügung stand. Eine vollständige Automatisierung war in diesem Stadium also nicht durchführbar. Bei der Aufrüstung zum Trap-System konnte ein Probengeber angeschlossen werden, da nun das große Leitungsvolumen durch die erhöhte Flussrate bei der Beladung der Trapsäule kompensiert werden konnte. Es wurden eine Accela UPLC-Pumpe als Beladungspumpe und ein Accela Autosampler als Injektionseinheit über ein externes 10-Wegeventil mit dem bestehenden Trennsystem gekoppelt. Dieses Trennsystem ist in Abbildung 52 schematisch skizziert.

Auch die Steuerung dieses gesamten Systems wurde über die Software XCalibur gewährleistet. Hierzu wurde die Rheospumpe als „Pump 2“ konfiguriert und konnte durch den Probengeber ein Startsignal empfangen (Aktivierung des Kanals „DigitIn2“). Dies galt für die Accela-Pumpe, die als „Pump 1“ definiert wurde, entsprechend (Aktivierung über die Einstellung „Surveyor AS injection logic“). Das 10-Wege-Ventil wurde mittels Kurzschlussverfahren ebenfalls durch den Probengeber zum Umschalten in die entsprechende Position gestellt. Hierzu wurden dem Autosampler die entsprechenden „on“/„off“-Befehle zu den gewählten Zeiten als

„Timed Events“ TF1 und TF2 eingegeben. TF2-on schaltete das Ventil in Position 1_2, wie es für die Beladung vorgesehen war, und TF1-on schaltete das Ventil zurück in die 10_1-Position. Welche Position die Beladung bzw. die Elution bedingt, ist von der Belegung der Ventilkonäle abhängig.

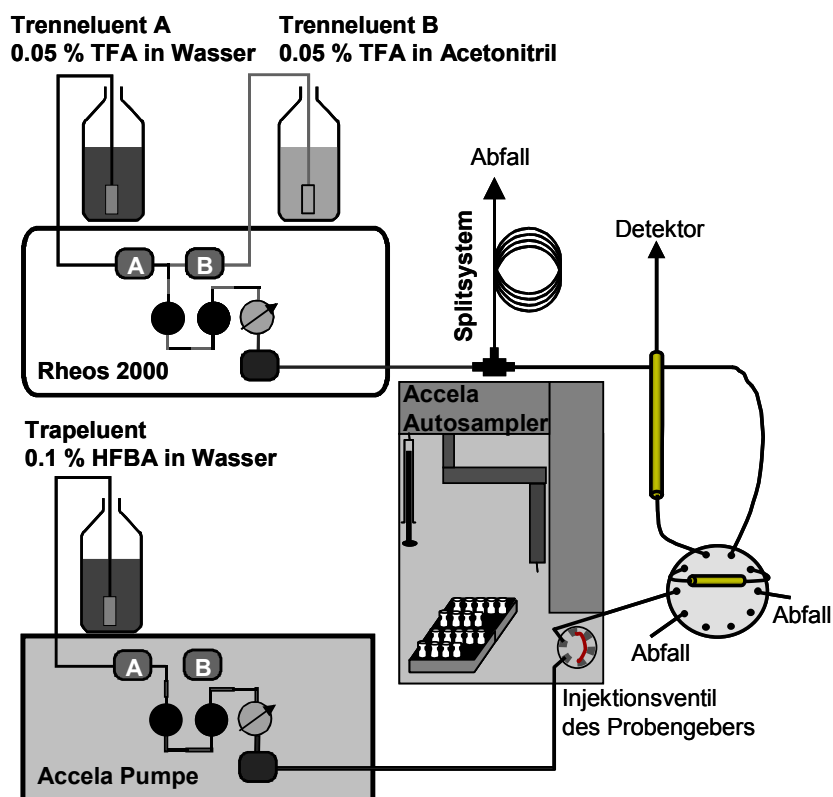


Abbildung 52: Schematische Darstellung des online gekoppelten HPLC-Trap-Systems mit Trenn- (Rheos 2000) und Beladungspumpe (Accela Pumpe), Splitsystem, automatischem Probengeber (Accela Autosampler) und 10-Wege-Schaltventil

Nach Kopplung an das Massenspektrometer mit den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Parametern wurden verschiedene Proteinmischungen mit dem 2D-System wie beschrieben getrennt und mittels Massenspektrometrie detektiert.

3.2.3 Kopplung der mikro-HPLC- und MS-Methoden

Es wurde eine mikro-HPLC-MS-Analyse einer Mischung von 10 Standardproteinen mit dem unter 3.2.1 vorgestellten IP-RP-mikro-HPLC-System und den in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Parametern als MS-Methode durch Kopplung des Säulenausgangs

mit der Spraykapillare über eine Fused Silika Kapillare mit 360 µm Außen- und 20 µm Innendurchmesser durchgeführt. Die erhaltenen Chromatogramme als Totalionenstrom und nur unter Betrachtung des Basispeaks sind in Abbildung 53 gezeigt. Die Konzentrationen der einzelnen Proteine innerhalb des Standards wurden bereits in Tabelle 19 dargestellt. Es wurden erneut 20-50 % Acetonitril in 0.05 % wässriger Trifluoressigsäurelösung als linearer Gradient mit einem Säulenfluss von 2 µL/min gewählt. Das Injektionsvolumen war 1 µL, die Säule wurde mit einem Säulenofen auf 50°C temperiert.

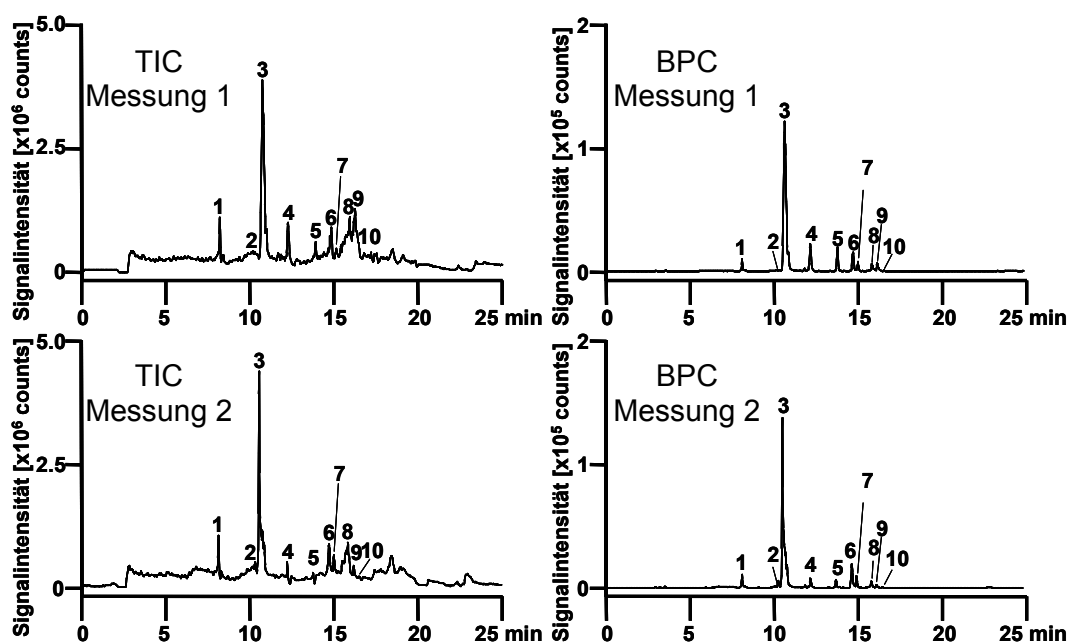


Abbildung 53: Totalionenstrom- (TIC) und Basispeakchromatogramme (BPC) von zwei Trennungen der 10-Proteinstandard-Mischung; Gradient: 20-50 % ACN in wässriger TFA in 15 min, 2.0 µL/min, 50°C, PS/DVB monolithische Säule 50x0.2 mm Innendurchmesser; 1 µL Injektionsvolumen; Elutionsreihenfolge vgl. Tabelle 19

Anhand der in Abbildung 53 gezeigten Chromatogramme war ersichtlich, dass der Nachweis von Standardproteinen bereits mit diesen Methoden für die Trennung und Detektion möglich war. Die Darstellbarkeit der einzelnen Substanzen innerhalb der Chromatogramme war jedoch nicht so deutlich bzw. intensiv, wie dies bei den eingesetzten Konzentrationen hätte der Fall sein sollen mit Ausnahme von Insulin als kleinstem Protein, welches mit der höchsten Intensität den deutlichsten Peak bildete. Für Lysozym wurde durch Summierung der Spektren des Peaks (16 Messpunkte) ein Signal-zu-Rauschen-Wert von 435 ermittelt bei Betrachtung des intensivsten

Ladungszustandes. Bezogen auf die analysierte Menge von 477 fmol des Proteins konnte eine Nachweisgrenze von 3.3 fmol/ μ L berechnet werden. Für Cytochrom C ergab sich durch denselben Vorgang (41 Messpunkte) ein Signal-zu-Rauschen von 21 und somit eine Nachweisgrenze von 50.4 fmol/ μ L, was für dieses Protein aufgrund seiner guten Ionisierbarkeit und massenspektrometrischen Detektierbarkeit mindestens um Faktor 5 zu hoch war.

Die Trennung konnte nicht durch mehrfache Injektion aus derselben Probe reproduziert werden. Eine Verschiebung der Retentionszeiten war nicht zu beobachten, wonach die chromatographische Methode als robust erkannt werden konnte. Es gab jedoch sehr starke Unterschiede im Bereich der massenspektrometrischen Detektion. Sowohl die Intensitäten der untersuchten Proteine als auch die Stabilität der Basislinie variierten bei mehrfacher Injektion.

Die Spektren und Dekonvolutionsspektren der 10 Proteine aus einer Messung (Abbildung 53, Messung 1) sind in Abbildung 54 dargestellt.

Anhand der Spektren konnte eine eindeutige Zuordnung der Substanzen zu den Peaks durch Dekonvolution der erhaltenen Massenspektren durchgeführt werden.

Es fällt auf, dass die Ladungszustände des Insulins mit sehr hoher Intensität detektiert wurden. Dies ist durch die nur geringe Anzahl an unterschiedlichen Ionen zu erklären. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Cytochrom C, das ein sehr gut positiv-ionisierbares Protein ist, nur mit geringen Intensitäten detektiert wurde. Die teilweise Koelution mit Insulin, die im Spektrum des Cytochrom C sehr gut zu erkennen ist, erschwerte die Darstellung dieses Proteins zusätzlich.

Trotz dieser noch nicht optimalen Bedingungen für die Darstellung intakter Proteine konnte die Massengenauigkeit des Systems durch Vergleich der gemessenen dekonvolutierten Masse mit den theoretischen Massen der Proteine als zufrieden stellend aber optimierbar interpretiert werden. Tabelle 20 gibt einen Überblick über die gemessenen und theoretischen Massen sowie die Abweichung in ppm und Da für die untersuchten Proteine der ersten in Abbildung 53 dargestellten Messung, deren Spektren in Abbildung 54 gezeigt sind.

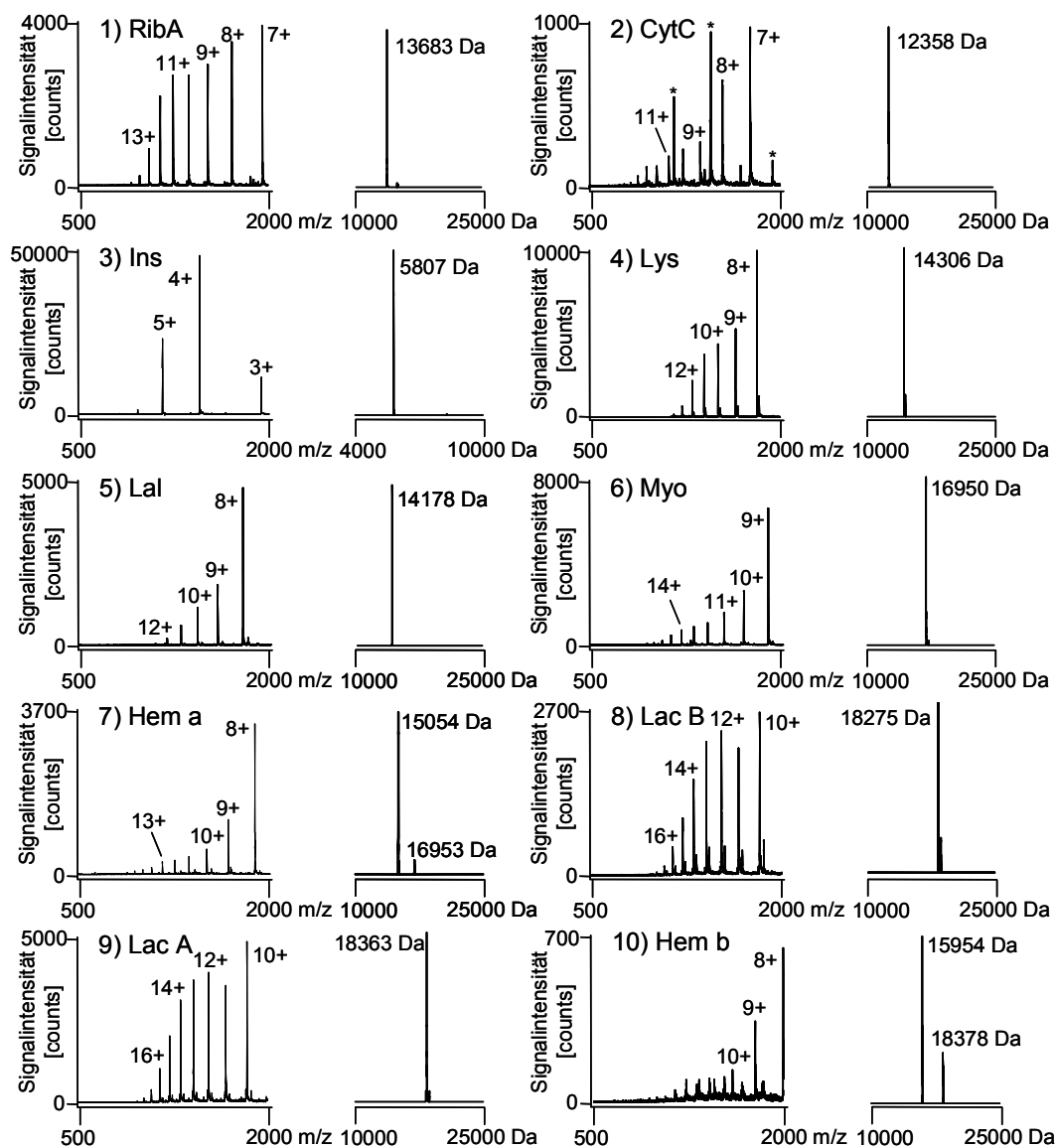


Abbildung 54: Spektren und Dekonvolutionsspektren der im Standard enthaltenen Proteine, Peakreihenfolge gemäß Abbildung 53 bzw. Tabelle 19; Annotiert sind die Ladungszustände in Wertigkeit und Polarität, bei Cytochrom C mit * gekennzeichnete Ladungszustände wurden durch bereits eluierendes Insulin hervorgerufen, da bei diesen beiden Proteinen eine teilweise Koelution auftrat.

Tabelle 20: Massenabweichungen 10-Proteinstandard-Mischung

Protein	Theoretische Masse in Da	Gemessene Masse in Da	Abweichung in Da	Abweichung in ppm
Ribonuklease A	13682.3	13683.0	0.7	51.2
Cytochrom C	12360.1	12358.8	1.3	105.2
Insulin	5806.6	5807.5	0.9	155.0
Lysozym	14305.1	14306.2	1.1	76.9
α-Lactalbumin	14178.0	14179.1	1.1	77.6
Myoglobin	16951.5	16953.1	1.6	94.4
Hämoglobin a	15052.2	15053.8	1.6	106.3
β-Lactoglobulin B	18277.2	18277.9	0.7	38.3
β-Lactoglobulin A	18364.8	18365.0	0.2	10.9
Hämoglobin b	15953.4	15955.2	1.8	112.8

Die nicht zufrieden stellende Detektion und Nachweisgrenze des Cytochrom C und die schlechte Reproduzierbarkeit der Messungen führten zu einer ausgeprägten Modifikation der Ionenquelle, durch die eine stabilere und effektivere Ionisierung der Proteine gewährleistet werden sollte. Diese Modifikation und die anschließende Optimierung der massenspektrometrischen Parameter werden im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben.

3.2.4 Modifizierung der Ionisierungsspannung

Die Ionisierungsspannung liegt bei der originalen Sprühvorrichtung an der Spitze der Spraykapillare an, was die Ionisierung im Sprühverfahren durch elektrolytische Einflüsse unterstützt. Für große Moleküle bzw. Biomoleküle hat es sich jedoch bereits gezeigt, dass vor allem bei Verwendung gering-dimensionierter Kapillarwege und kleiner Flüsse das Anlegen der Spannung im Bereich der Kopplung von Säule und Ionenquelle von Vorteil ist. Die Analyt- und Lösemittelmoleküle fließen bei dieser vorgezogenen Spannung noch durch eine Potentialstrecke von 10 bis 40 cm bei angelegter Hochspannung im Bereich von 2 bis 4 kV und können somit stabilisiert als Ionen durch Zusatz des Ionenpaarreagenzes und elektrolytischer Vorgänge aus der Spraykapillare austreten und über den Sprayprozess in das Massenspektrometer

gelangen und analysiert werden. Die Verschiebung des Spannungspunktes wurde auch bei dem in Kapitel 3.1.1 bereits vorgestellten Sprayer vorgenommen. Abbildung 55 zeigt die Veränderungen am Sprayergehäuse bzw. der Kapillarverbindung zum Vergleich mit dem in Abbildung 46 gezeigten Sprayer.

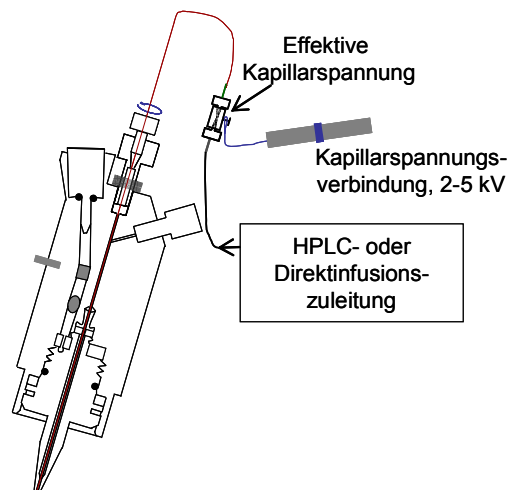


Abbildung 55: Modifizierter Sprayer zur besseren Ionisierung von großen Biomolekülen

Das Anlegen der Kapillarspannung erfolgte bei diesem modifizierten Sprayer nicht mehr an der Kapillar- bzw. Gehäusespitze sondern an der Kapillarverbindung zwischen HPLC-Säule bzw. Direktinfusionszuleitung und der Spraykapillare über ein Metallunion, auf das die Hochspannung mittels einer Metallschraube aufgebracht wurde. Als Hochspannungsquelle wurde die vorgesehene Hochspannungsleitung des LTQ-XL verwendet, wobei jedoch keine Einleitung in den Sprayer direkt sondern eine Steckerkopplung zum Union etabliert wurde. Zum Schutz vor Spannungstößen wurden das Union und die Metallschraube sowie etwa jeweils 1 cm des Hochspannungskabels und der an das Union angeschlossenen Kapillaren von einem Peekgehäuse umschlossen, was hier nicht gezeigt ist. Nach dieser Modifizierung erfolgte erneut eine Optimierung aller bereits in Kapitel 3.1 beschriebenen massenspektrometrischen Parameter mittels Direktinfusion des vom Hersteller vorgesehenen Tuning-Mixes und verschiedener Standardproteine.

Zur Optimierung der Sprayeinstellungen wurde erneut ein Standard mit 325 fmol Lysozym je μL Lösungsmittel (20 % Acetonitril in 0.5 % wässriger Trifluoressigsäurelösung) mit konstantem Fluss von 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ direkt injiziert. Die maximale Injektionszeit der Ionenfalle wurde auf 200 ms und das Füllvolumen

(AGC Target) auf 30,000 Ionen pro Microscan belassen. Aus jeweils drei Microscans wurde wiederum ein Spektrum durch Aufsummierung gebildet, welches einem abgebildeten Messpunkt entspricht. Auch die Optimierung der Ionenoptik erfolgte durch Direktinfusion des beschriebenen Standards mittels der Autotune- und manuellen Tune-Funktion der XCalibur Software. Es wurde auf maximale Intensität bei gleich bleibender Füllzeit der Ionenfalle optimiert, wodurch sich die in Tabelle 21 beschriebenen Parameter ergaben. Mit diesen Parametern wurden alle im Folgenden beschriebenen Analysen durchgeführt.

Tabelle 21: Optimierte Parameter nach Spannungsmodifikation des Sprayers Ionisierung und Ionenoptik

Sprayspannung	3.0 kV	Kapillarlänge	0.33 mm
Sprühgas	15 arb	Sprayer z-Richtung	B-Ring mittig
Hilfsgas	1.5 arb	Sprayer y-Richtung	0.06 Skt
Kapillartemperatur	250°C	Sprayer x-Richtung	mittig
Kapillarspannung	91.0 V	Tube Lens	170.5 V
Multipole 00 offset	-1.0 V	Multipole RF	657 Vp-p
Lens 0	-7.5 V	Front Lens	-7.25 V
Multipole 0 offset	-11.5 V	Front Section offset	-9.0 V
Lens 1	-22.0 V	Center Section offset	-12.0 V
Gate Lens	-32.0 V	Back Section offset	-7.0 V
Multipole 1 offset	-8.0 V	Back Lens	0.0 V

3.3 Trennung und Detektion von Standardproteinen – Reproduzierbarkeit und Statistische Parameter

Mit den in Kapitel 3.2.4 ermittelten Parametern wurde die unter Kapitel 3.2.1 bereits vorgestellte Mischung aus 10 Proteinen nach zweidimensionaler Trennung mit der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen mikro-HPLC-Methode untersucht. Die Kopplung der Apparaturen wurde wie in Kapitel 3.2.3 bereits beschrieben durchgeführt. Die massenspektrometrische Aufnahme wurde bei Umschaltung des 10-Wege-Ventils in die 10_1-Position (Elution auf die Trennsäule) gestartet. Für die chromatographische Trennung wurden die in Tabelle 22 angegebenen Parameter benutzt.

Tabelle 22: Chromatographie-Bedingungen zur Trennung und Untersuchung intakter Proteine

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 15 μ L/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 2 μ L/min
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 15 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 3 μ L

3.3.1 10-Proteinstandard-Mischung

Die Konzentrationen der Proteine sind zusammen mit der effektiv in 3 μ L injizierten Menge in Tabelle 23 aufgeführt. Abbildung 56 zeigt die Totalionenstrom- und Basispeakchromatogramme von drei Injektionen der Proteinmischung bei gleichem Injektionsvolumen und konstanten Methodenparametern für Trennung und Detektion. Es fällt auf, dass mittels des BPC's diskretere Signale dargestellt wurden, wobei Cytochrom C weder im TIC noch im BPC einen eindeutigen Peak bildete. Anhand der Spektren und dekonvolvierten Spektren der Peaks konnte die Identifizierung jedes in der Mischung vorkommenden Proteins erfolgen, wobei die Elutionsreihenfolge verglichen mit den in Abbildung 53 gezeigten Messungen erwartungsgemäß gleich blieb.

Tabelle 23: Konzentrationen der 10-Protein-Standardmischung und injizierte Menge

<i>Elutionsreihenfolge</i>	Protein	Konzentration in fmol/ μ L	Injizierte Menge in fmol
1	Ribonuklease A	395.0	1185
2	Cytochrom C	88.3	265
3	Insulin	268.1	804
4	Lysozym	119.2	358
5	α-Lactalbumin	73.8	221
6	Myoglobin	81.1	243
7	Hämoglobin a	87.5	263
8	β-Lactoglobulin B	75.2	226
9	β-Lactoglobulin A	52.0	156
10	Hämoglobin b	87.5	263

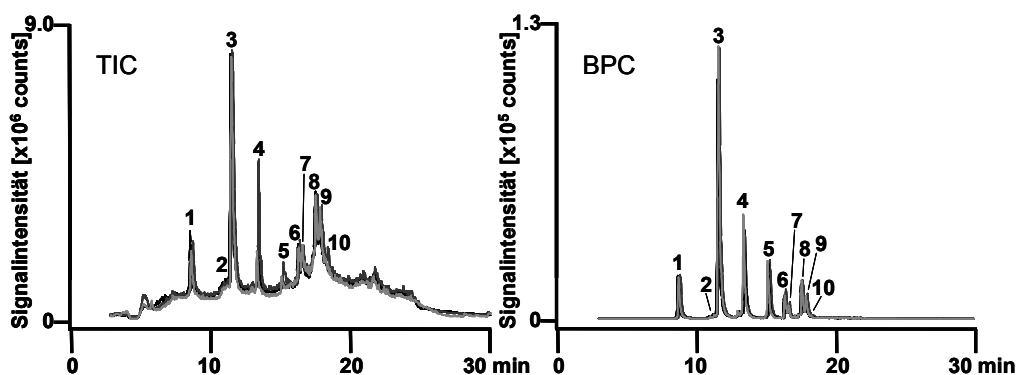


Abbildung 56: Totalionenstrom (TIC)- und Basispeakchromatogramme (BPC) der 10-Protein-Standardmischung, dreifache Bestimmung, Trennmethode wie in Tabelle 22 aufgeführt

Tabelle 24 gibt Aufschluss über die statistischen Zusammenhänge für die Reproduzierbarkeit der Mischung anhand von Retentionszeiten als chromatographische Parameter und der Massenstabilität der intensivsten Ladungszustände und Dekonvolutionsmassen der einzelnen Proteine bei 10facher Wiederholung der Analyse als Wiederholbarkeitsparameter für die Massenanalyse. Angegeben sind jeweils die mittleren Ergebnisse und der Vertrauensbereich bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % ($P = 95\%$) unter Bezugnahme auf den

Studentfaktor t eines zweiseitigen Mittelwerttestes mit 10 Wiederholungen bzw. 9 Freiheitsgraden ($f = 9$).

Tabelle 24: 10fache Messung der 10-Protein-Standardmischung; Abweichungen der Retentionszeit und Massen der Proteine; jeweils gemittelttes Ergebnis der 10 Messungen \pm Vertrauensbereich für $P = 95 \%$ (relative Standardabweichung)

Protein	Retentionszeit in min	Massenabweichung des intensivsten Ions in Da // ppm	Massenabweichung der Dekonvolutionsmasse in Da // ppm
Ribonuklease A	8.9 \pm 0.68 (3.4 %)	-0.002 \pm 0.0934 // -1.17 \pm 54.558	6.4 \pm 0.13 // 467.0 \pm 9.38
Cytochrom C	11.4 \pm 0.62 (2.4 %)	-0.26 \pm 0.149 // -149.4 \pm 84.25	1.1 \pm 0.64 // 88.2 \pm 52.04
Insulin	11.7 \pm 0.68 (2.6 %)	0.28 \pm 0.076 // 190.0 \pm 52.48	2.0 \pm 1.85 // 351.4 \pm 318.45
Lysozym	13.6 \pm 0.69 (2.2 %)	0.05 \pm 0.093 // 29.1 \pm 52.18	5.8 \pm 0.22 // 405.4 \pm 15.26
α-Lactalbumin	15.4 \pm 0.78 (2.2 %)	0.06 \pm 0.177 // 32.1 \pm 99.28	6.0 \pm 1.17 // 423.2 \pm 82.66
Myoglobin	16.5 \pm 0.77 (2.1 %)	0.01 \pm 0.087 // 7.4 \pm 46.30	3.8 \pm 0.76 // 225.9 \pm 44.64
Hämoglobin a	16.7 \pm 0.83 (2.2 %)	0.14 \pm 0.091 // 73.8 \pm 48.17	4.7 \pm 0.66 // 315.3 \pm 43.52
β-Lactoglobulin B	17.6 \pm 0.87 (2.2 %)	0.03 \pm 0.057 // 15.3 \pm 31.26	5.6 \pm 0.81 // 307.5 \pm 44.41
β-Lactoglobulin A	18.1 \pm 0.88 (2.2 %)	-0.12 \pm 0.163 // -67.5 \pm 88.5	4.7 \pm 0.28 // 258.0 \pm 15.40
Hämoglobin b	18.5 \pm 0.94 (2.3 %)	0.11 \pm 0.095 // 55.1 \pm 47.76	5.6 \pm 6.65 // 352.0 \pm 417.04

Es fielen die hohen Abweichungen der Retentionszeit von mehr als einer halben Minute auf. Da zugleich ein direkter Trend der Retentionszunahme korrelierend mit den Wiederholmessungen erkannt wurde, wies dies auf ein mögliches Verbindungsproblem auf Seiten der Chromatographie hin. Der Retentionstrend ist in Abbildung 57 graphisch anhand der Schwankungen der Retentionszeit um den jeweiligen berechneten Mittelwert (auf 0 normiert) dargestellt.

Durch den Wechsel verschiedener Anschlüsse wurde dieser Drift zu höher werdenden Retentionszeiten behoben. Es zeigte sich, dass es sich hierbei nicht um einen systematischen Fehler auf chromatographischer Seite des Systems handelte, da folgende Analysen mehrfach injizierter Proteine gut reproduzierbare Retentionszeiten ergaben.

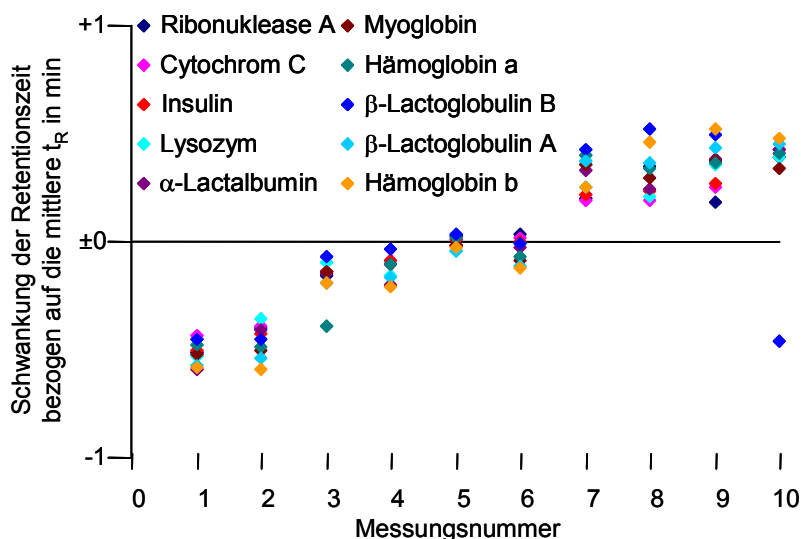


Abbildung 57: Retentionsverschiebung 10-Proteinstandard-Mischung, Schwankungstrend

Die Abweichung der Massen der Ladungszustände in Tabelle 24 wurde anhand der jeweils intensivsten Massenpeaks im jeweiligen Spektrum des aufsummierten Peaks in Da und in ppm berechnet. Die großen Abweichungen der Dekonvolutionsmassen von größtenteils über 300 ppm waren nicht zufrieden stellend und ließen auf eine ungenügende Massengenauigkeit schließen. Dies könnte in der Tatsache begründet sein, dass eine Massenkalisierung nicht anhand von Proteinen und ihren durchschnittlichen Massen (*average masses*) durchgeführt wurde, sondern mittels des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Tuning-Mixes (vgl. Kapitel 3.1.2). Auch könnte die zur Dekonvolution verwendete Software ProMass als Ergänzung zu XCalibur gegebenenfalls nicht in der Lage sein, so große Molekülmassen genau zu berechnen. Da auch eine Rekalibrierung nach der Aufnahme zur Datenauswertung nicht einheitlich durchführbar war, wurden die gemessenen Massen nicht korrigiert. Für die Analyse unbekannter Mischungen bestand somit das Problem, wegen zu hoher Abweichungen keine genauen Massen ermitteln zu können, mit denen Vergleiche zu potentiell vorhandenen Proteinen hätten durchgeführt werden können.

Abbildung 58 zeigt die Summenspektren aller 10 untersuchten Proteine aus einem Chromatogramm der Parallelmessungen.

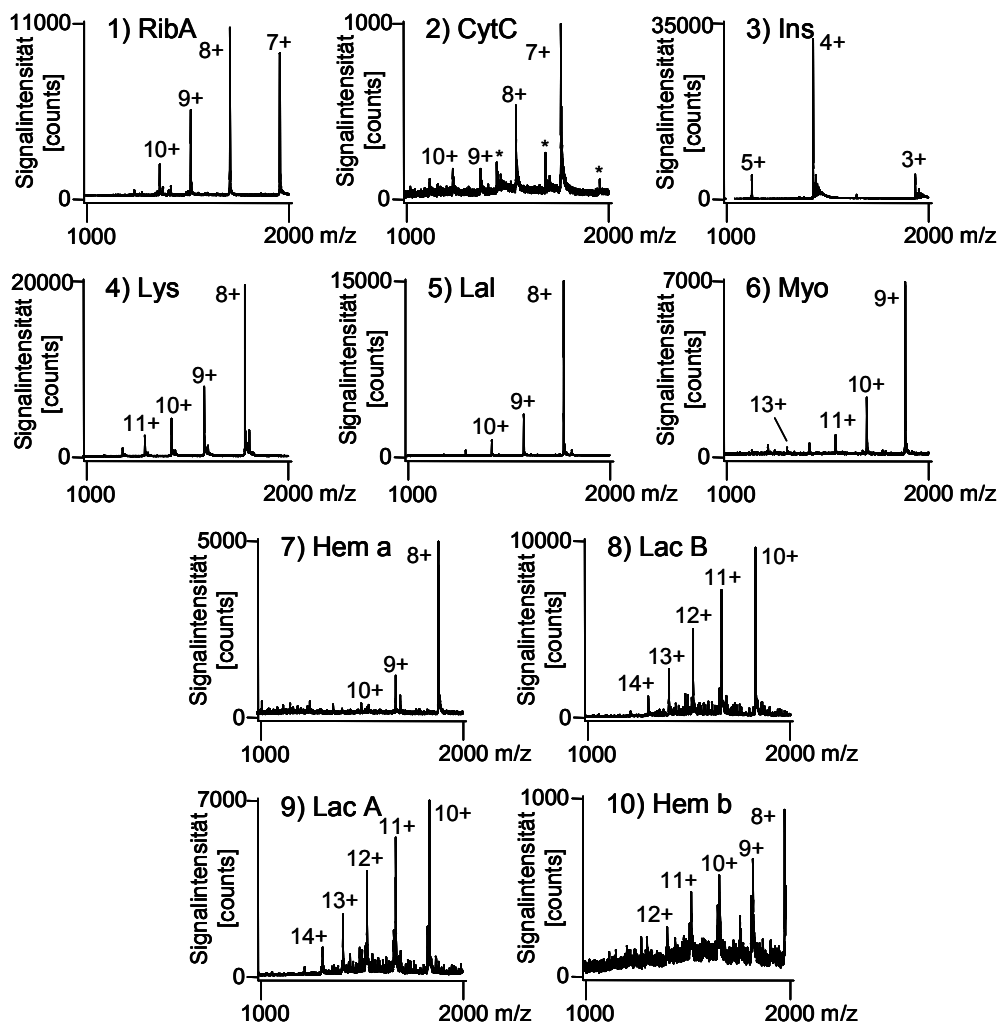


Abbildung 58: Summenspektren der Peaks aus einer der 10 Untersuchungen der 10-Protein-Standardmischung, gezeigt ist nur der Massenbereich 1000 bis 2000 m/z, aufgenommen wurde im Massenbereich von 500 bis 2000 m/z.

In Tabelle 25 sind die Nachweisgrenzen der einzelnen Proteine aus der 10fachen Untersuchung der Standardmischung anhand der beschriebenen drei Auswertungsmöglichkeiten aufgeführt. Hierbei fielen starke Schwankungen bzw. breite Vertrauensbereiche von über 100 % gemessen an den berechneten, gemittelten NWGs, vor allem anhand der chromatographisch ermittelten Nachweisgrenzen auf. Der Vergleich zwischen den NWGs aus dem TIC und dem BPC zeigte, mit Ausnahme der Darstellung des Proteins Hämoglobin b, eine deutliche Reduzierung der Nachweisgrenze und eine Verringerung der

Vertrauensbereiche. Dies wies auf die Notwendigkeit hin, auch manuell das chromatographische Rauschen nach Proteinsignalen zu durchsuchen.

Tabelle 25: Nachweisgrenzen (NWG) der 10 Standardproteine berechnet aus dem TIC, dem BPC und dem intensivsten Ladungszustand des jeweiligen Spektrums; jeweils gemitteltes Ergebnis der 10 Messungen \pm Vertrauensbereich für P = 95 %

Protein	NWG in fmol TIC	NWG in fmol BPC	NWG in fmol Spektrum
Ribonuklease A	300.5 \pm 464.39	121.8 \pm 354.96	110.6 \pm 169.32
Cytochrom C	267.1 \pm 365.69	210.2 \pm 262.68	86.2 \pm 41.36
Insulin	42.4 \pm 58.98	7.5 \pm 10.44	24.0 \pm 19.83
Lysozym	86.3 \pm 171.00	7.6 \pm 8.68	9.7 \pm 3.39
α-Lactalbumin	155.46 \pm 275.26	7.6 \pm 9.20	9.1 \pm 6.96
Myoglobin	102.1 \pm 153.45	20.6 \pm 31.04	13.7 \pm 5.42
Hämoglobin a	118.5 \pm 158.25	45.5 \pm 63.75	26.5 \pm 7.59
β-Lactoglobulin B	36.7 \pm 50.07	13.2 \pm 16.52	15.5 \pm 6.53
β-Lactoglobulin A	33.9 \pm 49.54	15.4 \pm 19.23	15.7 \pm 6.55
Hämoglobin b	169.6 \pm 209.29	312.6 \pm 454.44	152.5 \pm 69.89

Bis auf die schwierig darstellbaren Proteine Cytochrom C und Hämoglobin b konnten alle untersuchten Proteine etwa gleich gut dargestellt werden bzw. mit ähnlicher Nachweisgrenze detektiert werden. Anhand dieser kritischen Analyte war jedoch erkennbar, dass die Spektren deutliche Signale zeigten, was innerhalb der chromatographischen Darstellung jedoch nicht umgesetzt wurde aufgrund der schwachen Signalintensität. Daraus ließ sich schließen, dass dies eine Limitierung der Detektion von Proteinen aus biologischen Proben darstellen könnte, wenn auf die manuelle Überprüfung der einzelnen auch peaklosen Regionen des Chromatogramms verzichtet würde. Alle drei Interpretations- bzw. Auswertungsstrategien kombiniert stellen somit die größten Chancen für eine gute Detektion und Ausbeute an gefundenen Proteinen dar.

3.3.2 8-Proteinstandard-Mischung

Wie bereits die 10-Proteinstandard-Mischung, die einen Proteinmassenbereich von 5000 bis 20,000 Da abdeckt, wurde die in Kapitel 2.2 bereits vorgestellte Mischung aus 8 Proteinen für den Massenbereich bis 80,000 Da untersucht. Die Zusammensetzung und die theoretischen Massen der Proteine zeigt Tabelle 26. Die Analyse erfolgte erneut mit den in Tabelle 22 angegebenen Trennparametern und den in Tabelle 21 beschriebenen massenspektrometrischen Einstellungen. Das Injektionsvolumen betrug bei diesen Untersuchungen 1 μL .

Tabelle 26: Zusammensetzung der 8-Proteinstandard-Mischung, Elutionsreihenfolge und theoretische Massen der Proteine

<i>Elutionsreihenfolge</i>	Protein	Theoretische Masse in Da	Konzentration in fmol/ μL
1	Ribonuklease A	12382.3	789.9
2	Cytochrom C	12360.1	176.5
3	Lysozym	14305.1	218.5
4	Transferrin	79593.3	130.3
5	Myoglobin	16951.5	162.2
6	β-Lactoglobulin B	18277.2	150.5
7	β-Lactoglobulin A	18364.8	104.0
8	Carboanhydrase	29022.7	166.4

Es wurden erneut 10 Parallelen der Mischung gemessen und die Massengenauigkeit anhand der intensivsten Ladungszustände und der dekonvolvierten Masse bestimmt sowie die Reproduzierbarkeit der Retention untersucht. Abbildung 59 zeigt drei Analysen als TIC und BPC dieser Mischung zur Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit der Trennung. Schon anhand der überlagerten Chromatogramme von drei Messungen des Standards in Abbildung 59 wurde die gute Reproduzierbarkeit auf Seiten der Chromatographie anhand der Retentionszeiten der Peaks deutlich. Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung für die Retentions- und Massenstabilitäten in Form der berechneten Mittelwerte und Vertrauensbereiche mit $P = 95\%$ (vgl. Formel 8).

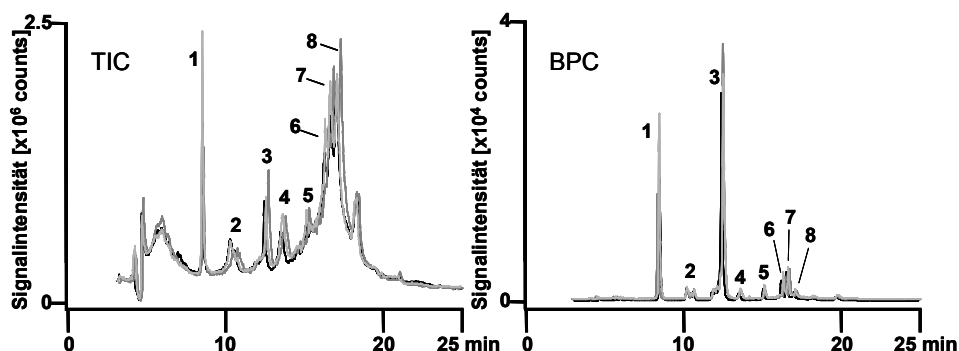


Abbildung 59: HPLC-MS-Analysen der 8-Proteinstandard-Mischung, dreifach injiziert, jeweils TIC und BPC

Tabelle 27: 10fache Messung der 8-Proteinstandard-Mischung; Abweichungen der Retentionszeit und Massen der Proteine; jeweils gemitteltetes Ergebnis der 10 Messungen \pm Vertrauensbereich für $P = 95\%$ (Relative Standardabweichung)

Protein	Retentionszeit in min	Massenabweichung des intensivsten Ions in Da // ppm	Massenabweichung der Dekonvolutionsmasse in Da // ppm
Ribonuklease A	8.3 ± 0.32 (1.7 %)	$0.07 \pm 0.105 //$ 38.6 ± 61.38	$5.7 \pm 1.76 //$ 413.7 ± 128.94
Cytochrom C	10.3 ± 0.39 (1.7 %)	$-0.15 \pm 0.143 //$ -84.3 ± 80.78	$2.8 \pm 1.93 //$ 222.5 ± 155.93
Lysozym	12.3 ± 0.51 (1.8 %)	$0.12 \pm 0.114 //$ 64.8 ± 63.91	$5.8 \pm 0.30 //$ 404.1 ± 20.80
Transferrin	13.4 ± 0.55 (1.8 %)	$-0.46 \pm 0.358 //$ -233.3 ± 179.91	$15.6 \pm 30.89 //$ 196.2 ± 388.14
Myoglobin	14.9 ± 0.68 (2.0 %)	$0.06 \pm 0.141 //$ 34.0 ± 74.83	$8.3 \pm 1.79 //$ 487.3 ± 105.39
β-Lactoglobulin B	16.1 ± 0.71 (2.0 %)	$0.04 \pm 0.114 //$ 19.7 ± 62.67	$6.9 \pm 2.65 //$ 376.4 ± 144.96
β-Lactoglobulin A	16.4 ± 0.72 (2.0 %)	$-0.06 \pm 0.371 //$ -32.7 ± 202.10	$4.8 \pm 0.31 //$ 262.3 ± 16.86
Carboanhydrase	16.8 ± 0.78 (2.0 %)	$0.21 \pm 0.200 //$ 118.0 ± 111.86	$17.5 \pm 0.39 //$ 601.6 ± 13.34

Wiederum traten bei 10facher Messung des Standards leichte Retentionsverschiebungen auf, die diesmal jedoch keinen wachsenden Trend aufwiesen, wie in Abbildung 60 zu erkennen ist. Durch weitere Messungen

relativierte sich die Verschiebung, wodurch auf ein stabiles chromatographisches System geschlossen werden konnte.

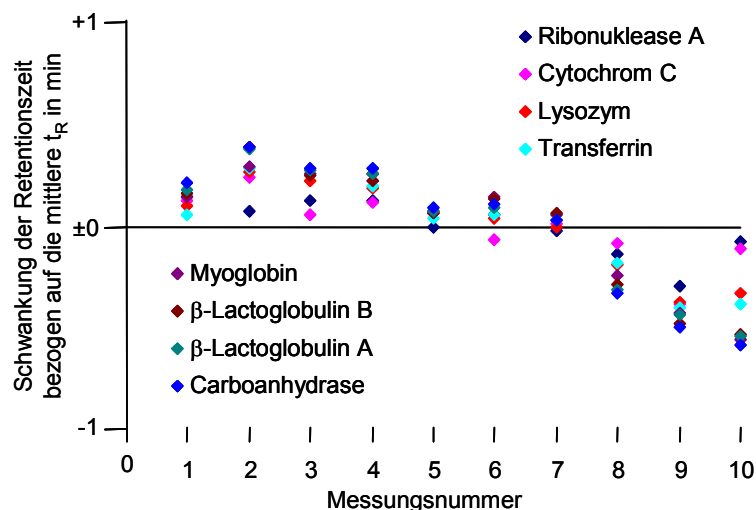


Abbildung 60: Retentionsverschiebung 8-Proteinstandard-Mischung, Schwankungstrend

Die Spektren einer Messung sind in Abbildung 61 gezeigt. Für die bereits in der 10-Proteinstandard-Mischung vorgestellten Proteine wurden die charakteristischen Spektren mit guten Intensitäten erhalten, so dass die Dekonvolution der Spektren keine Schwierigkeit darstellte. Für die größeren Analyte Carboanhydrase und Transferrin konnten jeweils deutliche Ionen detektiert werden, die zwar geringere Intensitäten aufwiesen aber aufgrund der Verteilung der Ladungszustände von 15+ bis 34+ für Carboanhydrase bzw. 40+ bis 47+ für Transferrin sehr charakteristisch waren. Anhand des Transferrinspektrums wurde erneut sichtbar, dass eine Vergrößerung des Massenbereichs über 2000 m/z hinaus zur Darstellung von Proteinen weitere Genauigkeit zur Bestimmung der intakten Massen liefern könnte, da die Dekonvolution der Ladungszustände mit höherem Informationsgehalt aus den Spektren eindeutiger würde. Außerdem ist nicht sicher, ob beispielsweise im Falle des Transferrins der detektierte 40+-Ladungszustand tatsächlich der intensivste der gesamten Ionenserie war, was wiederum Einfluss auf die Detektierbarkeit des Proteins nähme. Die geringe Intensität der Cytochrom C-Ionen zeigten eine charakteristische Eigenschaft der verwendeten MS-Parameter. Die Optimierung auf Lysozym hatte anscheinend einen großen, negativen Einfluss auf die Detektierbarkeit des Cytochrom C. Alle anderen untersuchten Proteine ließen sich mit den verwendeten Einstellungen gut darstellen. Der Versuch, optimierte

Parameter auf Basis von Cytochrom C zu verwenden, hatte zur Folge, dass Lysozym kaum und beispielsweise Ribonuklease A überhaupt nicht detektiert wurden. Die Anwendung dieser Methode konnte somit nur speziell für Cytochrom C durchgeführt werden, wurde daher nicht weiter verwendet und wird aus diesem Grund an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt.

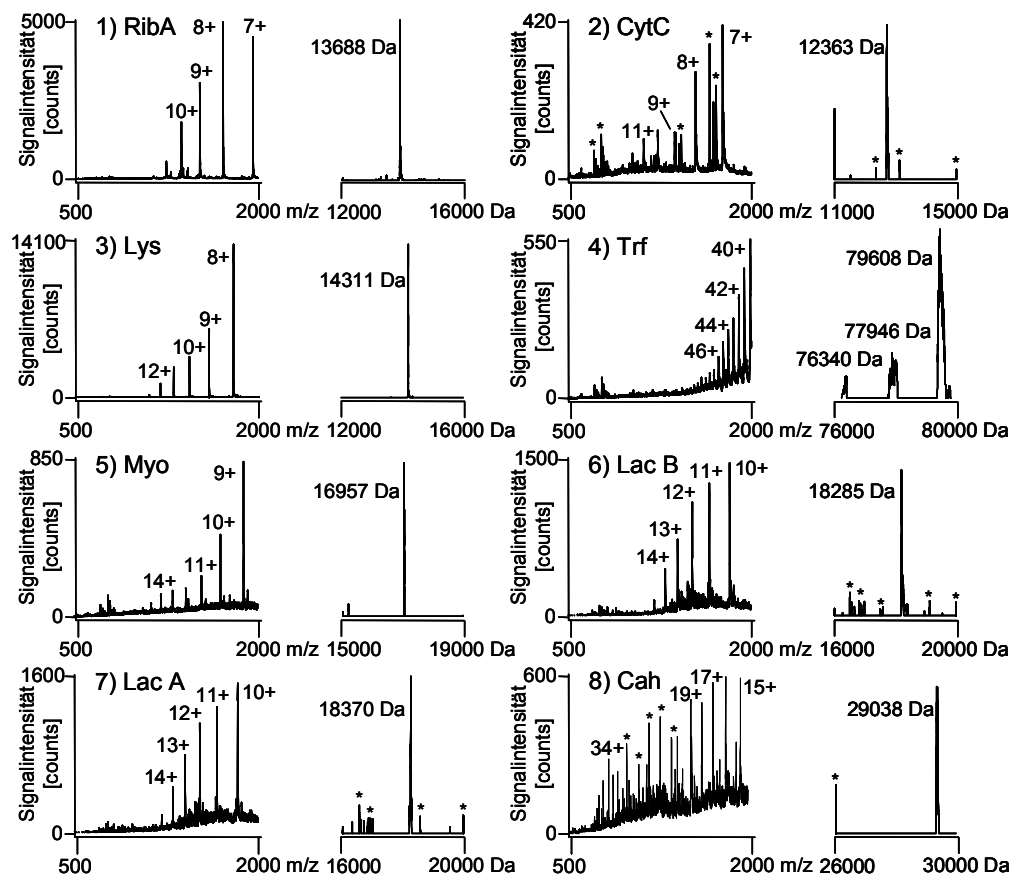


Abbildung 61: Spektren und dekonvolvierte Spektren der Proteine der 8-Proteinstandard-Mischung; Annotierte Ladungszustände zeigen die Ionenwertigkeit und Polarität, mit * gekennzeichnete Ladungszustände oder Dekonvolutionsmassen sind unbekannt und wurden als Verunreinigung definiert; zusätzliche Dekonvolutionsmassen im Transferrinspektrum zeigen Transferrin in geringer glycosylierten Stadien.

Anhand der drei bereits vorgestellten Methoden wurden auch für die 8-Proteinstandard-Mischung die Nachweisgrenzen der einzelnen Proteine ermittelt. Tabelle 28 zeigt die statistischen Ergebnisse dieser Berechnungen. Bei allen chromatographischen Nachweisgrenzen traten Schwankungen in Form des Vertrauensbereichs von nahezu 100 % gegenüber der mittleren Nachweisgrenze auf.

Auffällig war vor allem der Vergleich der Nachweisgrenzen der größeren Proteine gegenüber denen im Massenbereich bis 20,000 Da. Chromatographisch zeigten sowohl Carboanhydrase als auch Transferrin gut detektierbare Peaks im TIC und BPC, wodurch die NWG dementsprechend klein ausfielen mit unter 40 bzw. 60 fmol.

Tabelle 28: Nachweisgrenzen der Proteine der 8-Proteinstandard-Mischung, berechnet aus dem TIC, BPC und Spektrum, Mittelwerte \pm Vertrauensbereich bei P = 95 %, 10fache Bestimmung

Protein	NWG in fmol TIC	NWG in fmol BPC	NWG in fmol Spektrum
Ribonuklease A	95.2 \pm 103.14	9.3 \pm 8.80	19.2 \pm 13.90
Cytochrom C	127.0 \pm 129.45	43.0 \pm 40.70	24.9 \pm 10.69
Lysozym	65.1 \pm 57.47	1.8 \pm 1.55	4.5 \pm 0.96
Transferrin	55.0 \pm 48.83	30.0 \pm 25.35	62.4 \pm 18.15
Myoglobin	91.2 \pm 73.15	27.9 \pm 22.42	45.2 \pm 14.66
β-Lactoglobulin B	49.4 \pm 40.42	19.2 \pm 15.11	60.8 \pm 21.99
β-Lactoglobulin A	14.2 \pm 10.26	6.2 \pm 4.69	31.9 \pm 12.87
Carboanhydrase	19.4 \pm 15.68	39.2 \pm 28.95	126.6 \pm 23.46

In den Spektren stellte sich dies umgekehrt dar. Durch die breite Verteilung der detektierten Ionen fielen die Intensitäten der einzelnen und somit auch des intensivsten Ladungszustands entsprechend gering aus. Daraus resultierte ein erhöhtes Signal-zu-Rauschen, das wiederum eine hohe NWG bedingte. Außerdem fällt bereits in Tabelle 28 auf, dass mit zunehmender Retentionszeit, also zunehmendem Acetonitrilanteil im Gradienten, die anhand der Spektren ermittelten Nachweisgrenzen steigen. Dieser Trend konnte bei der Analyse der 10-Proteinstandard-Mischung nicht beobachtet werden, was Tabelle 29 für beide untersuchten Mischungen anhand der NWG aus dem Spektrum zusammenfasst. Die Intensitätsverteilung der Ionen in den Spektren war wiederum vergleichbar, so dass auf eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen anhand der Spektren geschlossen werden konnte.

Tabelle 29: Vergleich der Proteinstandardmischungen, aus den Spektren ermittelte Nachweisgrenzen in fmol für die in beiden Mischungen vorkommenden Proteine

Protein	10-Proteinstandard NWG in fmol	8-Proteinstandard NWG in fmol
Ribonuklease A	110.6 ± 169.32	19.2 ± 13.90
Cytochrom C	86.2 ± 41.36	24.9 ± 10.69
Lysozym	9.7 ± 3.39	4.5 ± 0.96
Myoglobin	13.7 ± 5.42	45.2 ± 14.66
β-Lactoglobulin B	15.5 ± 6.53	60.8 ± 21.99
β-Lactoglobulin A	15.7 ± 6.55	31.9 ± 12.87

4 HPLC-MS von Standardproteinen im hohen Massenbereich

Die massenspektrometrische Darstellung von intakten Proteinen sollte mittels Methoden durchgeführt werden, die als Breitbandmethoden bezeichnet werden könnten. Es sollte möglich sein, mit einer Methode eine Vielzahl von Proteinen, also vereinfacht gesagt alle möglichen Proteine, parallel darzustellen und zu charakterisieren. Wie aus den Kapiteln 2 und 3 hervorgeht, konnten eine mikro-HPLC-TOF-MS- und eine mikro-HPLC-Ionenfallen-MS-Methode entwickelt werden, die auf den effektiven Massenbereich bis etwa 100 kDa Proteinmasse anwendbar erschienen. Um diese Annahme zu bestätigen und den Massenbereich zu erweitern wurden Proteine mit hohen Molekülmassen in Form weiterer Mischungen, bestehend aus überwiegend großen Proteinen im Massenbereich von 30 bis 230 kDa, mit beiden Methoden untersucht und ihre Spektren dargestellt.

4.1 mikro-HPLC-TOF-MS von großen Proteinen

Es wurde ein linearer Gradient zur Trennung am HPLC-System ohne Trapsystem an einem Monolithen mit 15 cm Länge verwendet. Tabelle 30 zeigt die verwendeten Trennparameter, die MS-Einstellungen sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Tabelle 32 zeigt die Zusammensetzung der Proteinmischung sowie die relevanten bzw. gemessenen Massen der Proteine innerhalb der Untersuchung der Mischung.

Tabelle 30: Chromatographie-Bedingungen zur Trennung und Untersuchung großer intakter Proteine

- Trennsäule: PS/DVB, 150x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 1.5 µL/min
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 60 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 1 µL

Tabelle 31: Verwendete MS-Parameter zur Darstellung intakter, großer Proteine

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.5 bar	Pulsar Push/Pull	771 / 0 V
Dry Gas	4.0 L/min	Corrector Fill	53 V
Dry Temperature	200 °C	Reflector	1688 V
End plate offset	-400 V	Flight Tube:	8612 V
Capillary	4000 V	Corrector Extract	555 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	2140 V
Parameter der Ionenoptik			
Capillary exit	215.9 V	Lens 1 storage	50.0 V
Skimmer 1	79.0 V	extraction	25.7 V
Hexapole 1	46.0 V	Lens 2	-9.5 V
Skimmer 2	12.0 V	Lens 3	30.2 V
Hexapole 2	25.4 V	Lens 4	-17.5V
Hexapole RF	368.3 V	Lens 5	-46.6 V
Pre Puls Storage Time	15.0 µs	Focus	aktiv
		Transfer Time	88.0 µs

Tabelle 32: Proteinmischung große Proteine (1): Zusammensetzung, Elutionsreihenfolge, Konzentration, theoretische und gemessene Massen sowie ihre Abweichung

<i>Elutionsreihenfolge</i>	Protein	Konzentration in ng/µL	Theoretische Masse in Da	Gemessene Masse in Da	Massen- abweichung in Da
1	Transferrin	100	75921 + Glycane	79554.63	n.b.
2	BSA	100	66399	66435.00	36
3	Myosin light chain 1	100	20860	20860.25	0
4	Myosin light chain 2	100	18942	18937.91	4
5	Myosin light chain 3	100	16577	16568.61	8
6	Carboanhydrase	100	29023	29026.15	3

Tabelle 32 (Fortsetzung)

<i>Elutionsreihenfolge</i>	Protein	Konzentration in ng/ μ L	Theoretische Masse in Da	Gemessene Masse in Da	Massen- abweichung in Da
7	β-Amylase	100	55949	55953.10	4
7	β-Galactosidase	100	116352	116434.43	82
8	Ovalbumin	100	42750 + Glycane + Phosphorylierung	44251.35 44495.34	n.b.
<i>n.n.</i>	Kreatin Phosphokinase	100	42986	--	--
<i>n.n.</i>	α_1-Glycoprotein	100	21560 + Glycane	--	--
<i>n.n.</i>	α-Amylase	100	~ 63000	--	--
<i>n.n.</i>	Aldolase	100	39211 + Phosphorylierung	--	--
<i>n.n.</i>	Phosphorylase b	100	97158 + verschiedene Modifikationen	--	--
<i>n.n.</i>	Urease	100	90748	--	--

Im Falle des Myosins bezog sich die Konzentration auf das aus kleineren Proteinketten zusammengesetzte Gesamtprotein mit einer Masse von etwa 500 kDa. Da die verschiedenen Ketten nicht kovalent miteinander verknüpft sind, müssen sie nach chromatographischer Trennung einzeln nachgewiesen werden. Die leichten Ketten 1, 2 und 3 konnten anhand ihrer intakten Masse nachgewiesen werden. Die restlichen Ketten wurden nicht detektiert.

Abbildung 62 zeigt die Trennung der Proteinmischung große Proteine (1) in Form des TIC's und BPC's. Insgesamt konnten 7 der 13 Proteine in der Mischung detektiert werden. Die gemessenen Massen sind in Tabelle 32 aufgeführt. Abbildung 67 zeigt die Spektren und Dekonvolutionsspektren der in der Mischung nachweisbaren Proteine.

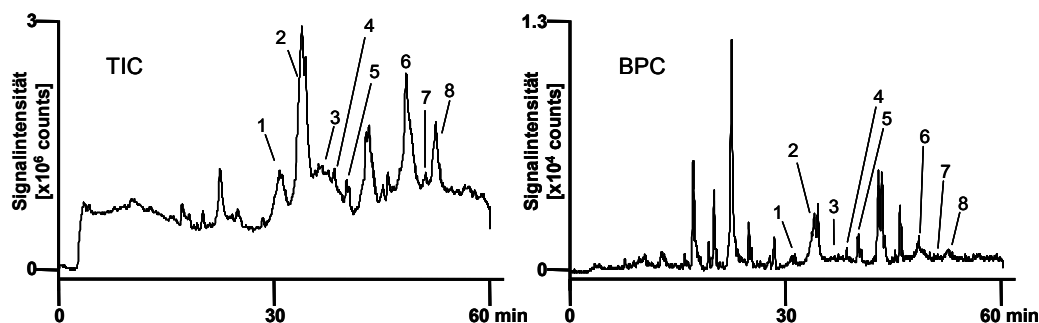


Abbildung 62: TIC und BPC der Analyse der Mischung große Proteine (1)

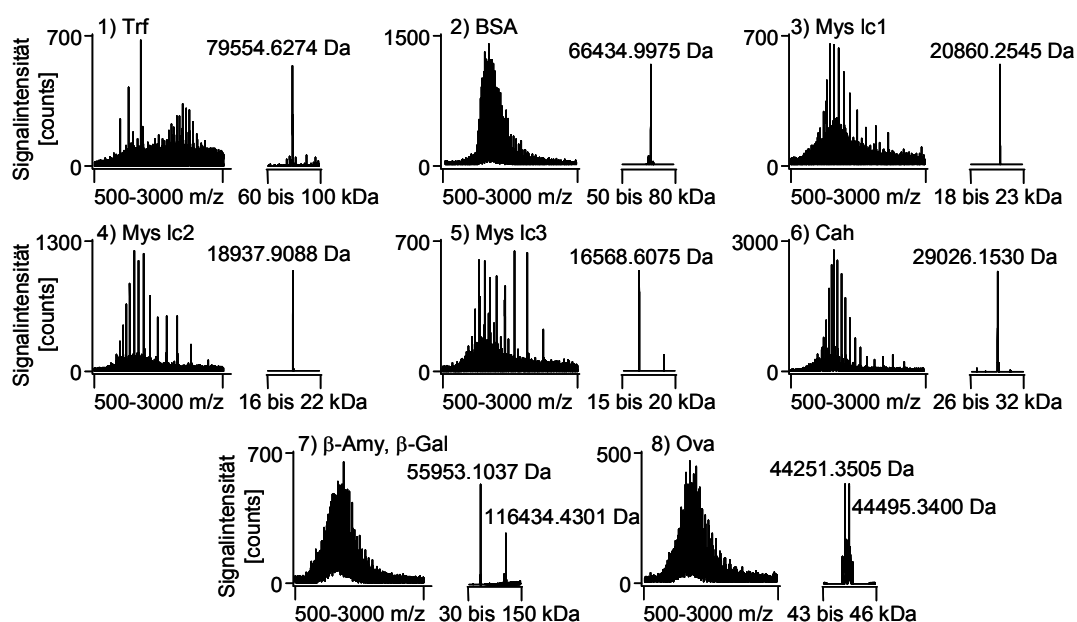


Abbildung 63: Spektren und Dekonvolutionspektren der in der Mischung nachweisbaren Proteine

Die theoretischen Massen wurden mittels der aus der SwissProt-Datenbank erhaltenen Proteinsequenzen berechnet (Indices vgl. 1.2). In einzelnen Proteinen vorkommende posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierung oder Phosphorylierung wurden in die theoretischen Massen nicht mit einberechnet, da die Modifikationen stark variieren und vom Alter und anderen Faktoren abhängig sind. Eine einzelne Modifikation kann durch unterschiedlichen Aufbau zu mehreren verschiedenen Beträgen als Massendifferenz der gemessenen zur Sequenz-Masse führen. Der Index n.b. in Tabelle 32 zeigt die Nicht-Berechnung des Wertes an.

Verschiedene Proteine konnten in der Mischung nicht detektiert werden, dies wurde in Tabelle 32 durch den Index n.n. (nicht nachweisbar) gekennzeichnet.

Die in der Mischung nicht nachweisbaren Proteine wurden durch Einzelinjektionen der gleichen Menge, wie sie in der Mischung konzentriert waren, unter denselben, in Tabelle 30 angegebenen Parametern analysiert. Abbildung 64 zeigt vergleichend die TICs dieser Einzelinjektionen.

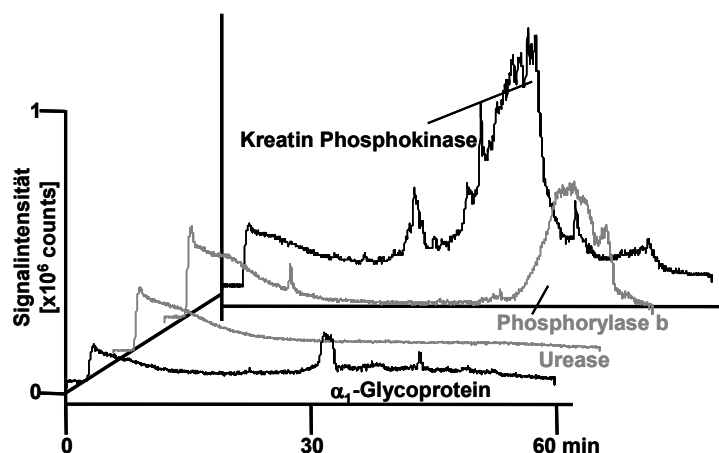


Abbildung 64: TICs der Einzelinjektionen von Kreatin Phosphokinase, Phosphorylase b, Urease und α_1 -acid-Glycoprotein (jeweils 100 ng/ μ L)

Auf die Abbildung der Einzelinjektionen von Aldolase und α -Amylase wurde verzichtet, da hier keinerlei Unterschiede zu einem Grundrauschen auftraten und somit dem Verlauf des Urease-Chromatogramms nahezu glichen. Somit waren diese drei Proteine weder massenspektrometrisch noch chromatographisch nachweisbar. Für das α_1 -Glycoprotein wurde unter den gegebenen Bedingungen kein aufgelöstes Spektrum erhalten, allerdings war im TIC ein deutlicher Peak zu sehen, was auf einen Anstieg an detektierten Ionen zu jenem Zeitpunkt hinweist.

Phosphorylase b und Kreatin Phosphokinase ließen sich anhand der Einzelinjektionen nachweisen. Sowohl anhand der TICs als auch aus den Spektren geht die Anwesenheit der Proteine und verschiedener Begleitsubstanzen (verstärkt bei KrPh) hervor, wobei trotz Überladung der Säule die Konzentration der Phosphorylase b massenspektrometrisch die Nachweisgrenze erreicht zu haben scheint. Die Spektren beider zusätzlich nachgewiesenen Proteine sind in Abbildung 65 gezeigt.

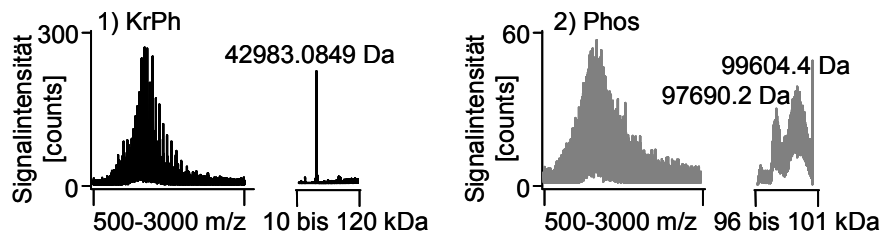


Abbildung 65: Spektren und Dekonvolutionsspektren der Proteine Kreatin Phosphokinase und Phosphorylase b

Wegen unterschiedlicher Modifikationen an der Phosphorylase b konnte ein direkter Bezug zur theoretischen Masse nicht vorgenommen werden. Die Kreatin Phosphokinase konnte jedoch mit einer Abweichung von 3 Da (70 ppm) eindeutig dargestellt werden. Durch Vergleiche der Retentionszeiten aus den Einzelinjektionen mit denen in der Mischung wurde deutlich, dass die Darstellung der Phosphorylase b in der Mischung durch Koelution mit Carboanhydrase wegen Überlagerungseffekten der Ionen beider Proteine nicht glückte. Im Fall der Kreatin Phosphokinase wurden im selben Retentionsbereich die drei leichten Ketten des Myosins mit extrem guten Intensitäten dargestellt, wodurch auch hier eine Überlagerung der Einzelspektren stattfand. Insgesamt konnten somit 9 der 13 Proteine dargestellt und anhand ihrer Masse nachgewiesen werden.

4.2 mikro-HPLC-Ionenfallen-MS von großen Proteinen

Es wurde ein linearer Gradient zur Trennung am zweidimensionalen HPLC-System verwendet, wie es in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben ist. Tabelle 33 zeigt die verwendeten Trennparameter, die MS-Einstellungen wurden bereits in Tabelle 21 vorgestellt. Tabelle 34 zeigt die Zusammensetzung der untersuchten Proteinmischung sowie die relevanten bzw. gemessenen Massen der Proteine. Im Falle des Myosins bezieht sich die Konzentration auf das aus kleineren Proteinketten zusammengesetzte Gesamtprotein mit einer Masse von etwa 500 kDa. Da die verschiedenen Ketten nicht kovalent miteinander verknüpft sind, können sie einzeln nachgewiesen werden, so dass sich die leichten Ketten 2 und 3 anhand ihrer intakten Masse nachweisen ließen. Die restlichen Ketten wurden nicht detektiert.

Tabelle 33: Chromatographie-Bedingungen zur Trennung und Untersuchung großer intakter Proteine

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 15 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 2 µL/min
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 30 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 3 µL

Die theoretischen Massen wurden erneut mittels der aus der SwissProt-Datenbank erhaltenen Sequenzen der Proteine berechnet. Auch wurden vorkommende posttranslationale Modifikationen erneut nicht in die theoretischen Massen mit einberechnet. Der Index n.b. in Tabelle 34 zeigt die Nicht-Berechnung des Wertes an. Die Proteine Urease und Phosphorylase b konnten in der Mischung nicht detektiert werden, dies wurde in Tabelle 34 durch den Index n.n. (nicht nachweisbar) gekennzeichnet. Phosphorylase b konnte allerdings mittels Einzelinjektion der gleichen Menge unter denselben Bedingungen detektiert werden. Die Retentionszeit des Peaks lag bei 33 min, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es innerhalb der Mischung zu starken Überlagerungen zwischen der Phosphorylase b und dem als Peak 10 in Abbildung 66 annotierten Ovalbumin kam, wodurch das größere Protein, die Phosphorylase b, unter dem Ovalbuminspektrum nicht eindeutig detektierbar war.

Tabelle 34: Proteinmischung große Proteine (2): Zusammensetzung, Elutionsreihenfolge, Konzentration, theoretische und gemessene Massen sowie ihre Abweichung

<i>Elutionsreihenfolge</i>	Protein	Konzentration in ng/ μ L	Theoretische Masse in Da	Gemessene Masse in Da	Massen- abweichung in Da
1	Transferrin	90	75921 + Glycane	78057	n.b.
2	Aldolase	107	39212	39231	19
3	Kreatin Phosphokinase	120	42986	43007	21
4	Myosin light chain 2	100	18895 + Phospho- rylierung	18942	n.b.
5	Myosin light chain 3	100	16569	16577	8
6	α_1-acid- Glycoprotein	100	21560 + Glycane	36741	n.b.
7	Carboanhydrase	107	29025	29034	9
8	β-Amylase	102	55949	55976	27
9	β-Galactosidase	100	116352	116565	213
10	Ovalbumin	108	42750 + Glycane + Phospho- rylierung	42645 44281 44538 44714 46171	n.b.
<i>n.n.</i>	Urease	99	90748	--	--
<i>n.n.</i>	Phosphorylase b	115	97158 + verschiedene Modifika- tionen	--	--

In Abbildung 66 sind das TIC und das BPC dieser Untersuchung gezeigt, in Abbildung 67 sind die Spektren und Dekonvolutionsspektren der annotierten Peaks aufgeführt. Die Retentionsreihenfolge sowie die theoretischen und intakten Massen und die resultierende Abweichung in Da sind ebenfalls in Tabelle 34 aufgelistet.

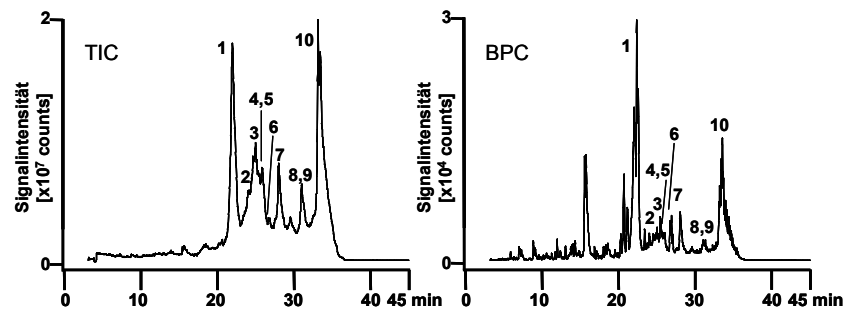


Abbildung 66: TIC und BPC der Analyse der Mischung große Proteine (2)

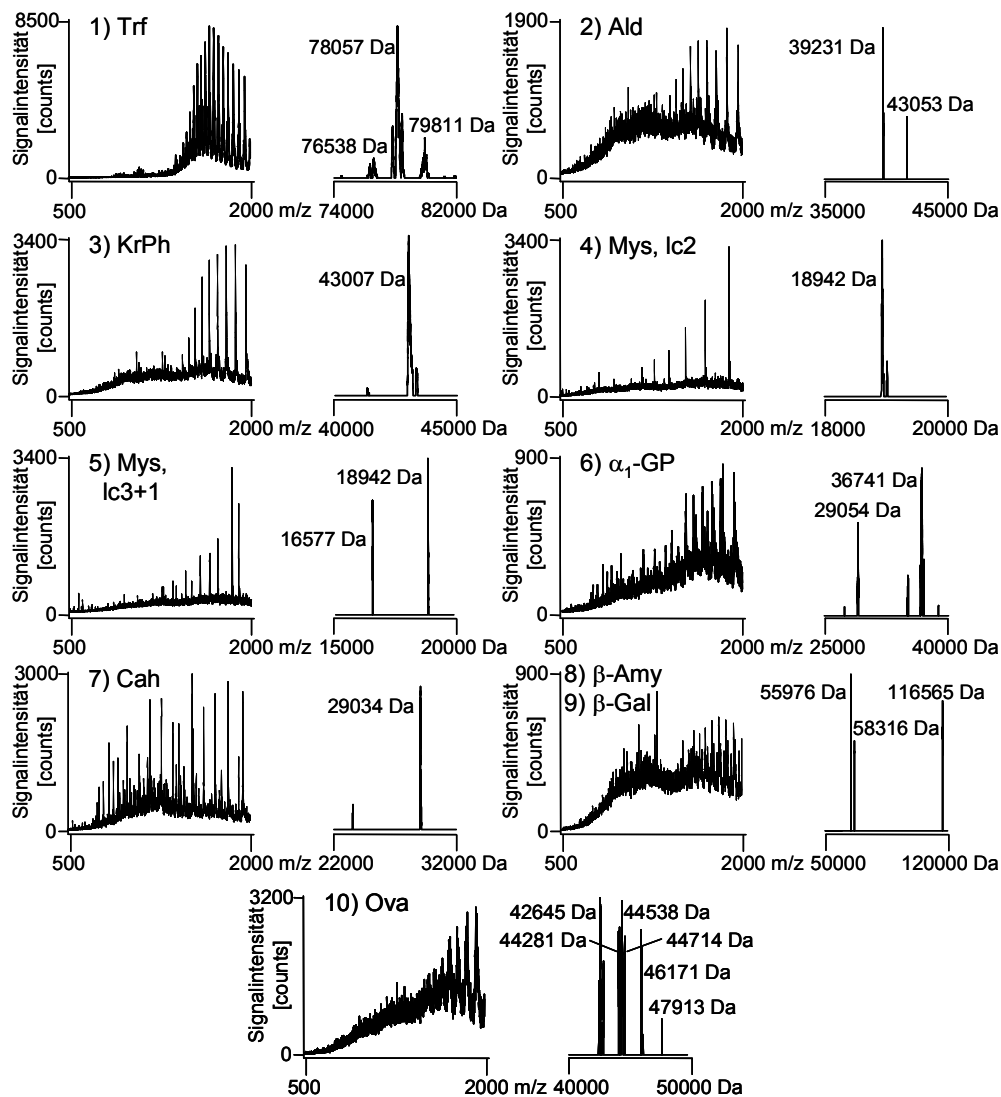


Abbildung 67: Spektren und Dekonvolutionsspektren der detektierten Proteine aus der Proteinmischung große Proteine

Die erhaltenen Chromatogramme (TIC und BPC) und Spektren der einzeln injizierten Phosphorylase b sind in Abbildung 68 gezeigt. Anhand der geringen Intensität im Phosphorylase-Spektrum verglichen mit dem Ovalbumin-Spektrum aus Abbildung 67 (Spektrum 10) konnte die Annahme bestätigt werden, dass innerhalb der Mischungsanalyse die Signale der Phosphorylase b, die im hohen Massenbereich liegen, vollständig von den Ovalbumin-Ladungszuständen überlagert wurden und die parallele Detektion beider Proteine daher nicht möglich war.

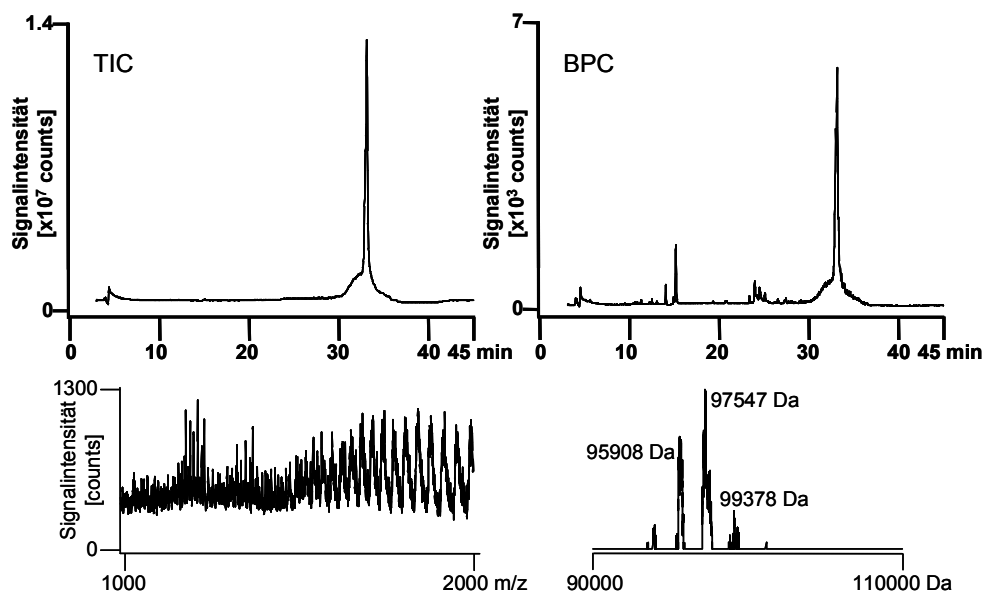


Abbildung 68: Chromatogramme TIC und BPC der Einzelinjektion von Phosphorylase b, 115 ng/ μ L, Summenspektrum und Dekonvolutionspektrum des Peaks bei 33 min

Das innerhalb dieser Mischung größte nachweisbare Protein war die β -Galactosidase mit einer Masse von 116,565 Da (theoretisch: 116,352 Da). Zur Darstellung eines charakteristischen Spektrums wurde auch dieses Protein nochmals einer Einzelinjektion unterzogen. Dabei wurden die in Abbildung 69 gezeigten Chromatogramme und Spektren erhalten. In beiden Chromatogrammen sieht man eine Aufspaltung des Signals in zwei teilweise koeluiierende, jedoch schmale Peaks und ein breites Signal. Zwischen den einzelnen Peaks konnten keine erkennbaren Massenunterschiede, die über eine potentielle Oxidation an einer Aminosäureseitenkette hinaus führen würden, festgestellt werden. Allerdings weichen die erhaltenen Massen beider Peaks von der Masse, die durch die Analyse

der Mischung ermittelt wurde, um 40 bzw. 52 Da ab. Da für dieses Protein bisher keine Modifikationsformen in der benutzten SwissProt-Datenbank bekannt sind, scheint die gemessene Abweichung von 213 Da zur theoretischen Masse auf Umsetzungen nach Extraktion oder bei der Aufreinigung zurückführbar zu sein. Diese Umsetzungen müssen nicht einheitlich immer an denselben Aminosäuren der Sequenz vorgekommen sein, so dass sie einen Einfluss auf das Retentionsverhalten des Proteins während der HPLC-Trennung haben könnten. Dies wiederum könnte eine Erklärung für die Signalteilung darstellen.

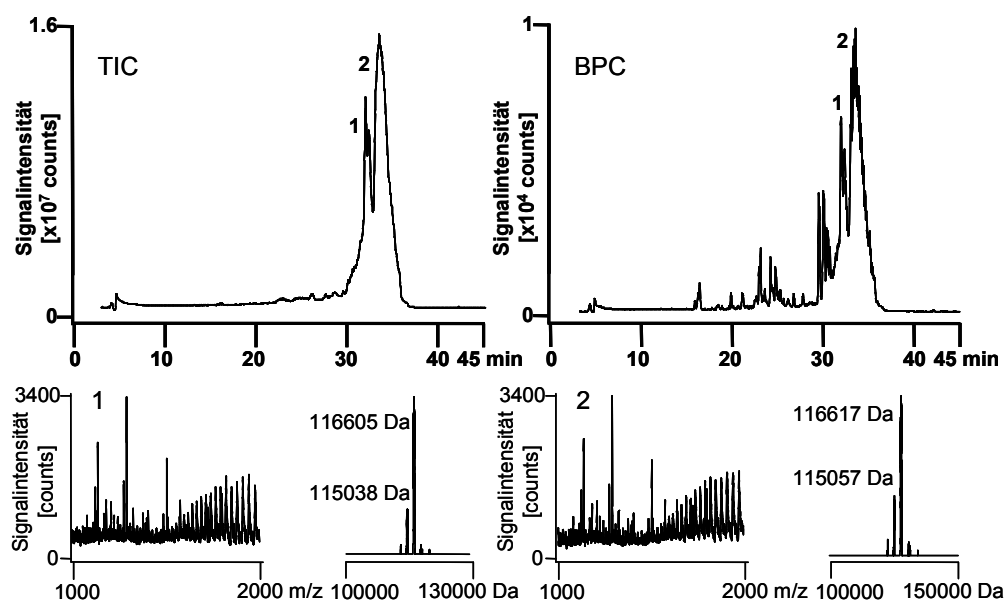


Abbildung 69: Chromatogramme TIC und BPC der Einzelinjektion von β -Galactosidase, 100 ng/ μ L, Summenspektren und Dekonvolutionspektren der Peaks 1 und 2 bei 32 bzw. 33 min

Anhand der untersuchten Proteinmischungen konnte bewiesen werden, dass sowohl die Tren- als auch die Detektionsmethode mittels Massenspektrometrie zur Analyse intakter Proteine verschiedener Größen geeignet ist. Es konnten charakteristische Spektren von Proteinen mit Massen von 5 bis 120 kDa dargestellt werden. Für die untersuchten Proteine zwischen 5 und 80 kDa wurden nutzbare Nachweisgrenzen erhalten. In Verbindung mit einer guten chromatographischen Auflösung, ggf. durch mehrdimensionale Trennmethode sollte die Analyse intakter Proteine von Proteomen weitestgehend möglich sein.

5 Darstellung modifizierter Proteine

Das Verstehen und die Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) wie Glycosylierungen und Phosphorylierungen stellen einen wichtigen Bereich innerhalb der Proteomanalytik dar ^[6-8]. Dazu müssen die PTMs jedoch detektiert und aufgelöst dargestellt werden können. In den Kapiteln 2, 3 und 4 wurden innerhalb der verwendeten Proteinstandard-Mischungen bereits einige modifizierte Proteine vorgestellt. Die Darstellung einiger ausgesuchter Proteine wird nun in diesem Kapitel etwas vertieft behandelt.

5.1 Darstellung von Transferrin

Das glycosylierte Protein Transferrin ^[9-12] wurde nach mikro-HPLC-Trennung TOF-massenspektrometrisch innerhalb der Untersuchung der 8-Proteinstandard-Mischung dargestellt (vgl. 2.3.2 und 2.4). Die Trennbedingungen wurden bereits in Tabelle 11 angegeben, die Detektionsparameter befinden sich in Tabelle 10.

Ein genauerer Blick auf die Summenspektren des Transferrinpeaks innerhalb der Analysen zeigt, dass die einzelnen Ladungszustände nicht durch einzelne Massenpeaks gebildet wurden, sondern einer Massengruppierung unterworfen sind. Um jeden deutlichen Ladungszustand waren weniger intensive Ionen erkennbar, denen nach erfolgter Dekonvolution dieselbe Ladung zugeordnet werden konnte, wie dem intensivsten Ladungszustand. Diese Verteilung ist in Abbildung 71 in der vergrößerten Ansicht der drei intensivsten Ionen des Transferrinspektrums dargestellt. Diese Unterschiede innerhalb der Ionenmassen des gruppierten Ladungszustandes wiesen auf inhomogene Modifizierung oder Isoformen des Proteins hin ^[13]. Dies wurde anhand der Dekonvolutionsmassen, in denen sich die Ionenmassenverteilung wieder fand, deutlich und es konnte eine Interpretation der Massenunterschiede anhand der Dekonvolutionsmassen durchgeführt werden. Abbildung 70 zeigt das Summenspektrum eines Transferrinpeaks im Massenbereich von 1800 bis 3000 m/z sowie die drei intensivsten Ladungszustände des Spektrums (2200 bis 2450 m/z). Das Dekonvolutionsspektrum ist in Abbildung 71 gezeigt, neben einer starken Vergrößerung des Massenbereichs auf 79000 bis 80300 Da.

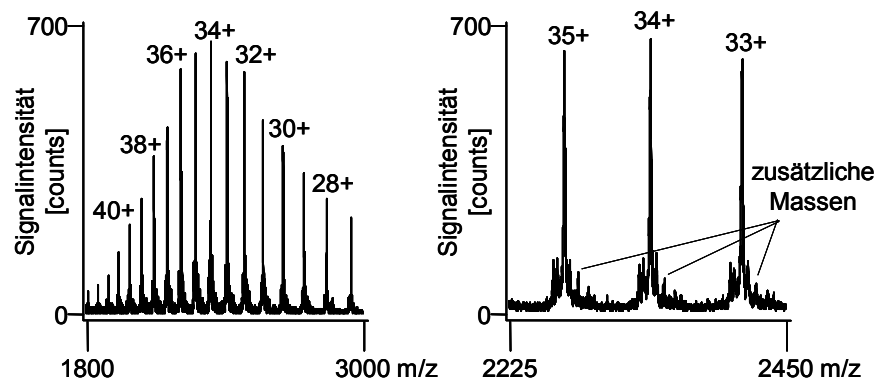


Abbildung 70: Summenspektrum von 326 fmol Transferrin und Vergrößerung der drei intensivsten Ladungszustände

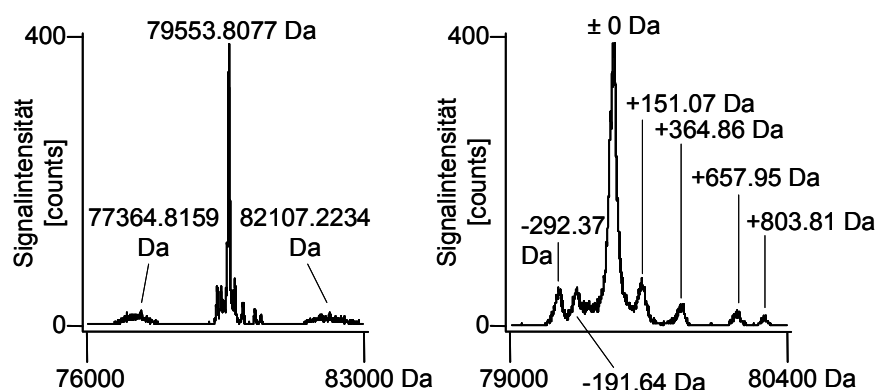


Abbildung 71: Dekonvolutionsspektrum mit annotierten Modifikationsmassen im großen Massenbereich (links) und vergrößert (rechts) mit den Differenzmassen zur theoretischen Masse

Die in Abbildung 71 gezeigten Dekonvolutionsmassen innerhalb des großen Massenbereichs (links) und ihre jeweiligen Intensitäten im Spektrum zeigten eine sehr einheitliche Modifikation des untersuchten Standardproteins. Nur geringe Mengen stark mehrfach oder geringer glycosylierter Strukturen konnten detektiert werden. Die Abweichungen der Massen gemessen an der Masse der Hauptstruktur lagen im Bereich von 2000 bis 2500 Da, was auf Unterschiede in der Glycanverteilung an der Proteinsequenz hinwies ^[13]. Dieser Ansatz wurde jedoch wegen der geringen Auflösung der unter- und überglycosylierten Proteine nicht weiter verfolgt. Aus der Vergrößerung des Dekonvolutionsspektrums in Abbildung 71 (rechts) gehen geringere Massendifferenzen hervor, die deutlich auf einzelne oder kombinierte Zuckerbausteine hinwiesen, um die sich einzelne Proteinmoleküle unterschieden. Die in Glycanen vorkommenden Zuckerbausteine ^[14] sind in

Tabelle 35 mit ihrer Masse sowie der resultierenden Massendifferenz bei Abspaltung aus dem Glycan aufgeführt.

Tabelle 35: Auflistung der in proteinrelevanten Glycanen vorkommenden Zuckerbausteinen mit ihrer Molekülmasse und Differenzmasse bei Abspaltung aus dem Glycan

Zuckerbaustein	gängige Abkürzung	Molekülmasse in Da	Differenzmasse bei Abspaltung in Da
Galactose	Gal	180.1572	163.15
Mannose	Man	180.1572	163.15
Fucose	Fuc	164.1578	147.15
Glucose	Glu	180.1572	163.15
Galactose-N-acetat	GalNAc	220.2017	203.19
Glucose-N-acetat	GluNAc	220.2017	203.19
Xylose	Xyl	150.1310	133.12
Neuraminsäure-N-Acetat	NeuNAc	309.2752	292.27

Die im Dekonvolutionsspektrum angegebenen Differenzmassen konnten den in Tabelle 35 angegebenen Zuckerbausteinen und Kombinationen aus diesen Monomeren zugeordnet werden. Monomerkombinationen entstehen bei Zuckern unter Wasserabspaltung. Die Ergebnisse der Zuordnung zeigt Tabelle 36. Eine Untersuchung der genauen Zusammensetzung der Glycanstruktur wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt.

Tabelle 36: Zuordnung von Glycanspaltstrukturen zu gemessenen Differenzmassen; eingeklammerte und mittels Schrägstrich getrennte Monomere zeigen die Austauschbarkeit dieser Zucker wegen gleicher Masse an; OH bezeichnet die Dehydroxylierung bei Zuckerabspaltung

Gemessene Differenzmasse in Da	Gemessene Dekonvolutionsmasse in Da	Zugeordnete (kombinierte) Zuckerbausteine	Theoretische Differenzmasse in Da
-292.37	79261.4416	NeuNAc	292.27
-191.64	79362.1674	--	--
+151.07	79704.8801	Fuc	147.15
+364.86	79918.6696	(Gal / Man / Glu) + (GalNAc / GluNAc)	365.34
+657.95	80211.7592	(Gal / Man / Glu) + (GalNAc / GluNAc) + NeuNAc	656.59
+803.81	80357.6163	(GalNAc / GluNAc) + 2 x NeuNAc + OH	802.7207

Bis auf die Differenz von 191.64 Da konnten alle Massendifferenzen verschiedenen Möglichkeiten von Zuckerkombinationen zugeordnet werden. Die genaue Massendarstellung kann somit auch Informationen bezüglich der Modifikationsgrade von Glycanen liefern.

5.2 Darstellung von Ovalbumin

Ovalbumin besitzt neben einer bekannten Glycosylierungsstelle (Asn 292) auch zwei potentielle Phosphorylierungsstellen (Ser 68 und 344) sowie eine Acetylierung an Position 1 der Sequenz (Gly 1). Es liegt nativ somit mehrfach modifiziert vor, was die Komplexität des Proteins vergrößert ^[15]. Anhand dieses Proteins wurde versucht,

eine vollständige Glycananalyse anhand der intakten Proteinsequenz durchzuführen [16].

Das untersuchte Ovalbumin wurde in denaturierter und reduzierter Form mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS analysiert. Parallel wurde eine Deglycosylierung mit dem Enzym PNGase F durchgeführt, das spezifisch N-glycosylierte Glycane von Proteinen abspaltet, sofern die Glycanbausteine keine Fucoseeinheiten besitzen [17,18]. Dazu wurden 90 μL einer 480 $\text{ng}/\mu\text{L}$ enthaltenden Lösung von Ovalbumin in Wasser mit 5 μL einer wässrigen Lösung aus 2 % Octyl- β -D-glucopyranosid mit 100 mM Mercaptoethanol für 30 min bei 100°C denaturiert und enthaltene Disulfidbrücken reduziert. Nach Zugabe von 5 μL Ammoniumbicarbonat-Lösung (20 mM) wurde der Reaktionsansatz geteilt. Zu einem Aliquot wurden 5 μL Wasser gegeben und die glycosylierte Form des Proteins analysiert. Zu dem anderen Aliquot wurden 5 μL PNGase F-Enzymlösung zugegeben. Die Lösung wurde 10 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte eine Erhitzung der Lösung auf 100°C für 10 min zur Inaktivierung des Enzyms. Mit dieser Lösung wurde anschließend die deglycosylierte Form des Ovalbumins untersucht.

Alle zur Reaktion verwendeten Lösungen stammen aus dem in Kapitel 1.2 angegebenen Deglycosylierungs-Kit. Die zwei Lösungen (glycosyliert und deglycosyliert) hatten eine Konzentration von 432 $\text{ng}/\mu\text{L}$ und wurden mit neun Teilen Wasser verdünnt und injiziert. Tabelle 37 zeigt die Trennparameter der Analyse, Tabelle 38 gibt die massenspektrometrischen Einstellungen für diese Untersuchungen an.

Tabelle 37: Chromatographie-Bedingungen zur Trennung und Untersuchung des Ovalbumins

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: 50°C
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril

Tabelle 37 (Fortsetzung)

- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 30 min
- Säulenfluss: 2 µL/min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 3 µL

Tabelle 38: MS-Parameter zur Ovalbuminanalyse

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.4 bar	Pulsar Push/Pull	771 V / 0 V
Dry Gas	4.0 L/min	Corrector Fill	53 V
Dry Temperature	200 °C	Reflector	1688 V
End plate offset	-600 V	Flight Tube:	8612 V
Capillary	3000 V	Corrector Extract	555 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	2140 V

Parameter der Ionenoptik

Capillary exit	184.1 V	Lens 1 storage	50.0 V
Skimmer 1	61.9 V	extraction	21.0 V
Hexapole 1	46.0 V	Lens 2	-9.5 V
Skimmer 2	7.9 V	Lens 3	30.2 V
Hexapole 2	27.0 V	Lens 4	-15.0V
Hexapole RF	660.8 V	Lens 5	-46.0 V
Pre Puls Storage Time	20.0 µs	Focus	aktiv
		Transfer Time	88.0 µs

In Abbildung 72 sind die TICs beider Proben vergleichend dargestellt. Es fielen in beiden Probenchromatogrammen breite Peaks mit einer anschließenden Plateaubildung auf. Dies wies darauf hin, dass die Darstellung behandelte (extern denaturiert, reduziert) jedoch intakter Proteine keine eindeutigen Chromatogramme liefert und die Detektierbarkeit der Proteine stark herabsetzte, was auch durch die Summenspektren dieser Peaks bestätigt wurde. Die Summenspektren der Peaks beider Untersuchungen sind in Abbildung 73 dargestellt.

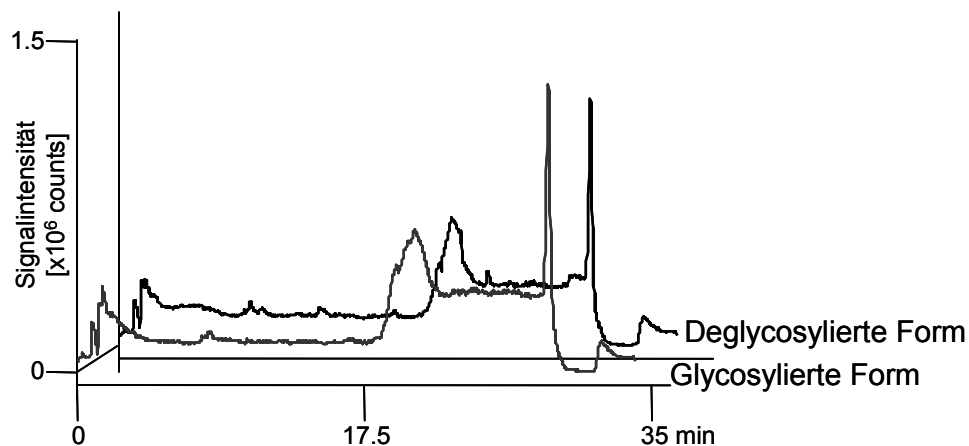


Abbildung 72: TICs der Ovalbuminanalyse; glycosylierte (vorne) und deglycosylierte Form (hinten)

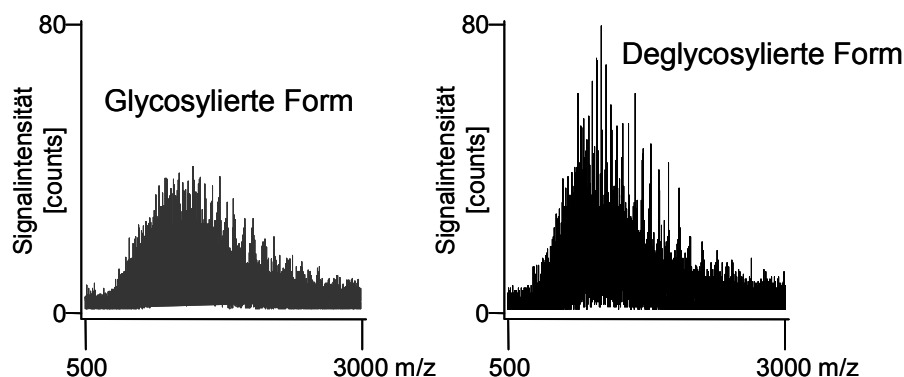


Abbildung 73: Darstellung der Summenspektren der glycosylierten (links) und der deglycosylierten Form (rechts) des Ovalbumins

In beiden Summenspektren waren zwar Ladungszustände erkennbar, jedoch waren diese undeutlich und ihre Intensität war viel geringer als es bei dieser Konzentration an injiziertem Protein zu erwarten war. Die deglycosylierte Form zeigte entgegen der nur reduzierten Form eine doppelte Intensität bei gleicher Konzentration, was mit der Strukturhomogenisierung durch die Abspaltung der Glycane erklärt werden konnte. Die Dekonvolution beider Summenspektren gestaltete sich aufgrund der geringen Intensitäten der Ladungszustände und der schlechten, Rausch-nahen Auflösung der Ionen schwierig. Durch die Wahl niedriger Schwellwerte für die Massenpeakerkennung durch den Dekonvolutionsalgorithmus *maximum entropy* konnte die Ermittlung und Darstellung der intakten Masse jedoch erfolgen. Die

erhaltenen Dekonvolutionsmassen sind anhand ihrer Spektren in Abbildung 74 gezeigt.

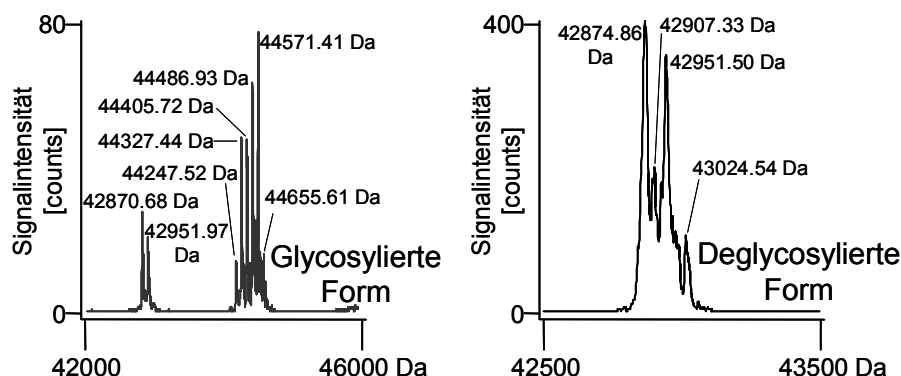


Abbildung 74: Dekonvolutionspektren der Ovalbuminanalysen; glycosylierte (links) und deglycosylierte Form (rechts) mit annotierten Massen

Durch Vergleiche der gemessenen Massen untereinander und mit der theoretischen Sequenzmasse in reduzierter Form ließen sich aus diesen Analysen Aussagen über den Glycosylierungs- und Phosphorylierungsgrad des vorliegenden Ovalbumins treffen. Tabelle 39 fasst die gemessenen und zur Berechnung benötigten theoretischen Massen nochmals zusammen.

In beiden Proben zeigten sich Massen, die zur theoretischen Masse Differenzen von etwa 80 und 160 Da aufwiesen. Die Massendifferenz 80 Da entspricht dem Verlust eines Phosphates durch Hydrolyse und wies somit auf Phosphorylierungen hin. Da in keiner untersuchten Probe genau die theoretische Masse ermittelt wurde, konnte sicher gesagt werden, dass das untersuchte Ovalbumin mindestens einfach phosphoryliert war.

Die in der Analyse der deglycosylierten Form aufgetretene Massendifferenz von 115 Da wies auf das Vorliegen von Strukturen hin, in denen Methioninreste zu Sulfonylresten oxidiert vorlagen. Durch Bezug der Oxidation (+31.99 Da) auf die gemessene Masse 42874.86 Da (einfach phosphoryliert) konnte auf die in derselben Analyse ermittelte Masse 42907.33 Da als oxidierte Form geschlossen werden. Die Massendifferenz von 232.46 Da konnte nicht sicher einer Modifikation zugeordnet werden, es könnte sich jedoch um eine weitere Phosphorylierung handeln, die jedoch nicht sicher belegt wurde.

Tabelle 39: relevante Massen (theoretisch und gemessen) sowie Differenzmassen zur theoretischen Masse aus den Ovalbuminuntersuchungen

Theoretische Masse in Da	42750.04	inkl. Acetylierung an Gly 1 in Da	42792.08
Probe	Gemessene Massen in Da	Differenz zur theoretischen Masse in Da	
glycosylierte Form	42870.68	78.60	
	42951.97	159.89	
	44247.52	1455.44	
	44327.44	1535.36	
	44405.72	1613.64	
	44486.93	1694.85	
	44571.41	1779.33	
	44655.61	1863.53	
deglycosylierte Form	42874.86	82.78	
	42907.33	115.25	
	42951.50	159.42	
	43024.54	232.46	

Neben den rein phosphorylierten Strukturen wurden in der glycosylierten Probe auch sechs verschiedene Massen detektiert, die aufgrund der Größe ihrer Differenz zur theoretischen Masse auf unterschiedliche Glycanstrukturen hinwiesen. Nach Suzuki et al. ^[15] sollten die Glycane des Ovalbumins hauptsächlich aus Galactose und Mannose, sowie Glucose-N-acetat und Neuraminsäure-N-acetat aufgebaut sein und Glycanmassen von 2800 bis 3600 Da besitzen.

In Tabelle 40 sind die in den untersuchten Proben gefundenen Massen mit Glycan-Strukturvorschlägen angegeben, die sich durch die Differenzmassen (vgl. Tabelle 39) und Zuckerkombinationen (Monomermassen vgl. Tabelle 35) berechnen ließen. Die genaue Zusammensetzung, Reihenfolge und der Verknüpfungs-Kohlenstoff an den Zuckermomeren wurde nicht untersucht. Auch wurden keine Unterscheidungen getroffen zwischen den Zuckern (Glucose, Mannose und Galactose) und acetylierten Amino-Zuckern (GalNAc, GlcNAc) mit gleicher Masse.

Tabelle 40: Mögliche Zusammensetzung der Glycane durch Berechnung der Massendifferenzen mit den Zuckerbaustein-Massen; eingeklammerte und mittels Schrägstrich getrennte Monomere zeigen die Austauschbarkeit dieser Zucker wegen gleicher Masse an; Phos bezeichnet Phosphorylierungen; Ox bezeichnet die Methionin-Schwefel-Oxidation zur Sulfongruppe

Probe	Gemessene Massen in Da	Modifikation
glycosylierte Form	42870.68	Phosphorylierung, einfach
	42951.97	Phosphorylierung, doppelt
	44247.52	4(Gal/Glc/Man) + 2(GlcNAc/GalNAc) + 1 NeuNAc + 1 Phos + 1 Ox
	44327.44	4(Gal/Glc/Man) + 2(GlcNAc/GalNAc) + 1 NeuNAc + 2 Phos + 1 Ox
	44405.72	5(Gal/Glc/Man) + 2(GlcNAc/GalNAc) + 1 NeuNAc + 1 Phos + 1 Ox
	44486.93	5(Gal/Glc/Man) + 2(GlcNAc/GalNAc) + 1 NeuNAc + 2 Phos + 1 Ox
	44571.41	6(Gal/Glc/Man) + 2(GlcNAc/GalNAc) + 1 NeuNAc + 1 Phos + 1 Ox
	44655.61	6(Gal/Glc/Man) + 2(GlcNAc/GalNAc) + 1 NeuNAc + 2 Phos + 1 Ox
deglycosylierte Form	42874.86	Phosphorylierung, einfach
	42907.33	Phosphorylierung, einfach Oxidation an Met
	42951.50	Phosphorylierung, doppelt
	43024.54	Unbekannt, ggf. Phosphorylierung, dreifach

Anhand dieser Analyse konnten sowohl einfach als auch zweifach phosphorylierte Proteinketten durch Massenvergleiche nachgewiesen werden. Das gebundene Glycan trat bei diesem Protein in drei Formen auf: ein Baustein Neuraminsäure-N-acetat, ein Baustein acetylierte Hexose und entweder 4, 5 oder 6 weitere Hexosen, deren Verknüpfung untereinander nicht aufgeklärt wurde.

Die Massen der glycosylierten Probe wiesen einheitlich auf Oxidationen von Methionin hin, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Aufbereitung der Probe

(Denaturierung und Reduktion) entstanden sind. In der deglycosylierten Probe wurde ebenfalls eine Oxidation-enthaltende Masse detektiert, allerdings wurden nichtoxidierte Formen mit höheren Intensitäten gemessen. Da sich die Proben nur durch die weitere Aufbereitung nach der Reduktion unterscheiden, mussten diese Unterschiede ab diesem Reaktionsschritt aufgetreten sein.

Untersuchungen der unbehandelten, nativen Form des Ovalbumins wurden innerhalb der Proteinstandard-Mischung große Proteine in Kapitel 4.1 durchgeführt. Da diese Messungen für die anstehenden Berechnungen nicht relevant waren, wurden sie hier nicht weiter behandelt. Es sollte allerdings bemerkt werden, dass die Detektierbarkeit des Ovalbumins bereits durch die Vorbehandlung (Reduktion) gegenüber nativ untersuchtem Ovalbumin stark verringert wurde. Soweit solche Umsetzungen auch den Informationsgehalt von Analysen erhöhen können, so muss innerhalb der Analytik intakter Proteine an dieser Stelle auch die Einbuße von Detektierbarkeit, Intensität und Nachweisgrenzenverschlechterung Beachtung finden und ggf. in Kauf genommen werden.

6 Chromatofokussierung von Proteinen

Die Chromatofokussierung (CF) bildet das chromatographische Pendant zur elektrophoretischen Trennung durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) ^[19-21], die bereits lange Zeit innerhalb der Proteinanalytik als etablierte Methode zur Proteintrennung gilt. In Anlehnung an eine bereits bestehende Chromatofokussierungsmethode ^[21] wurden verschiedene Untersuchungen die Zusammensetzung der Eluenten betreffend durchgeführt und anhand der Reproduzierbarkeit des pH-Gradienten sowie der Standardproteintrennung nach UV-Detektion charakterisiert. Auf dem Hintergrund, diese Methodik als Vortrennungsmethode innerhalb der mehrdimensionalen Proteomanalyse auf intakter Proteinbasis einsetzen zu wollen, wurde verstärkt auf einen geringen Gehalt an Puffersubstanzen und einen größtmöglichen pH-Bereich geachtet. Geringe Pufferkonzentrationen haben den Vorteil, dass vor der MS-Analyse nicht nötigerweise eine Aufreinigung mittels Dialyse oder Ultrazentrifugation erfolgen muss. Außerdem wurde durch die Verwendung eines gering-dimensionierten, analytischen Geräteaufbaus darauf hin gearbeitet, geringste Probenmengen in kleinen Volumina fraktionieren zu können und so die Nachweisgrenze innerhalb der Fraktionen bei der Analyse in zweiter Dimension zu minimieren.

6.1 Untersuchung und Auswahl der Pufferzusammensetzung

Ausgehend von der Veröffentlichung nach Greibrokk et al. ^[21] wurde eine Pufferzusammensetzung bestehend aus Imidazol, Trizma, Piperazin, Methylpiperazin, Ethanolamin und Diethanolamin mit Konzentrationen von jeweils 10 mM auf Linearität und Reproduzierbarkeit des pH-Wertes untersucht. Die pK_s-Werte und Pufferbereiche der Amine sind in Tabelle 41 dargestellt. Als stationäre Phase diente eine ProPac SAX-10 Säule mit 4 mm Innendurchmesser und 250 mm Länge, außerdem wurde eine 50 mm-Vorsäule verwendet. Die Amine wurden nach dem Lösen in Wasser mit Phosphorsäure (etwa 10 %ig) auf pH 11 (Eluent A) und pH 3 (Eluent B) titriert. Nach Zugabe des organischen Additivs wurde mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die pH-Veränderung erfolgte durch lineare Änderung der Eluentenzusammensetzung bei Raumtemperatur und einem Fluss von 1 mL/min.

Tabelle 41: Pufferbereiche und Säurekonstanten (pK_s-Werte) der Pufferkomponenten

Pufferamin	pK _s	pH-Pufferbereich
Imidazol	6.95	6.2 - 7.8
Trizma	8.10	7.0 - 9.0
Methylpiperazin	8.98	8.0 - 9.5
Diethanolamin	8.88	8.0 - 9.5
Ethanolamin	9.50	9.0 - 10.2
Piperazin	9.71	9.0 - 10.5

Als organisches Additiv wurden 10 % Ethanol ^[21] und verschiedene Anteile an Methanol der wässrigen Pufferlösung zugesetzt. Mit den in Tabelle 42 angegebenen Kompositionen wurden die in Abbildung 75 dargestellten pH-Gradienten erzielt.

Tabelle 42: Zusammensetzung der CF-Eluenten zur Ermittlung des optimalen organischen Modifiers

<i>Gradient-Index</i>	Pufferamine	organisches Additiv	pH-Bereich
1	jeweils 10 mM	10 % Ethanol	11 - 3
2	jeweils 10 mM	5 % Methanol	11 - 3
3	jeweils 10 mM	10 % Methanol	11 - 3
4	jeweils 10 mM	15 % Methanol	11 - 3

Es zeigte sich bei der Verwendung von Ethanol als Additiv (vgl. Abbildung 75, Gradient 1) ein Gradientenverlauf, der für Trennungen nicht verwendet werden konnte. Auch die Reproduzierbarkeit des Gradientenverlaufs war im Vergleich zur Verwendung von Methanol (vgl. Abbildung 75, Gradient 2, 3, 4) nicht gegeben. Die Kompositionen mit 10 und 15 % Methanol zeigte die besten Reproduzierbarkeiten und wurden daher als organisches Additiv für alle folgenden CF-Anwendungen verwendet.

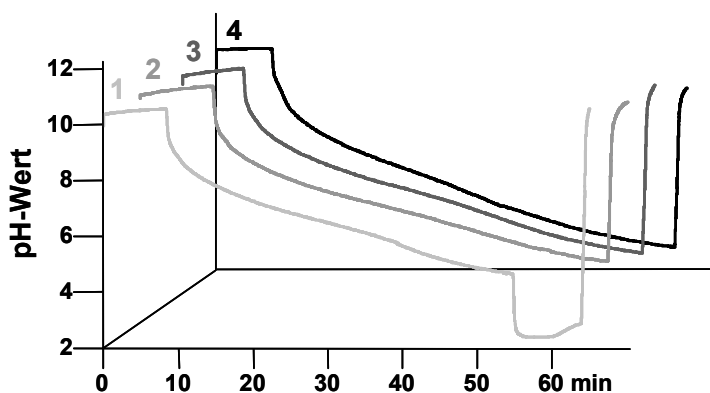


Abbildung 75: pH-Gradientenverläufe bei Anwesenheit verschiedener Anteile organischer Additive: 1) 10 % Ethanol, 2) 5 %, 3) 10 %, 15 % Methanol

Gradient: 0-100 % Eluent B linear in 60 min; Eluent A: pH 11, Eluent B: pH 3

Als weitere Optimierung erfolgte die Minimierung der Aminanzahl im Puffer. Dazu wurden verschiedene Zusammensetzungen von Aminen (jeweils 10 mM) in Wasser gelöst, der pH-Wert der Eluenten auf 11 und 3 mit Phosphorsäure eingestellt und mit 15 % Methanol versetzt. Auch diese Kompositionen wurden anhand der pH-Gradientenverläufe charakterisiert. Tabelle 43 fasst die Ergebnisse und Einschätzung der Kompositionen anhand der Reproduzierbarkeit und Linearität der Gradienten zusammen.

Tabelle 43: Wirkung verschiedener Amine als Pufferkomposition für CF-Eluenten

Pufferkombination	Gradient-Linearität	Reproduzierbarkeit
Ethanolamin, Diethanolamin, Trizma, jeweils 10 mM	unbefriedigend	unbefriedigend
Ethanolamin, Diethanolamin, jeweils 10 mM, Trizma, 20 mM	unbefriedigend	unbefriedigend
Piperazin, Methylpiperazin, Trizma, jeweils 10 mM	durchschnittlich	unbefriedigend
Piperazin, Methylpiperazin, jeweils 10 mM, Trizma, 20 mM	durchschnittlich	gut
Imidazol, Piperazin, Trizma, jeweils 10 mM	gut	gut
Imidazol, Piperazin, jeweils 10 mM, Trizma, 20 mM	gut	gut

Aufgrund dieser Ergebnisse zeigte sich die bevorzugte Verwendung von Imidazol, Piperazin und Trizma, wobei weitere Additive die Eignung nicht herabsetzten. Das Fehlen oder der Austausch eines dieser Amine hatte jedoch sichtbar negativen Einfluss auf den Gradientenverlauf. Da die Anzahl und Konzentration in Hinsicht auf die Reinjektion in ein RP-HPLC-MS-System gering gehalten werden sollte, konnte die Zusammensetzung aus Imidazol, Piperazin und Trizma als optimierte Komposition in einer Gesamtaminkonzentration von 30 mM (10 mM je Amin) gewertet werden.

Abbildung 76 zeigt vergleichend eine 7fache Messung des pH-Gradienten der beschriebenen Eluentenkomposition. Es zeigte sich neben guter Linearität eine akzeptable Wiederholbarkeit. Vergleichbare pH-Gradienten wurden auch mit einem 10 %igen Methanolanteil erhalten.

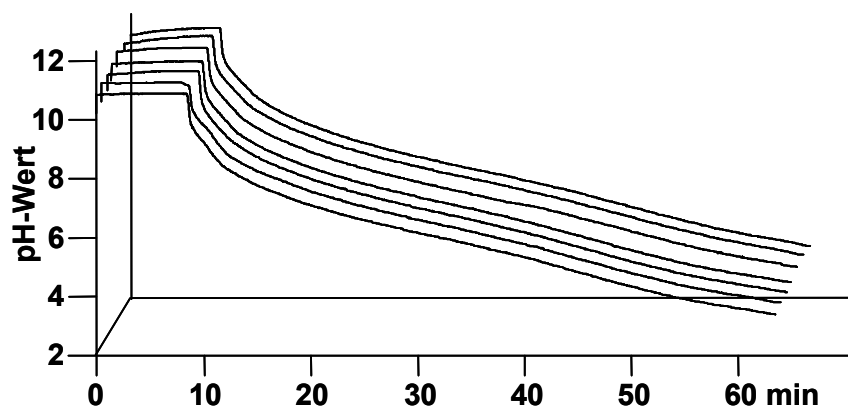


Abbildung 76: Darstellung von 7 Gradientenverläufen einer Eluentenkomposition aus jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin und Trizma sowie 15 % Methanol, pH 11 und 3 eingestellt mit Phosphorsäure, linearer Gradient von pH 11 bis 3 in 60 min

Es wurden parallel zu den pH-Verlaufsanalysen Trennungen einer Lysozym, Cytochrom C, Myoglobin und Ovalbumin enthaltenden Proteinstandard-Mischung mit den verschiedenen Eluentenkompositionen durchgeführt. Die Proteine hatten jeweils eine Konzentration von 1.3 mg/mL und deckten anhand des pI-Vergleichs den gesamten pH-Bereich des Gradienten ab:

Lysozym	pI 11.0	basisch
Cytochrom C	pI 9.5	basisch
Myoglobin	pI 7.4	neutral
Ovalbumin	pI 5.2	sauer

Die Detektion der Analyte erfolgte durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm. Anhand dieser Trennungen zeigte sich unter Verwendung jeder Pufferkomposition eine sehr gute Abtrennung des sauren Ovalbumins von den übrigen Proteinen. Die basischen Proteine Lysozym und Cytochrom C koeluierten erwartungsgemäß in allen Trennungen, aufgrund des pH-Sprungs zu Beginn der Eluentenabmischung. Dieser Sprung ist durch die Pufferkapazität der stationären Phase bedingt und wurde bei Verwendung jeder untersuchten Eluentenzusammensetzung beobachtet [22]. Als kritisches Protein hat sich das neutrale Myoglobin erwiesen. Dieses lässt sich je nach Eluentenzusammensetzung besser oder schlechter von den basischen Proteinen abtrennen, eluiert jedoch weitaus zu früh gemessen an seinem pI und dem zur Elution anliegenden pH-Wert. Allerdings konnte aufgrund des Verhaltens des Myoglobins der Einfluss der organischen Komponente untersucht werden.

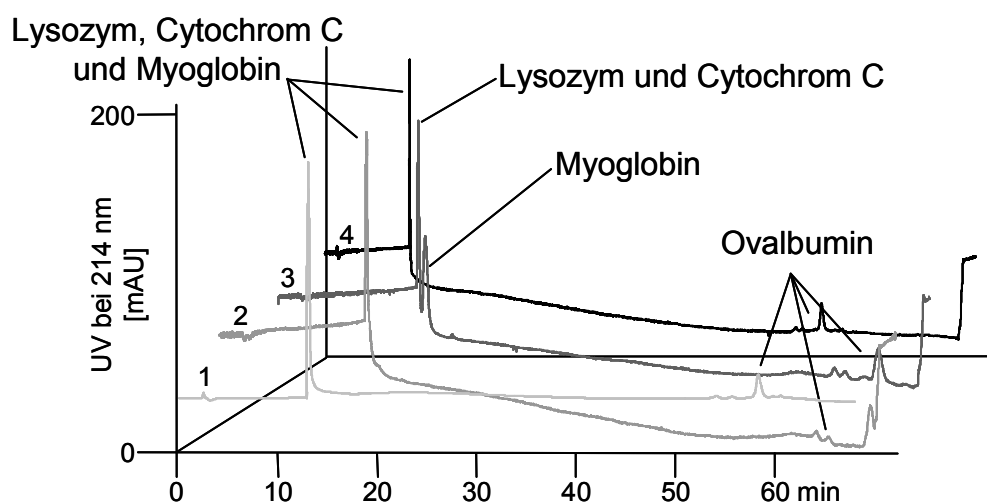


Abbildung 77: Chromatofokussierung von jeweils 1.3 mg/mL Lysozym, Cytochrom C, Myoglobin und Ovalbumin von pH 11 bis 3 linear in 60 min mit verschiedenen Eluentenkompositionen; 1) 60 mM Aminpuffer aus jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma, Methylpiperazin, Ethanolamin, Diethanolamin mit 15 % Methanol, 2-4) 30 mM Aminpuffer aus jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma mit 5 % Methanol (2), 10 % Methanol (3), 15 % Methanol (4); Injektionsvolumen: 20 μ L

Durch die Anwesenheit einer großen Menge Methanol (15 % in Abbildung 77, Gradient 1 und 4) zeigt sich eine raschere Elution aller analysierten Proteine durch abnehmende Retentionszeiten. Der umgekehrte Effekt konnte bei geringen

Methanolanteilen (5 % in Abbildung 77, Gradient 2) beobachtet werden, wodurch auf solvophobe Restwechselwirkungen zwischen den Analyten, der mobilen Phase und dem Trägermaterial der stationären Phase (hydrophil beschichtetes PS/DVB) geschlossen werden konnte. Diese hydrophoben Effekte sollten bei einer Ionenaustauschphase durch optimierte Belegung des Trägermaterials mit den Ionenaustauschfunktionalitäten minimal sein ^[23]. Außerdem trat bei einem Methanolanteil von 5 % eine starke Verbreiterung des Ovalbuminpeaks auf, was die Detektion erschwerte.

Im Vergleich dazu wurde mit einem Methanolanteil von 10 % eine gute Trennung über die gesamte Gradientendauer mit einem diskreten Peak für das Ovalbumin beobachtet. Außerdem erfolgte eine Antrennung zwischen den basischen Proteinen und dem Myoglobin, was gleichermaßen auf eine Minimierung der solvophoben Wechselwirkungen und eine übertragbarere Trennung anhand des pI-Wertes schließen ließ ^[23]. Aus diesem Grund wurden 10 % Methanol als optimaler Zusatz organischen Modifiers ausgewählt und alle weiteren Untersuchungen mit dieser Eluentenzusammenstellung durchgeführt. Einen Überblick über die Methode gibt Tabelle 44.

Tabelle 44: Optimierte Chromatofokussierungsmethode

- | | |
|----------------------|--|
| ➤ Vorsäule: | ProPac SAX-10, 50x4 mm |
| ➤ Trennsäule: | ProPac SAX-10, 250x4 mm |
| ➤ Trenneluenten: | A: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 11 (ohne Einstellung)
B: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 3 mit Phosphorsäure |
| ➤ Säulenfluss: | 1 mL/min |
| ➤ Gradient: | linear 0-100 % Eluent B in 60 min |
| ➤ Trenntemperatur: | Raumtemperatur |
| ➤ Injektionsvolumen: | 20 µL |
| ➤ Detektion: | UV bei 214 nm
pH-Durchfluss-Messung (Gradientprüfung) |

6.2 Miniaturisierung - *Downscaling* auf 2 mm-Säuleninnendurchmesser

In Hinblick auf die Benutzung der Methode zur Fraktionierung biologischer Proben musste zur Minimierung der Nachweisgrenze eine Miniaturisierung der Methodik und des Systems erfolgen. Die Halbierung des Säuleninnendurchmessers hatte ebenfalls eine Reduzierung der Eluentenmenge durch Verkleinerung des Flusses zur Folge, dementsprechend konnte bei Fraktionennahme nach Zeit ein geringeres Volumen gesammelt und die Fraktion potentiell dadurch zügiger aufkonzentriert oder aufbereitet werden. Es ergab sich bei diesem Vorgehen ein *Downscaling*-Faktor f von 1:4, um den die einzelnen Stationen der Trennung korrigiert werden mussten. Tabelle 45 zeigt die berechneten und optimierten Werte für das 2 mm-Setup der Methode.

Tabelle 45: Berechnete und praktisch angewendete Parametergrößen zur Miniaturisierung der Methode

Parameter	Methode mit 4 mm i.D.-Säule	Berechnete Größe mit <i>Downscaling</i> -Faktor f	Optimierte und angewendete Größe
Injektionsvolumen	20 μ L	5 μ L	20 μ L
Säuleninnendurchmesser	4 mm	2 mm	2 mm
Fluss	1.0 mL/min	0.25 mL/min	0.35 mL/min
Detektorzelle	1 μ L	250 nL	1 μ L

Es wurde für alle Parameter aus verschiedenen Gründen von den berechneten Werten abgesehen:

Das Injektionsvolumen wurde bei 20 μ L belassen, da nach durchgeführter Injektion noch keine Volumensüberladung der 2 mm-Säule erkennbar war. Dadurch konnten bei Vergleichen zwischen den zwei Methoden dieselbe Analytmenge und dasselbe Injektionsvolumen untersucht werden, was einen direkten Vergleich der erhaltenen UV-Chromatogramme mit beiden Methoden zuließ.

Die Reduzierung des Flusses auf 0.25 mL/min war zur Minimierung des benötigten Eluentenvolumens ein positiver Effekt. In Hinblick auf zeitliche Fraktionierungen von Proben bestand hierbei jedoch das Problem, definierte Volumina kleinster Mengen

exakt zu entnehmen. Da Tropfenvolumina teilweise stark variieren, ist eine größere Sicherheit bei der Fraktionennahme gegeben, wenn größere Volumina entnommen werden können und die Variationen der Tropfengröße somit ausgeglichen werden.

Die Verwendung der 1 μL Detektorzelle war darin begründet, dass eine 250 nL-Zelle nicht zur Verfügung stand. Die nächst-kleinere, verfügbare Zelle hatte ein Volumen von 45 nL, was im Gesamtsystem einen zu starken Gegendruck erzeugt und die Trennung negativ beeinflusst hätte. Da ein aufgezeichnetes UV-Chromatogramm im Falle von Fraktionierungen nur eine Art Überblick über die Substanzverteilung im Eluat geben sollte und nicht nötigerweise diskrete Peaks erzielt werden mussten, konnte eine potentielle Bandenverbreiterung durch ein zu hohes Detektorzellvolumen in Kauf genommen werden. Wie sich letztlich herausstellte, wurden jedoch trotz des nicht exakt eingestellten Zellvolumens diskrete Peaks mit akzeptabler Breite detektiert.

Als eine weitere Neuerung neben der kleineren Dimensionierung wurde eine Injektionswartezeit von 10 min eingeführt. Aufgrund der Überwindung der Pufferkapazität der Säule zu Beginn des Gradienten verzögerte sich der messbare Start der pH-Änderung um etwa 10 min. Da in dieser Zeit keine effektive Trennung bzw. Elution von Analyten erfolgte, was in Abbildung 77 deutlich zu erkennen war, wurden Injektionen bei Minute 10 nach Gradientstart durchgeführt. Trotz dieser Verzögerung eluierten die basischen Proteine noch vor Ablauf weiterer 5 min. Durch diese Verzögerung wurde somit kein Einfluss auf die eigentliche Trennung genommen, die Zeit potentieller Fraktionennahme wurde jedoch um die ersten 10 min der Trennmethode verringert.

Auch wurden Versuche unternommen, die Gradientmethode zu verkürzen, woraus ein linearer Gradient von pH 11 bis 3 in 30 min resultierte, der schmale und diskrete Peaks über den größten Teil der Gradientenlaufzeit zeigte.

Die miniaturisierte Methode wurde anhand einer Proteinmischung aus 20 Proteinen verschiedener Massen, pI-Werte und Modifikationen vergleichend zur nicht-miniaturisierten Methode getestet. Tabelle 46 gibt die verwendeten Methodenparameter der miniaturisierten Methode an (vgl. Tabelle 44 für die 4 mm i.D.-Methode), Tabelle 47 zeigt die Zusammensetzung der untersuchten Proteinstandard-Mischung

Tabelle 46: Trennparameter der miniaturisierten 2 mm i.D.-CF-Methode

- Vorsäule: ProPac SAX-10, 50x2 mm
- Trennsäule: ProPac SAX-10, 250x2 mm
- Trenneluenten: A: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 11 (ohne Einstellung)
B: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 3 mit Phosphorsäure
- Säulenfluss: 0.35 mL/min
- Gradient: linear 0-100 % Eluent B in 30 min
- Trenntemperatur: Raumtemperatur
- Injektionsvolumen: 20 µL
- Detektion: UV bei 214 nm
pH-Durchfluss-Messung (Gradientprüfung)

Die 20-Proteinstandard-Mischung wurde mit den beiden vorgestellten CF-Methoden (4 mm i.D. und 2 mm i.D.) untersucht, wobei die Flussrate zur Erniedrigung von Fraktionenvolumina in der 4 mm i.D.-Methode auf 0.5 mL/min reduziert wurde. Abbildung 78 zeigt die mittels beider Methoden erhaltenen pH-Gradientenverläufe.

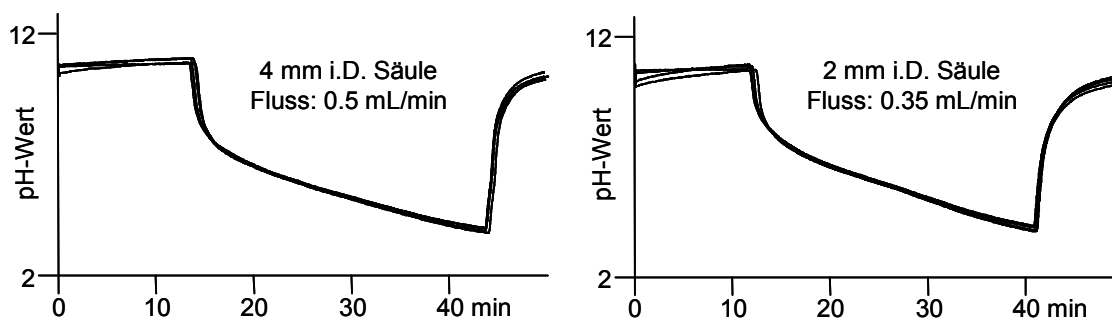


Abbildung 78: pH-Gradienten bei jeweils 3facher Durchführung auf 4 mm i.D. (links) und 2 mm i.D. Säule (rechts); pH 11 bis 3 linear in 30 min

Tabelle 47: Zusammensetzung der 20-Proteinstandard-Mischung mit theoretischer Masse und theoretischem pI-Wert (beide nach SwissProt-Datenbank, vgl. 1.2) sowie der untersuchten Konzentration

Protein	Theoretische Masse in Da	Theoretischer pI-Wert	Konzentration in mg/mL
Serumalbumin (Rind)	66433	5.6	2.40
Serumalbumin (Mensch)	66438	5.7	1.76
Insulin	5808	5.4	1.52
Ovalbumin	43114	4.7	6.64
α-Chymotrypsinogen	25656	8.5	1.04
β-Casein	22700 (ohne Modifikationen)	4.9	2.00
Conalbumin	75800	6.7	0.64
Hämoglobin a	15052	8.2	2.14
Hämoglobin b	15953	7.0	2.26
α_1-acid-Glycoprotein	21560 (ohne Modifikationen)	5.0	1.44
Cytochrom c	12230	9.5	0.80
β-Lactoglobulin A	18365	5.2	0.48
β-Lactoglobulin B	18277	5.2	1.04
Trypsin	23292	8.7	1.52
Carboanhydrase	29024	6.4	0.64
Myoglobin	16951	7.0	1.12
Lysozym	14306	11.0	1.20
Ribonuklease A	13682	9.5	1.44
Transferrin	79561	6.5	0.64
α-Lactalbumin	14178	4.3	1.04

Abbildung 79 zeigt jeweils eine Trennung der 20-Proteinstandard-Mischung je benutzter Methode (2 mm i.D. und 4 mm i.D.). Es zeigte sich, dass die Flusserniedrigung in der höher-dimensionierten Methode keine Auswirkung auf die Trennung hatte, allerdings eine Verschiebung der Retentionszeiten um etwa 2 min zur Folge hatte. Die Reproduzierbarkeit und Linearität der pH-Gradienten zeigte in beiden Methoden sehr gute Ergebnisse.

Die Chromatofokussierung mit der beschriebenen 2 mm i.D.-Methode zeigte intensivere Peaks bzw. Elutionsbereiche (basisch, neutral, sauer) als die höherdimensionierte Methode. Die durchgeführte Miniaturisierung hatte somit den erwünschten erniedrigenden Effekt auf die Nachweisgrenze.

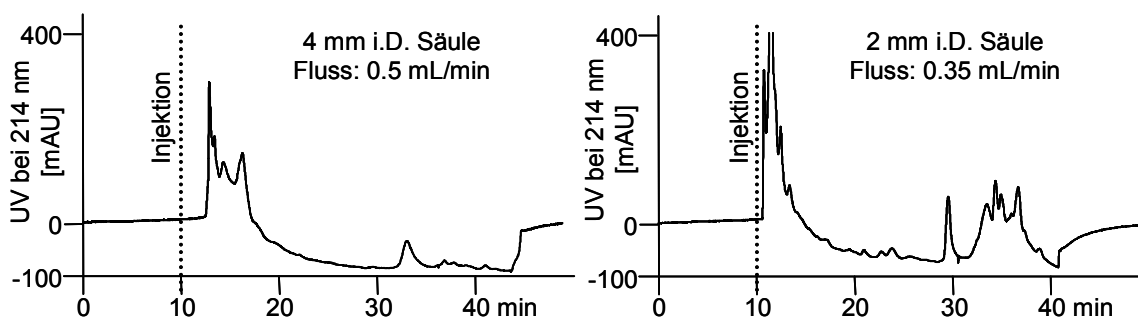


Abbildung 79: UV-Chromatogramme bei 214 nm der 20-Proteinstandard-Mischung nach Chromatofokussierung an 4 mm i.D. (links) und 2 mm i.D. Säule (rechts); jeweils pH 11 bis 3 linear in 30 min; Injektion bei min 10

6.3 Prüfung der Eignung zur Vortrennung von Proteinen - 1D-Methode

Diese Methode sollte innerhalb einer neuen *top-down*-Strategie zur Trennung von komplexen Proteinmischungen bzw. von Proteomen eingesetzt werden. Die Fraktionierung definierter zeitlicher Bereiche des CF-Eluats sollte in einer zweiten Dimension mittels IP-RP-mikro-HPLC gekoppelt an die Massenspektrometrie zur Darstellung erstens der intakten Proteine dienen und zweitens nach enzymatischem Verdau aller in den Fraktionen enthaltenen Proteine zur Identifizierung der Proteine beitragen. Der mittels CF zugeordnete pI-Wert bzw. -Bereich sollte bei der Übertragung der aus der Verdauanalyse erhaltenen Ergebnisse auf die gefundenen intakten Massen behilflich sein.

Die Eignung der Methode für die Reinjektion und anschließende Detektion der intakten Massen mittels MS musste untersucht werden, da verschiedene Additive zu ungewollten Effekten führen können, die beispielsweise die Ionisierung des Proteins und somit die MS-Detektion beeinflussen könnten. Im Zuge dessen wurde auch getestet, ob eine Entsalzung vor Reinjektion nötig war, oder die Zeit auf der Trapsäule in der vorgestellten 2D-mikro-HPLC-Methode (vgl. Kapitel 2 und 3) zur Entfernung der organischen Amine und der Phosphorsäure aus den Eluenten

ausreichend war. Des Weiteren musste beachtet werden, dass der Methanolanteil im CF-Eluenten bei Reinjektion zu einer möglichen Elution der Analyte von der Trapsäule in den Abfall führen könnte, so dass eine 2D-Methodik mit Chromatofokussierung in erster Dimension ohne die Entfernung des organischen Modifiers vor Reinjektion nicht durchführbar wäre.

6.3.1 Chromatofokussierung der 20-Proteinstandard-Mischung

Um diese kritischen Eckpunkte der Methodenkombination zu testen, wurde eine Fraktionierung der in Abbildung 79 (rechts) gezeigten und bereits in Kapitel 6.2 beschriebenen Chromatofokussierung der 20-Proteinstandard-Mischung durchgeführt. Es wurden 10 Fraktionen mit jeweils 4 min Elutionsdauer (1.4 mL Fraktionenvolumen) entnommen und in die zweite Trenndimension reinjiziert zur Identifizierung der Proteine anhand ihrer intakten Massen. Die Bereiche der Fraktionen sind nochmals in Abbildung 80 dargestellt.

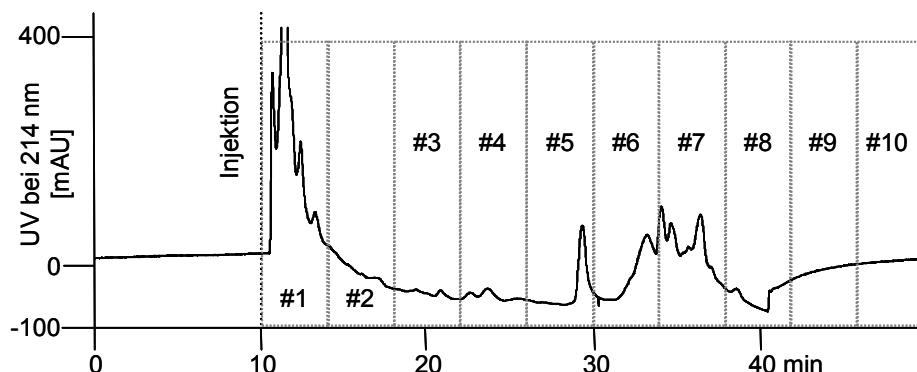


Abbildung 80: Chromatogramm der Chromatofokussierung der 20-Proteinstandard-Mischung mit der miniaturisierten Methode; entnommene Fraktionen sind durch Kästen und Fraktionsnummer angegeben

Es wurden keine Aufkonzentrierungen oder Entsalzungsverfahren auf die Fraktionen angewendet, da bereits die Fraktionierung mit hoher Konzentration der 20-Proteinstandard-Mischung durchgeführt wurde. Dadurch wurde eine bessere Visualisierung innerhalb der UV-Detektion gewährleistet.

6.3.2 IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS der Fraktionen der Chromatofokussierung

Die IP-RP-mikro-HPLC-Trennung wurde wie bereits erwähnt an einem Trap-System durchgeführt. Die Trennung erfolgte mit den in Tabelle 48 angegebenen HPLC-Parametern, die Detektion wurde am microTOF mit den in Tabelle 10 angegebenen MS-Parametern durchgeführt.

Tabelle 48: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der 20-Proteinstandard-Mischungs-CF-Fraktionen

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 1.5 µL/min
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 15 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 5 µL

Von den 20 in der Proteinstandard-Mischung enthaltenen Proteinen konnten 16 anhand ihrer Masse in den CF-Fraktionen 1 bis 10 nachgewiesen werden, Die Hämoglobinketten α und β sowie β -Lactoglobulin A und Transferrin wurden in keiner Fraktion beobachtet. Abbildung 81 zeigt eine Darstellung als Proteinmap, wobei in dieser Mischung nahezu jedes detektierte Protein über mehrere Fraktionen eluiert wurde und somit mehrfach detektiert wurde. Durch die Darstellung als Markierung in Abhängigkeit von der Fraktionennummer der ersten Trenndimension und der Retentionszeit in zweiter Dimension konnte auch anhand dieser kleinen Proteinstandard-Mischung eine gewisse Orthogonalität der Trennmechanismen dargestellt werden, wobei allerdings noch Kapazität für die Analyse weiterer Proteine besteht.

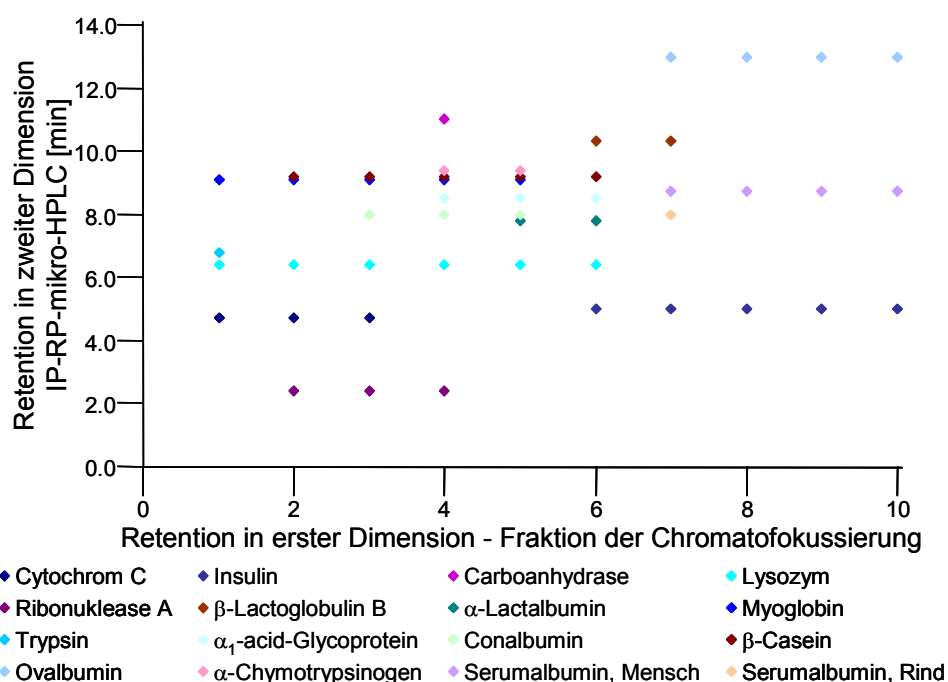


Abbildung 81: Auftragung der nachgewiesenen Proteine aus der 20-Proteinstandard-Mischung nach zweidimensionaler Trennung (CF/IP-RP-HPLC) in Abhängigkeit von ihrer Retention in beiden Dimensionen

Trotz der Detektion in mehreren Fraktionen konnte anhand der Intensitäten eine Hauptfraktion, in der das jeweilige Protein hauptsächlich eluierte, erkannt werden. Anhand dieser Fraktion und des in ihr vorherrschenden pH-Bereichs wurde ein Vergleich zwischen gemessenem pI-Bereich und theoretischem pI-Wert durchgeführt. Aus Tabelle 49 geht deutlich hervor, dass die Elution des Hauptteils des jeweiligen Proteins im Falle von Cytochrom C, Trypsin, Ovalbumin und Carboanhydrase in dem anhand des theoretischen pI-Wertes erwarteten pH-Bereich erfolgte. Einer zu frühen Elution ($\text{pH} > \text{theoretischer pI}$) unterlagen β -Lactoglobulin B, α -Lactalbumin und β -Casein. Bei saurer Eluentenzusammensetzung gemessen am theoretischen pI-Wert wurden Insulin, die Serumalbumine, α -Chymotrypsinogen, α_1 -acid-Glycoprotein, Conalbumin, Ribonuklease A, Myoglobin und Lysozym nachgewiesen. Allerdings wichen die ermittelten pI-Bereiche nur geringfügig von den theoretischen pI-Werten ab, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Zuordnung von Proteinen anhand der mittels CF ermittelten pI-Bereiche bei Einhalten eines variablen Bereichs von etwa ± 1 pH-Einheit ein hilfreiches Werkzeug darstellen konnte.

Tabelle 49: Vergleichende Zusammenstellung der theoretischen pI-Werte und der ermittelten pI-Bereiche anhand der Elution bei der Chromatofokussierung

Protein	theoretischer pI-Wert	pI-Bereich laut CF-Elution	Hauptfraktion der CF-Elution
Cytochrom C	9.5	10.0-7.8	1
Trypsin	8.7	10.0-7.8	1
Lysozym	9.3	7.8-7.0	2
Ribonuklease A	8.6	7.0-6.6	3
Myoglobin	7.4	7.0-6.6	3
Carboanhydrase	6.4	6.6-6.2	4
Conalbumin	6.7	6.6-6.2	4
β-Casein	5.1	6.6-6.2	4
α-Chymotrypsinogen	8.4	6.2-5.8	5
α_1-acid-Glycoprotein	5.0	5.8-5.4	6
α-Lactalbumin	4.8	5.8-5.4	6
Insulin	7.0	5.4-5.0	7
β-Lactoglobulin B	4.8	5.4-5.0	7
Serumalbumin, Mensch	5.7	5.4-5.0	7
Serumalbumin, Rind	5.6	5.4-5.0	7
Ovalbumin	5.2	5.0-4.8	8

Bei quantitativer Elution in nur einer CF-Fraktion hätten die Proteine etwa eine Konzentration von 10 ng/ μ L gehabt, es wären in der zweiten Dimension somit etwa 50 ng pro Protein analysiert worden. Diese Konzentration hätte bei jedem Protein zu einer eindeutigen und gut detektierbaren Intensität innerhalb der Spektren und Chromatogramme führen sollen, daher wurde auf die Aufkonzentrierung der Fraktionen verzichtet. Für die detektierten Proteine wurde diese Annahme bestätigt. Die BPCs der Analysen der Fraktionen sind in Abbildung 82 dargestellt.

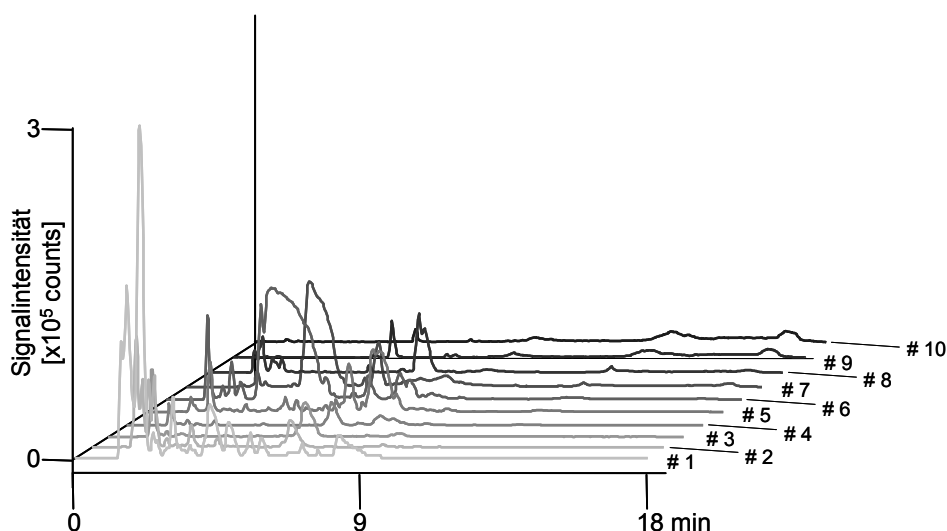


Abbildung 82: TICs der IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS-Analyse der 10 CF-Fractionen der 20-Proteinstandard-Mischung

Auch anhand der Chromatogramme konnte die Verteilung der Peaks über die Trennstrecke der IP-RP-Methode ebenso beobachtet werden, wie die unterschiedlichen Inhalte der Fractionen, was bereits in Abbildung 81 und Tabelle 49 dargestellt wurde.

Gering-intensive Peaks in den Retentionsbereichen bis 4 min wiesen einzelne kleinere Massen auf, die auf Amin-Komplexe oder Peptide hinwiesen. Die Anwesenheit von Peptiden würde auf den Zerfall oder Abbau der Standardproteine hindeuten, was aufgrund der Anwesenheit von Proteasen innerhalb der Mischung nicht abwegig wäre. Allerdings wurde die 20-Proteinstandard-Mischung durch Lösen der Proteine in 60 % wässrigem CF-Eluenten A hergestellt. Das basische Milieu sollte die enzymatische Aktivität der Proteasen mindern und zur Denaturierung der Proteine führen, um die Chromatofokussierung zu unterstützen.

Die massenspektrometrisch ermittelten Massen wichen teilweise stark von den theoretischen Massen ab, was ebenfalls auf Veränderungen an der Proteinsequenz oder an Modifikationen hindeutete. Massenvergleiche unbekannt-modifizierter Proteine wurden nicht durchgeführt. Einen Überblick über die gemessenen im Vergleich zu den theoretischen Massen gibt Tabelle 50.

Tabelle 50: theoretische und gemessene Massen sowie Massenverschiebung der detektierten Proteine nach 2D-Analyse

Protein	theoretische Masse in Da	gemessene Masse in Da	Masenabweichung in Da
Cytochrom C	12360	12359.52	-0.5
Insulin	5808	5807.17	-0.8
Carboanhydrase	29025	29023.47	-1.5
Lysozym	14305	14305.78	0.8
Ribonuklease A	13682	13682.85	0.9
β-Lactoglobulin B	18277	18276.99	0.0
α-Lactalbumin	14178	14178.84	0.8
Myoglobin	16951	16951.42	0.4
Trypsin	23292	23210.19	-81.8
α_1-acid-Glycoprotein	21560 + Modifikationen	43813.65	n.b.
Conalbumin	75800 + Modifikationen	77569.58	n.b.
β-Casein	22700 + Modifikationen	25234.43	n.b.
Ovalbumin	42794 + Modifikationen	44334.39	n.b.
α-Chymotrypsinogen	25656	25433.14	-222.9
Serumalbumin, Mensch	66438	66472.96	35.0
Serumalbumin, Rind	66433	66435.76	2.8

Auffällig waren die Massenabweichungen der Proteasen Trypsin und α -Chymotrypsinogen. Es wurde nicht weiter verfolgt, wodurch diese Abweichungen verursacht wurden, allerdings weist die Höhe der Abweichung beim Trypsin auf die Abspaltung eines Histidinrestes (81Da) ohne Einfluss auf die Peptidverknüpfungen hin, was jedoch nicht explizit untersucht wurde. Beim α -Chymotrypsinogen könnte die Abweichung durch die Abspaltung des ersten Propeptids Ser-Arg (Sequenzstellen 14-15) entstanden sein, welches bei der Aktivierung der Protease aus der Sequenz entfernt wird. Auch diese These wurde nicht durch weitere Untersuchungen verfolgt.

7 Diskussion der verschiedenen Methoden und Entwicklungsergebnisse

Die beschriebenen entwickelten bzw. optimierten und etablierten Methoden zur Trennung und Detektion von Proteinen haben sich auf unterschiedliche Weise bewährt. Mit der vorgestellten Ionenpaar-Umkehrphasen mikro-HPLC-Methode wurde eine Möglichkeit dargestellt, intakte Proteine effizient und schnell mit guter Reproduzierbarkeit und Retentionsstabilität zu trennen. Es wurde auch gezeigt, dass die Kopplung mit der ESI-MS eine stabile Option ist, intakte Proteine zu ionisieren und anhand ihrer Massen darzustellen sowie sie unter verschiedenen Blickpunkten zu analysieren. Auch wurde gezeigt, dass die Wahl des Massenanalysators je nach Analysenziel unterschiedliche Ergebnisse zeigt. Die Chromatofokussierungsmethode zeigte in Kombination mit der mikro-HPLC-MS ein erhöhtes Informationspotential aufgrund der Einbeziehung des pI-Wertes bzw. eines geringen Bereiches um den pI-Wert des Analyten. Eine kurze Zusammenfassung der einzelnen Methoden soll nun einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse sowie eine Einschätzung ihrer Vor- und Nachteile geben.

7.1 Zusammenfassung der Ionenpaar-Umkehrphasen mikro-HPLC-Trennmethode

Es wurde eine Monolith-basierte mikro-Trennmethode für intakte Proteine etabliert. Auf der Umkehrphase wurden Retention und Elution der Analyten durch die Verwendung eines linearen Acetonitril-Wasser-Gradienten mit geringem Trifluoressigsäurezusatz gewährleistet, so dass kurze Analysenzeiten von etwa 30 min mit guter Trenneffizienz erreicht wurden. Bei Verwendung automatisch regulierender Splitsysteme wurden für das Trennsystem sehr hohe Reproduzierbarkeiten bzw. geringe, trendlose Retentionsabweichungen von durchschnittlich etwa 0.1 bis 0.2 min erreicht (Kapitel 2.3). Die Verwendung eines manuellen Splitsystems zeigte zwar deutlich höhere Abweichungen, war jedoch ebenso einsetzbar zur Kopplung mit der Massenspektrometrie und zeigte ähnlich gute Trenneffizienz. Durch die Verwendung des Trap-Systems konnte die Reproduzierbarkeit im manuell gesplitteten System nochmals geringfügig erhöht werden (Kapitel 3.3). Die Verwendung eines Trap-Systems hat des Weiteren die

angesprochenen positiven Effekte der Entsalzung, Aufreinigung und Aufkonzentrierung. Auch zur Trennung großer Proteine sowie für die Analyse von Mischungen mit unterschiedlich großen Proteinen zeigte sich diese Methodik geeignet. Verbesserungen der Trennung konnten durch Verlängerung der Trennstrecke und gleichzeitige Verlängerung des Gradienten erreicht werden ohne Systemveränderungen vornehmen zu müssen (Kapitel 4).

In Hinblick auf die Reinjektion salzhaltiger Fraktionen und dementsprechend höherer benötigter Injektionsvolumina stellte sich die Trap-Methode als umfangreich anwendbar dar und vereinfachte die Probenhandhabung deutlich (Kapitel 6.3).

7.2 Zusammenfassung der Flugzeit-MS-Methode

Es wurde eine Flugzeit-MS-Methode mit positiver Elektrosprayionisierung durch Parametereinstellung und Massenkalisierung anhand von Proteinstandards entwickelt. Dies erlaubte es, eine Vielzahl verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Massen, pI-Werten und Modifikationen mit breiter Ladungsverteilung darzustellen und über Dekonvolution anhand der gemessenen intakten Proteinmasse zu interpretieren (Kapitel 2, 4 und 5). Es konnten nach chromatographischer Trennung sowohl bekannte Proteine in Mischungen identifiziert (Kapitel 2) als auch verschiedene Modifikationen an Proteinen detektiert und charakterisiert werden (Kapitel 5). Zufrieden stellende Massengenauigkeit von unter 100 ppm (Kapitel 2.3) sowie hohe Massenstabilität (Kapitel 2.4) wurden erzielt und erlaubten so die recht genaue Berechnung von Abweichungen zu theoretischen Massen sowie die Berechnung und Charakterisierung einzelner Abspaltprodukte. Dies erlaubte sogar, Vorschläge für die Zucker-Monomerverteilung innerhalb der Glycankette des Ovalbumins zu treffen (Kapitel 5.2). Es wurden für nahezu alle untersuchten Standardproteine geringe Nachweisgrenzen im unteren Femtomol-Bereich berechnet, wodurch sich die Methode gut zur Analyse intakter Proteine aus komplexen biologischen Matrices eignen sollte. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die manuelle Auswertung von Chromatogrammen unerlässlich war, um eine maximale Anzahl an Proteinen zu finden und zu charakterisieren.

7.3 Zusammenfassung der Ionenfallen-MS-Methode

Es wurde ebenfalls eine Ionenfallen-MS-Methode mit positiver Elektrosprayionisierung durch Parametereinstellung anhand von Proteinstandards entwickelt. Auch in diesem Fall war es möglich, eine Vielzahl verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Massen, pI-Werten und Modifikationen mit ausreichender Ladungsverteilung darzustellen und über Dekonvolution anhand der gemessenen intakten Proteinmasse zu interpretieren. Im Fall der Ionenfallen-Methode bestand die Limitierung der Darstellung im engen Massenbereich von 500 bis 2000 m/z, der für eine Vielzahl von Proteinen nicht ausreichend war, um eine Maximalintensität für einen Ladungszustand detektieren zu können. Dies verminderte die Nachweisgrenze und konnte die Qualität der Dekonvolution der Spektren mindern. Es konnten nach chromatographischer Trennung sowohl bekannte Proteine in Mischungen identifiziert als auch verschiedene Modifikationen an Proteinen detektiert werden (Kapitel 3.3). Zumeist wurde eine zufrieden stellende Massengenauigkeit von unter 100 ppm (Kapitel 3.3) erzielt. Es wurden auch mit dieser Methode für nahezu alle untersuchten Standardproteine geringe Nachweisgrenzen im unteren Femtomol-Bereich berechnet, wodurch sich die Methode gut zur Analyse intakter Proteine aus komplexen biologischen Matrices eignen sollte. Auch mit dieser Methode sollte die Auswertung der Datensätze manuell erfolgen, da ebenfalls die Kombination aus im TIC oder im BPC detektierten Peaks und in den verrauschten Spektren detektierten Analyten die höchstmögliche Anzahl interpretierbarer Proteinspektren bildet.

7.4 Diskussion der Chromatofokussierung als Vortrennung

Durch Chromatofokussierung war es gelungen, eine Mischung aus 20 Proteinen anhand ihrer pI-Werte aufzutrennen. Im Gegensatz zum Kationen- oder Anionenaustausch, bei denen nur eine Sorte Analyt (basisch oder sauer) tatsächlich aufgetrennt werden, konnte gezeigt werden, dass mittels Chromatofokussierung eine reproduzierbare Trennung über den gesamten Bereich (basisch und sauer) erfolgte (Kapitel 6.1, 6.3). Durch die Minimierung der Pufferkomponenten-Zusammensetzung (Kapitel 6.1) konnte eine direkte Injektion in die zweite Trenndimension erfolgen, ohne eine vorherige Aufreinigung durch Dialyse oder Ultrazentrifugation durchführen zu müssen (Kapitel 6.3). Die Benutzung des Trap-Systems war ausreichend um die

verbliebenen Aminmoleküle soweit zu entfernen, dass sie die Trennung und Detektion in dieser Dimension nicht behinderten (Kapitel 6.3). Die Miniaturisierung der Methode (Kapitel 6.2) erlaubte eine zeitliche Fraktionierung mit hoher Analytkonzentration je Fraktion, so dass im Fall der untersuchten Proteinstandard-Mischung keine Aufkonzentrierung durch Verdampfung des Lösungsmittels erfolgen musste (Kapitel 6.3). Die Auftragung als Proteinkarte (Retention 1D vs. 2D) zeigte das Potential der kombinierten Methoden, Mischungen vereinzelt aufzutrennen (Kapitel 6.3). Durch Verringerung der Gradientensteigungen beider Methoden ließe sich die Peakkapazität noch steigern, was jedoch gleichzeitig zu längeren Analysenzeiten führt, für biologische Matrices jedoch Vorteile brächte.

8 Referenzen

- 1 Walcher, W.; Toll, H.; Ingendoh, A.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 107-17.
- 2 Premstaller, A.; Oberacher, H.; Walcher, W.; Timperio, A.-M.; Zolla, L.; Chervet, J.-P.; Cavusoglu, N.; Van Dorsselaer, A.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2390-96.
- 3 Toll, H.; Oberacher, H.; Swart, R.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2005**.
- 4 Tholey, A.; Toll, H.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4618-25.
- 5 Léonil, J.; Molle, D.; Gaucheron, F.; Arpino, P.; Guénot, P.; Maubois, J. L. *Lait* **1995**, *75*, 193-210.
- 6 Rademacher, T. W.; Parekh, R. B.; Dwek, R. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 785-838.
- 7 Vlassara, H.; Palace, M. R. *J. Intern. Med.* **2002**, *251*, 87-101.
- 8 Ahmed, N.; Thornalley, P. J. *Biochem. J.* **2002**, *364*, 15-24.
- 9 Bergen, H. R.; Lacey, J. M.; O'Brien, J. F.; Naylor, S. *Anal. Biochem.* **2001**, *296*, 122-9.
- 10 Lanz, C.; Kuhn, M.; Deiss, V.; Thormann, W. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2309-18.
- 11 Satomi, Y.; Shimonishi, Y.; Hase, T.; Takao, T. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2983-8.
- 12 Satomi, Y.; Shimonishi, Y.; Takao, T. *FEBS Lett.* **2004**, *576*, 51-6.
- 13 Satomi, Y.; Shimonishi, Y.; Hase, T.; Takao, T. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, *18*, 2983-8.

- 14 Dell, A.; Morris, H. R. *Science* **2001**, *291*, 2351-6.
- 15 Suzuki, N.; Khoo, K. H.; Chen, H. C.; Johnson, J. R.; Lee, Y. C. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23221-9.
- 16 Lattova, E.; Kapkova, P.; Krokhin, O.; Perreault, H. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2977-84.
- 17 Elder, J. H.; Alexander, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1982**, *79*, 4540-4.
- 18 Plummer, T. H. Jr; Elder, J. H.; Alexander, S.; Phelan, A. W.; Tarentino, A. L. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 10700-4.
- 19 Cargile, B. J.; Stephenson, J. L. Jr *Anal Chem* **2004**, *76*, 267-75.
- 20 Zhou, F.; Hanson, T. E.; Johnston, M. V. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7145-53.
- 21 Greibrokk, T.; Pepaj, M.; Andersen, T.; Novtna, K. *LCGC Europe* **2005**, *18*, 355-60.
- 22 Pepaj, M.; Wilson, S. R.; Novotna, K.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. *J Chromatogr A* **2006**, *1120*, 132-41.
- 23 Iskandarani, Z.; Pietrzyk, D. J. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1065-71.

Teil III

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

1 Apparative Anforderungen und Chemikalien

1.1 Apparative Systeme für die Methodenentwicklung

Chromatofokussierung

Zur Chromatofokussierung wurden eine analytische HPLC-Pumpe High Precision Pump Model 480 (Gynkotek, Germering, Deutschland) mit variablem Wellenlängen-Detektor und Entgaser (beide Knauer, Berlin, Deutschland) sowie ein manuelles Injektionsventil (Rheodyne, IDEX® Corporation, Oak Harbor, WA, USA) verwendet. Die pH-Messung des Eluenten erfolgte mit einer Durchfluss-pH-Elektrode (Lazar Research Laboratories, Los Angeles, CA, USA) und einem pH-Meter (WTW, Weilheim, Deutschland), dessen Messwerte mittels der Chromeleon Software ausgelesen und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wurden. Es wurde eine starke Anionenaustauscher-Phase ProPac SAX-10 (Dionex, Amsterdam, NL) mit den Säulenlängen 50 mm (Vorsäule) und 250 mm (Trennsäule) und einem Innendurchmesser von 2 mm verwendet. Die Verdampfung der Eluenten aus den Fraktionen wurde im Vakuumkonzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Mikro-HPLC-Flugzeit-MS

Die Flugzeit-massenspektrometrische Detektion wurde mit dem micrOTOF Flugzeit-Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Für die mikro-HPLC-Trennung und die Kopplung an das TOF-Massenspektrometer wurde ein mikro-HPLC-System verwendet, bestehend aus Probengeber der Serie Famos und Pumpsystem mit integriertem Split und Säulenofen der Ultimate-Serie (beide Dionex Benelux, Amsterdam, NL) sowie einer analytischen HPLC-Pumpe Model K-1001 (Knauer, Berlin, Deutschland) und einem 10-Wege-Schaltventil (VICI AG, Schenkon, Schweiz). Für die mikro-HPLC-Trennung und die Kopplung an das TOF-Massenspektrometer nach erfolgtem Kationenaustausch wurde ein mikro-HPLC-System verwendet, bestehend aus Probengeber, und Doppel-Pumpsystem mit integriertem, automatisch geregelterm Splitsystem und Säulenofen der Ultimate 3000-Serie (Dionex Benelux, Amsterdam, NL). Für die mikro-HPLC-Trennung und die Kopplung an das TOF-Massenspektrometer im Falle der Molke- und Gliadinuntersuchungen wurde ein mikro-HPLC-System verwendet bestehend aus

Probengeber der Serie Famos, Beladungssystem mit integrierten Schaltventilen der Serie Switchos und Pumpsystem mit integriertem Split und Säulenofen der Ultimate-Serie (beide Dionex Benelux, Amsterdam, NL), wobei das System zur Gliadinuntersuchung nicht im getrappten Modus benutzt wurde.

Mikro-HPLC-Ionenfallen-Tandem-MS

Die Ionenfallen-Tandem-massenspektrometrische Detektion wurde mit dem EsquireHCT Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Für die mikro-HPLC-Trennung und die Kopplung an dieses Massenspektrometer wurde ein mikro-HPLC-System verwendet, bestehend aus Probengeber der Serie Famos, Pumpsystem mit 10-Wege-Ventil-Anordnung zur Beladung der Serie Switchos und Pumpsystem mit integriertem Split und Säulenofen der Ultimate-Serie (beide Dionex Benelux, Amsterdam, NL).

Kationenaustauschchromatographie

Zur Trennung und Fraktionierung der Proteine mittels Kationenaustauschchromatographie wurden eine analytische HPLC-Pumpe High Precision Pump Model 480 (Gynkotek, Germering, Deutschland) mit variablem Wellenlängen-Detektor und Entgaser (beide Knauer, Berlin, Deutschland) sowie ein manuelles Injektionsventil (Rheodyne, IDEX® Corporation, Oak Harbor, WA, USA) verwendet.

Es wurde eine starke Kationenaustauscher-Phase ProPac SCX-10 von (Dionex, Amsterdam, NL) mit den Säulenlängen 50 mm (Vorsäule) und 250 mm (Trennsäule) und einem Innendurchmesser von 2 mm verwendet. Die Entfernung des Eluenten zur weiteren Aufbereitung der Fraktionen erfolgte mittels Ultrazentrifugation in Ultracel YM-10 Zentrifugen-Filterröhrchen (regenerierte Cellulose, Größenausschluss 10,000 Da) von Millipore (Billerica, MA, USA). Die zum Verdau nötigen Inkubationen wurden im Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Mikro-HPLC-Ionenfallen-MS

Die Ionenfallen-massenspektrometrische Detektion wurde mit dem LTQ-XL Ionenfallen-Massenspektrometer mit integriertem 6-Wege-Ventil und integrierter Spritzenpumpe (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Der mikro-HPLC Aufbau zur Kopplung an das LTQ-XL bestand aus einer Rheos 2000-Pumpe mit Mischkammer und Entgaser (Flux Instruments, Reinach BL, Schweiz), mit

manuellem Splitsystem und dem internen 6-Wege-Ventil des LTQ-XL (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) zur manuellen Probenaufgabe sowie einem Säulenofen (Eigenbau). Das mikro-HPLC Trap-System bestand zusätzlich aus einer Accela-Pumpe zur Beladung, einem Accela Autosampler zur Probenaufgabe (beide Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) und einem 10-Wege-Ventil (VICI AG, Schenkon, Schweiz) zur Säulenschaltung.

IP-RP-HPLC zur Gliadinfraktionierung

Zur Fraktionierung des Gliadinextraktes zur Gewinnung reiner γ -Gliadine als Standards wurden eine Analytische HPLC-Pumpe High Precision Pump Model 480 mit UV-Detektor UV320D (beide Gynkotek, Germering, Deutschland), ein Entgaser und ein Säulenofen Jetstream 2 Plus Column Thermostat (beide Knauer, Berlin, Deutschland) sowie ein Probengeber ASI 100 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) verwendet. Die Fraktionierung erfolgte an einer VYDAC-Protein C4-Säule mit 5 μm Partikelgröße, den Maßen 250x4.6 mm i.D. und einem Porendurchmesser von 300 Å (Grace Vydac, Worms, Deutschland). Die Verdampfung der Eluenten aus den Fraktionen wurde im Vakuumkonzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Trennsystemunabhängige Accessiores

Für Direktinfusionen wurden gasdichte 250 und 500 μL -Spritzen der Serie 1700 von Hamilton (Hamilton Company, Bonaduz, Schweiz) benutzt. Für die mikro-HPLC-Trennungen wurden monolithische Kapillarsäulen mit 200 μm Innendurchmesser auf Poly(Styrol-Divinylbenzol)-Basis sowohl als Trenn- als auch als Trapsäule verwendet, die innerhalb des Arbeitskreises hergestellt wurden. Die verwendeten Fused Silika Kapillaren waren Produkte von Polymicro Technologies (Pheonix, AZ, USA), Peek-Kapillaren und Verbindungsutensilien wie Unions und Fingertights wurden von Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA) bezogen. Die zum Verdau nötigen Inkubationen wurden im Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

1.2 Chemikalienliste

Verwendete Chemikalien

Destilliertes Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von ELGA (Siershahn, Deutschland) hergestellt. Imidazol (p.a., >99.5 % (GC)), Trizma (p.a., >99.8 % (T)), ortho-Phosphorsäure (85 %), Bicin (Ultra, >99.5 %), Ammoniumhydrogencarbonat (p.a.), Trifluoressigsäure (TFA, ≥ 99.5 %, for protein sequence analysis) und Heptafluorbuttersäure (HFBA, ≥ 99.0 %, for protein sequence analysis) wurden von Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), Piperazin (99 %), Acetonitril (ACN E Chromasolv, for HPLC, far UV), Tributylphosphin (TBP, p.a.) sowie Bradford-Reagenz und Rinderserumalbumin (BSA) für die Proteinquantifizierung wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen, Methanol (HPLC-gradient grade) und Ethanol (absolut) stammten von VWR (Leuven, Belgien), Trypsin (sequenzing grade) und der zugehörige Reaktionspuffer wurden von Promega GmbH (Madison, WI, USA) bezogen, das

Untersuchte Proben

Menschliches Myoglobin-freies Serum (blank reference serum) wurde vom Institut für Referenzmaterialien und Messungen der Europäischen Union (Brüssel, Belgien) bezogen. *Escherichia coli*-Lysat (E. coli protein sample Ready Prep™) stammte von BioRad (München, Deutschland). Transferrin (Trf - P02788, Mensch) wurde von Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland), Ovalbumin (Ova - P01012, Hühnereiweiß), α -Lactalbumin (Lal - P00711, Rindermilch), β -Lactoglobulin A (LacA - P02754, Rindermilch) und β -Lactoglobulin B (LacB - P02754, Rindermilch) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen. Bei den untersuchten Molkeproben handelte es sich um kommerziell erhältliche Trinksauermolke des Herstellers Demeter (in Braunglasverpackung mit beschichtetem Aluminiumdeckel) und um reine Naturmolke von Strothmann (im Prolypropylen-Becher mit abziehbarem Aluminiumdeckel). Der untersuchte und fraktionierte Gliadin-Extrakt wurde von der Europäischen Kommission zur Verfügung gestellt (Certified Reference Material, Gliadin from European Wheat).

2 Mehrdimensionale Proteinanalyse von menschlichem Serum

Menschliches Serum wird durch Zentrifugation des Blutes erhalten, wobei sich Blutplättchen und weiße Blutkörperchen absetzen und abgetrennt werden. Es setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen zusammen, von denen Wasser mit 91 % und Proteine mit 7 bis 8 % die größten Anteile bilden. In den verbleibenden 2 % sind die im Blut transportierten Hormone, Nährstoffe und Elektrolyte enthalten. Im Unterschied zum Blutplasma besitzt Serum keine aktiven Gerinnungsfaktoren mehr, wodurch es sich sehr gut als Matrix für medizinisch analytische Zwecke eignet, als Transfusionsmittel medizinisch jedoch unbrauchbar ist. Die enthaltenen Proteine setzen sich zum Großteil aus Albumin (52 bis 62 %) und Globulinen zusammen, wobei noch zwischen den Gruppen der α_1 - und α_2 - sowie β - und γ -Globuline unterschieden wird. Weitere noch hochkonzentrierte Proteine sind das Transferrin, α -2-Antitrypsin und C3 Komplement ^[1]. Etwa 10 % der Serumproteine bilden eine Vielzahl gering-konzentrierter Proteine wie Myoglobin und Insulin ^[2]. Gerade die Analyse dieser Proteine wird durch die Anwesenheit von Albumin und Globulinen stark beeinflusst und gestört, da es zu Überlagerungen und somit Unterdrückung der Analyte bei massenspektrometrischer Detektion kommt ^[3]. Die einzelnen Proteine im Serum haben einen variablen Konzentrationsbereich von bis zu 1:10¹⁰. Durch die Entfernung der hochabundanten Anteile bspw. durch Affinitätschromatographie kann dieser Effekt verringert werden. Dennoch liegen auch die gering-konzentrierten Proteine noch mit großen Konzentrationsunterschieden in diesem Subproteom vor, so dass die Erfassung der biologisch interessanten Proteine noch immer erschwert ist. Für eine umfassende Analytik der Serumproteine sind somit hochauflösende und hochempfindliche Trenn- und Detektionsmethoden notwendig ^[3].

In dieser Arbeit wurden die entwickelten Methoden zur Chromatofokussierung und anschließenden IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS-Untersuchung zur Analyse der gesamten Proteinfraction des menschlichen Blutserums verwendet.

2.1 Übersicht der verwendeten Methoden

Die vorliegende Serumprobe wurde nach Verdünnung mit 60 % CF-Eluent A auf eine Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (100 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) chromatofokussiert und nach Zeit fraktioniert (Kapitel 2.1.1, Tabelle 51). Die Fraktionen wurden durch Verdampfen des

Lösungsmittels um einen Faktor 14 bis zu einem Volumen von 100 μ L aufkonzentriert. Die Lösung wurde mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS auf intakter Proteinebene mit einem schnellen Gradienten von 15 min analysiert (Kapitel 2.1.2, Tabelle 52 und Tabelle 53).

2.1.1 Chromatofokussierung von Serum

Es wurden die folgende Methodenparameter zur Chromatofokussierung verwendet:

Tabelle 51: Trennparameter der 2 mm i.D.-CF-Methode

- Vorsäule: ProPac SAX-10, 50x2 mm
- Trennsäule: ProPac SAX-10, 250x2 mm
- Trenneluenten: A: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 11 (ohne Einstellung)
B: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 3 mit Phosphorsäure
- Säulenfluss: 0.35 mL/min
- Gradient: linear 0-100 % Eluent B in 30 min
- Trenntemperatur: Raumtemperatur
- Injektionsvolumen: 20 μ L, nach 10 min Gradientenlaufzeit
- Detektion: UV bei 214 nm
pH-Durchfluss-Messung (Gradientprüfung)
- Fraktionennahme: alle 4 min (1.4 mL), manuell

Die entnommenen 1.4 mL-Fractionen wurden unter Vakuum bei 30°C bis auf ein Volumen von 100 μ L eingedampft.

2.1.2 IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS intakter Proteine in CF-Fractionen

Zur Analyse der intakten Proteinmassen wurden die in Tabelle 52 aufgeführten Trennparameter und die in Tabelle 53 beschriebenen MS-Parameter verwendet.

Tabelle 52: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der intakten Proteine in den CF-Fractionen

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 1.5 µL/min
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 15 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 10 µL

Tabelle 53: TOF-MS-Parameter zur Darstellung intakter Serumproteine

Ionisierungsparameter

Spraygas	0.2 bar
Dry Gas	3.0 L/min
Dry Temperature	300 °C
End plate offset	-500 V
Capillary	3500 V
Kapillarlänge	3.0 mm

Detektionsparameter

Pulsar Push/Pull	389 V
Corrector Fill	95 V
Reflector	1300 V
Flight Tube:	9000 V
Corrector Extract	849 V
Detector TOF	1990 V

Parameter der Ionenoptik

Capillary exit	230.5 V
Skimmer 1	49.2 V
Hexapole 1	17.5 V
Skimmer 2	24.2 V
Hexapole 2	22.3 V
Hexapole RF	637.1 V
Pre Puls Storage Time	30 µs

Lens 1 storage	40.0 V
extraction	21.8 V
Lens 2	3.8 V
Lens 3	13.7V
Lens 4	-30.0V
Lens 5	16.6 V
Focus	aktiv
Transfer Time	100.0 µs

2.2 Ergebnisse

Die Chromatofokussierung gemäß Tabelle 51 des menschlichen Serums ergab das in Abbildung 1 gezeigte UV-Chromatogramm mit dem dargestellten pH-Gradientenverlauf. Die Fraktionennahme von jeweils 1.4 mL Eluent (4 min) ab der Injektion bei 10 min ist annotiert.

Bis auf einen deutlichen Doppelpeak im Bereich der gesammelten Fraktion #7 wurden nur noch im Bereich von etwa 25 bis 30 min und wie erwartet bei 2 bis 4 min nach Injektion Substanzen direkt mittels UV detektiert. Nach Verdampfung von 1.3 der 1.4 mL Fraktionengesamtvolumen erfolgte die Injektion in die zweite Trenndimension, mit den in Tabelle 52 angegebenen Trennparametern. Nach TOF-MS-Detektion laut der in Tabelle 53 aufgelisteten Methode wurden die Spektren der detektierten Proteine manuell erfasst und dekonvolviert. Die BPCs der untersuchten Fraktionen sind in Abbildung 84 vergleichend dargestellt. Es wurden ohne Betrachtung aller enthaltenen Spektren nur wenige Proteine gefunden. Außerdem wurden durch einfaches Übereinanderlegen der BPCs nur wenig gleiche Peaks in mehreren Fraktionen entdeckt. Eine Überladung der Säule bei der Analyse von Fraktion #7 wurde deutlich und konnte anhand der Intensität im UV-Chromatogramm der Chromatofokussierung bereits erahnt werden.

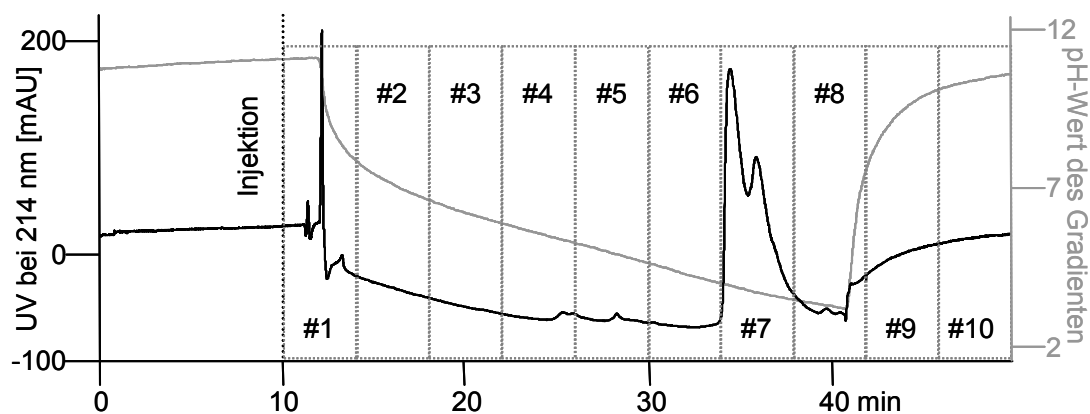


Abbildung 83: Chromatofokussierung von menschlichem Serum; UV-Chromatogramm bei 214 nm, pH-Verlauf und Angabe der Fraktionennahmebereiche

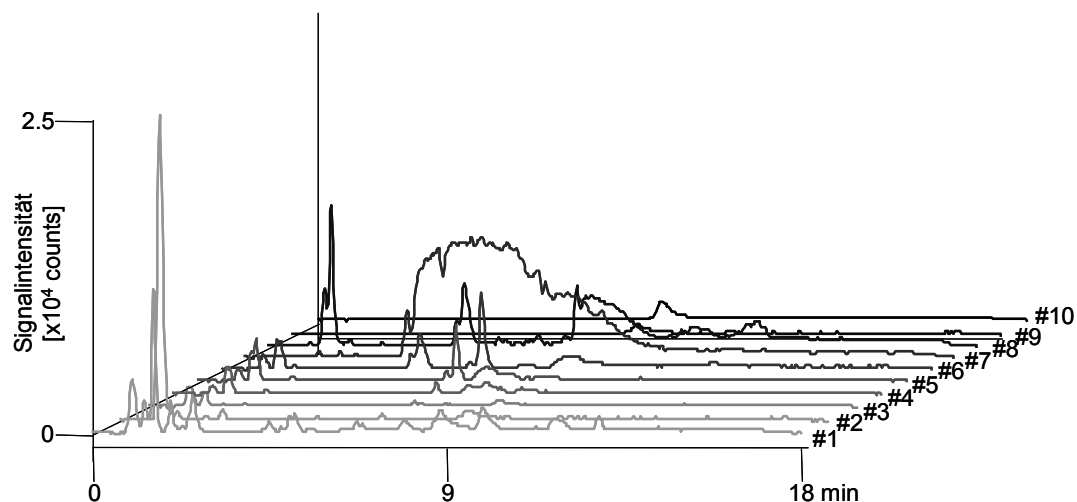


Abbildung 84: MS-Chromatogramme (BPCs) der CF-Fractionen von menschlichem Serum

Anhand der Spektren und Dekonvolutionsspektren aus den MS-Analysen ließen sich einige Proteine den Signalen zuordnen. Die Spektren und Dekonvolutionsspektren von nachgewiesenem Serumalbumin und Insulin sind in Abbildung 85 dargestellt.

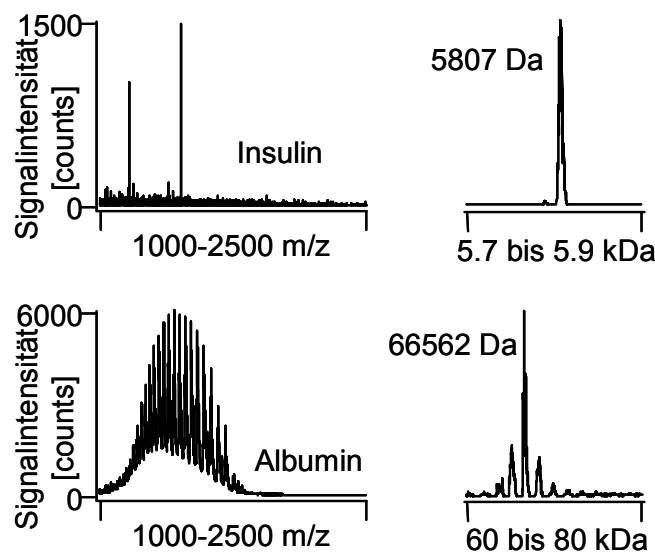


Abbildung 85: Spektren (links) und Dekonvolutionsspektren (rechts) von in Serum nachgewiesenem Insulin (oben) und Serumalbumin (unten)

Insulin wurde in Fraktion #1 nachgewiesen. Wie erwartet verursachte die hohe Serumalbuminkonzentration in Serum die Überladung der Säule bei der Analyse von Fraktion #7. Es wurden weitere Proteinmassen nach Dekonvolution von Spektren

erhalten. Eine Auflistung der Massen nach Fraktion geben Tabelle 87 bis Tabelle 95 im Anhang, eine Zusammenfassung der Mengen an detektierten Proteinen zeigt Tabelle 54. Die Analyse mehrfach detektierter Massen ergab 13 Proteinmassen, die in mehreren Fraktionen nachgewiesen wurden, so dass sich die Gesamtanzahl detektierter Massen von 90 auf 77 reduzierte. Es wurden nur Proteinmassen beachtet, die im Dekonvolutionsspektrum (zwischen 5 und 100 kDa) eine Intensität von mindestens 100 counts aufwiesen. Mehrfach detektierte Massen wurden bei Ausschluss der Mehrfachdetektion der Fraktion zugeordnet, in der ihnen die höchste Intensität im Dekonvolutionsspektrum zukam. Abbildung 86 zeigt die Verteilung der detektierten Proteinmassen ohne mehrfache Detektion in Abhängigkeit beider Trenndimensionen. Die SwissProt-Datenbank enthält allein über 23,000 Einträge humaner Proteine. Ein ausführlicher Abgleich der detektierten 77 Proteinmassen besaß neben einem hohen zeitlichen Aufwand bezüglich der Durchsuchung aller Sequenzen der dort angegebenen Massen auch nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, eindeutige Zuordnungen treffen zu können.

Tabelle 54: Anzahl detektierter Proteine in den CF-Fraktionen des menschlichen Serums mit und ohne mehrfach detektierte Massen

Fraktion	Anzahl detektierter Proteine	Anzahl detektierter Proteine ohne Mehrfachdetektion
#1	12	12
#2	6	2
#3	5	2
#4	6	3
#5	7	6
#6	12	11
#7	3	3
#8	37	37
#9	1	1
#10	1	0
Gesamtanzahl	90	77

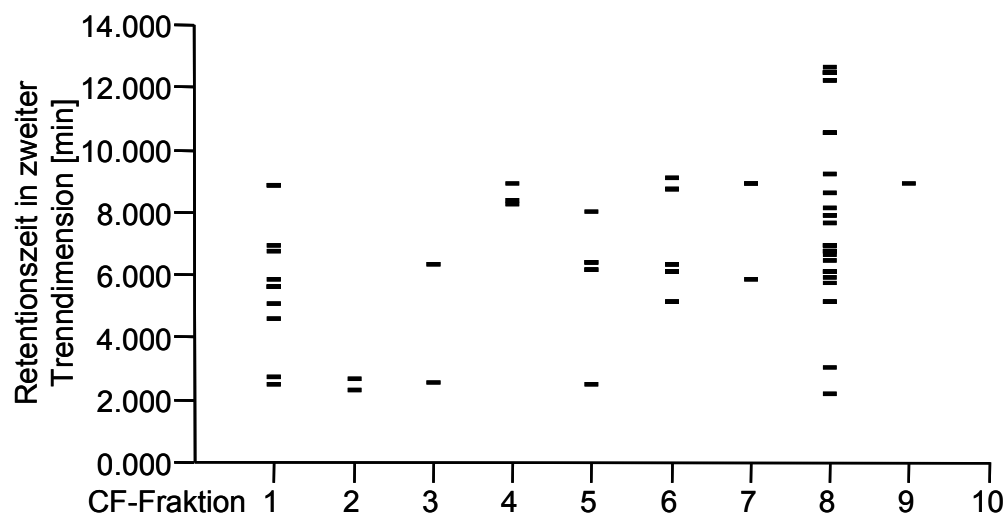


Abbildung 86: Verteilung der 77 detektierten Massen zwischen erster und zweiter Trenndimension; die CF-Fraktionennummer ist gegen die Retentionszeit in zweiter Trenndimension aufgetragen

2.3 Diskussion

Die wenigsten Proteine liegen nativ ohne Modifikationen oder mit eindeutiger Sequenz ohne Isoformen vor, was den Abgleich ohne vorige Eingrenzung der Datenbank zusätzlich erschwert. Eine solche Eingrenzung kann durch die parallele Untersuchung der Verdaupeptide der Proteine erfolgen und wird im folgenden Kapitel vorgestellt werden. Die Untersuchung des Serums zeigte auch ohne Zuordnung eine gute Aufteilung der Proteine zwischen den Fraktionen, die Trennmethode verhielten sich also orthogonal gegeneinander ^[4]. Selbst mit kurzen Trennzeiten (große Fraktionen und kurze Trennung in zweiter Dimension) ließen sich konzentrationsbedingt die häufigsten Proteine im Serum darstellen. Aufgrund der fehlenden detektierten Massen und Spektren konnte gezeigt werden, dass die hochmolekularen Globuline nicht mittels der vorliegenden TOF-MS-Methode dargestellt werden konnten. Die Elution des Serumalbumins erfolgte nahezu quantitativ in Fraktion #7, wodurch sich diese Methode auch als Abreicherungsverfahren für einzelne hochabundante Proteine eignete. Bei einer Injektionsmenge von 100 µg Serum war davon auszugehen, dass nur geringe Anteile der Proteinzusammensetzung dargestellt werden könnten. Der sehr variable Konzentrationsbereich gemessen an der Zahl verschiedener Proteine bedingte die

Nachweisbarkeit der geringkonzentrierten Proteine ^[1]. Unter der Annahme, dass 100 pg Protein noch mittels TOF-MS nachweisbar waren, hätten Proteine mit einem Konzentrationsverhältnis über 1:10⁶ gemessen an der Menge des Serumalbumins nachweisbar sein sollen. Hierbei wurden jedoch weder mögliche Elutionskomplika­tionen (Verschleppungen) in der ersten Trenndimension noch Verluste während der Fraktionierung oder Aufkonzentrierung sowie die eigentlichen Nachweisgrenzen der Proteine für diese MS-Methode berücksichtigt. Durch Überlagerungen beispielsweise in Fraktion #7 durch das enthaltene Serumalbumin könnte es wiederum zu einer verminderten Nachweisbarkeit koelulierender Proteine gekommen sein, was auch Einfluss auf die Menge der detektierten Proteine zeigt. Um diesen möglichen Effekt zu verringern, könnte es hilfreich sein, kleinere Fraktionen zu entnehmen, um die Proteine so vereinzelt wie möglich in zweiter Dimension analysieren zu können, wobei es auch zu einem Anstieg der Peakkapazität der Gesamtmethode käme.

3 Mehrdimensionale Proteinanalyse von *Escherichia coli*

Escherichia coli ist in Aufbau und Stoffwechsel eines der am besten untersuchten Bakterien. Dieses etwa 2 µm lange, gram-negative, stäbchenförmige, peritrich begeißelte Bakterium kommt sowohl im tierischen als auch im menschlichen Darm vor und gilt in der analytischen Mikrobiologie beispielsweise von Lebensmitteln oder Wasser als Zeichen für fäkale Verunreinigungen ^[5]. Neben seiner säurebildenden Fähigkeit sind einige Stämme unterschiedlich stark pathogen. Hierzu sind vor allem die enterohämorrhagischen (EHEC), enteropathogenen (EPEC), enterotoxischen (ETEC) und enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) zu nennen, die unterschiedliche Krankheitsbilder bei Intoxikation hervorrufen ^[6]. Das Genom von *E. coli* besteht aus etwa 4.65 Mio Basenpaaren, was einer Genanzahl von ca. 5000 entspricht und wurde bereits komplett entschlüsselt. Biotechnologisch hat es durch die gezielte Biosynthese von Insulin und verschiedenen Aminosäuren große Bedeutung gewonnen, da dies besonders für die Pharma- und Lebensmittelindustrie von Interesse ist. Aufgrund des natürlichen Vorkommens von *E. coli* im Darm von Mensch und Tier verursachen weder das Bakterium selbst noch exprimierte Substanzen aus *E. coli* allergische Reaktionen, wodurch keine medizinische Limitierung des Einsatzes vorliegt ^[7].

In der Datenbank SwissProt sind 12789 Einträge über Proteine aus *E. coli* aufgelistet, worunter einige nur speziellen Stämmen zuzuordnen sind, andere wiederum bilden Isoformen zu anderen Proteinen. Eine genaue und für das Bakterium allgemeingültige Anzahl ist innerhalb dieser Fülle an Einträgen nicht anzugeben. Durch Vorselektion der Proteine verkleinert sich die Datenbank auf eine Größe, die manuell noch interpretierbar ist. Dazu wurde eine zweidimensionale Untersuchung nach der top-down-Strategie an kommerziell erhältlichem *Escherichia coli*-Lysat durchgeführt. In erster Trenndimension erfolgte die Fraktionierung nach Zeit mit Chromatofokussierung als Mechanismus. Die Fraktionen wurden anschließend in zwei Richtungen weiter analysiert: zum einen wurden auf Basis der intakten Proteine die intakten Massen mittels TOF-MS detektiert. Für eine genaue Identifizierung und die angesprochene Vorselektion wurde neben dieser Charakterisierung auf intakter Proteinebene auch die Analyse eines tryptischen Verdauens der chromatofokussierten Fraktionen durchgeführt. Nach Datenbankgestützter Auswertung der Tandem-MS-Peptidanalysen und daraus resultierender

Identifizierung der Proteine in den Fraktionen wurden die Ergebnisse der intakten Massenmessungen auf die Ergebnisse der Peptidanalyse durch Vergleiche der theoretischen Massen mit den gemessenen intakten Massen übertragen.

3.1 Übersicht der verwendeten Methoden

Das *E. coli*-Lysat wurde in einer Konzentration von 30 µg/µL mit 60 % CF-Eluent A gelöst, zweimal chromatofokussiert und nach Zeit (2 min bzw. 1 min pro Fraktion) fraktioniert (Kapitel 3.1.1, Tabelle 55). Die Fraktionen wurden durch Verdampfen des Lösungsmittels um einen Faktor 7 bzw. 3.5 bis zu einem Volumen von 100 µL aufkonzentriert. Die Fraktionen der Trennung mit zweiminütiger Fraktionierung wurden mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS auf intakter Proteinebene mit einem schnellen Gradienten von 15 min analysiert (Kapitel 3.1.2, Tabelle 56 und Tabelle 57). Die Proteine der Fraktionen der anderen Trennung wurden nach Denaturierung und Reduzierung der Proteine tryptisch verdaut und die Peptide wurden anschließend mittels IP-RP-mikro-HPLC-Ionenfallen-Tandem-MS analysiert (Kapitel 3.1.3, Tabelle 58 und Tabelle 59). Nach Datenbank-gestützter Auswertung der Peptidanalysen wurden die identifizierten, theoretischen Proteinmassen zur Absicherung der Ergebnisse auf die intakt ermittelten Proteinmassen übertragen.

3.1.1 Chromatofokussierung von *Escherichia coli* Proteinen

Es wurden die folgende Methodenparameter zur Chromatofokussierung verwendet:

Tabelle 55: Trennparameter der 2 mm i.D.-CF-Methode

- Vorsäule: ProPac SAX-10, 50x2 mm
- Trennsäule: ProPac SAX-10, 250x2 mm
- Trenneluenten: A: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 11 (ohne Einstellung)
B: jeweils 10 mM Imidazol, Piperazin, Trizma in 10 % Methanol, pH 3 mit Phosphorsäure
- Säulenfluss: 0.35 mL/min
- Gradient: linear 0-100 % Eluent B in 30 min
- Trenntemperatur: Raumtemperatur

Tabelle 55 (Fortsetzung)

- Injektionsvolumen: 20 µL, nach 10 min Gradientenlaufzeit
- Detektion: UV bei 214 nm
pH-Durchfluss-Messung (Gradientprüfung)
- Fraktionennahme: alle 2 min (0.7 mL) bzw. 1 min (0.35 mL), manuell

Die entnommenen Fraktionen wurden im Vakuum bei 30°C bis auf ein Volumen von 100 µL (2 min-Fraktionen) bzw. bis zur Trockne (1 min-Fraktionen) aufkonzentriert.

3.1.2 IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS intakter Proteine in CF-Fraktionen

Zur Analyse der intakten Proteinmassen in den Fraktionen wurden die in Tabelle 56 aufgeführten Trennparameter und die in Tabelle 57 beschriebenen MS-Parameter mit dreifacher Injektion verwendet.

Tabelle 56: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der intakten Proteine in den CF-Fraktionen

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 1.5 µL/min
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 15 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 10 µL

Tabelle 57: TOF-MS-Parameter zur Darstellung der intakten Proteine

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.2 bar	Pulsar Push/Pull	389 V
Dry Gas	3.0 L/min	Corrector Fill	95 V
Dry Temperature	300 °C	Reflector	1300 V
End plate offset	-500 V	Flight Tube:	9000 V
Capillary	3500 V	Corrector Extract	849 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	1990 V
Parameter der Ionenoptik			
Capillary exit	230.5 V	Lens 1 storage	40.0 V
Skimmer 1	49.2 V	extraction	21.8 V
Hexapole 1	17.5 V	Lens 2	3.8 V
Skimmer 2	24.2 V	Lens 3	13.7V
Hexapole 2	22.3 V	Lens 4	-30.0V
Hexapole RF	637.1 V	Lens 5	16.6 V
Pre Puls Storage Time	30 µs	Focus	aktiv
		Transfer Time	100.0 µs

3.1.3 IP-RP-mikro-HPLC-Ionenfallen-MS von Peptiden in CF-Fractionen

Für den Verdau wurden die aufkonzentrierten Fraktionen zunächst jeweils mit 20 µL 5 mM Tributylphosphin versetzt und 30 min bei 60°C zur quantitativen Denaturierung und Reduzierung der Disulfide inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung in Wasser (pH 7.8) auf das 5fache Volumen verdünnt. In Trypsin-Puffer gelöstes Trypsin wurde für 15 min bei 37°C aktiviert und dann im Enzym-zu-Substratverhältnis 1:50 hinzugegeben, wobei von einer einheitlichen Verteilung der Proteine in den 20 Fraktionen ausgegangen wurde, was zu einer Substratkonzentration von ca. 30 µg/Fraktion führte. Den Fraktionen wurden somit 600 ng Trypsin zugegeben und diese Lösungen wurden anschließend bei 37°C über Nacht im Thermomixer inkubiert und die Proteine verdaut. Die Verdaureaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1 µL TFA, wodurch die Lösung sauer und das Trypsin denaturiert wurde.

Die verdauten Peptide wurden anschließend mit den in Tabelle 58 angegebenen Parametern chromatographisch getrennt und gemäß der Parameter in Tabelle 59 Tandem-massenspektrometrisch analysiert. Für die Tandem-MS-Detektion wurde eine im Arbeitskreis bereits bewährte Methode gewählt, Optimierungen wurden nicht durchgeführt.

Tabelle 58: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der Verdaupeptide in den CF-Fractionen

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 60x0.1 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 0.7 µL/min
- Gradient: linear 0-50 % Eluent B in 45 min
- Trenntemperatur: 55°C
- Injektionsvolumen: 5 µL

Tabelle 59: Ionenfallen-Tandem-MS-Parameter zur Darstellung von Peptiden

Spraygas	20.0 psi	Capillary exit	230.0 V
Dry Gas	4.0 L/min	Trap Drive	78.0
Dry Temperature	300 °C	Octapol RF Amplitude	200.0 Vpp
End plate offset	-500 V	Lens 2	-57.0 V
Capillary	-4000 V	Max. Accu Time	200 ms
Scanbereich	500-1500 m/z	ICC Target	100,000
MS Spektren-Summierung	7	Ms(n) Spektren-Summierung	3
Vorläuferionen Auto-MS(2)	2	Ausschluss nach	2 Spektren 0.5 min

3.2 Ergebnisse

Die Chromatofokussierung gemäß Tabelle 55 des *E. coli*-Lysats ergab das in Abbildung 87 gezeigte UV-Chromatogramm mit dem dargestellten pH-Gradientenverlauf. Die Fraktionennahme von jeweils 0.7 mL Eluent (2 min) ab der Injektion bei 10 min ist annotiert.

Bis auf den deutlichen ersten Peak wurden vereinzelte deutliche Signale im Bereich der Fraktionen #3, #4, #8 und #16 detektiert. Nach Verdampfung von 0.6 der 0.7 mL Fraktionengesamtvolumen erfolgte die Injektion in die zweite Trenndimension mit TOF-MS-Detektion zur Bestimmung der intakten Proteinmassen, mit den in Tabelle 56 angegebenen Trenn- und in Tabelle 57 gezeigten MS-Parametern. Des Weiteren wurden nach einer zweiten Chromatofoussierung 30 Fraktionen in 1 min-Abständen (350 µL Volumen) entnommen, bis zur Trockne vom Lösungsmittel befreit und von jeder Fraktion ein tryptischer Verdauung angefertigt. Die verdauten Fraktionen wurden anschließend mittels IP-RP-mikro-HPLC-Tandem-MS gemäß der Parameter in Tabelle 58 und Tabelle 59.

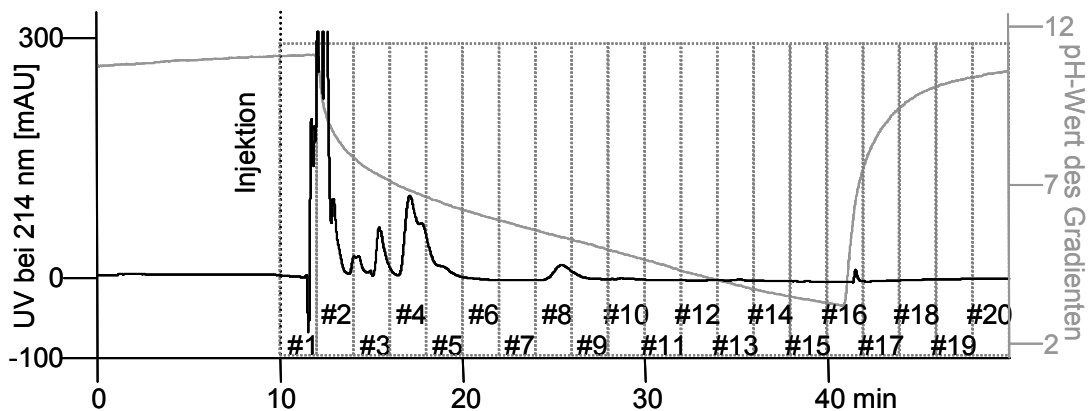


Abbildung 87: Chromatofokussierung von *Escherichia coli*; UV-Chromatogramm bei 214 nm, pH-Verlauf und Angabe der Fraktionennahmebereiche bei 20 Fraktionen

3.2.1 Analyse auf der Ebene intakter Proteine

Nach dreimaliger IP-RP-mikro-HPLC-Trennung und TOF-MS-Detektion wurden die Spektren der detektierten Proteine manuell erfasst und dekonvolviert. Die BPCs der Fraktionen #1 bis #10 von einer Messung sind in Abbildung 88, jene der restlichen Fraktionen in Abbildung 89 vergleichend dargestellt. Es traten ohne Betrachtung aller

enthaltenen Spektren je Fraktion mehrere Peaks, bzw. Proteine mit guter Auflösung über die Gradientendauer auf. Außerdem wurden durch einfaches Übereinanderlegen der BPCs nur wenig gleiche Peaks in mehreren Fraktionen entdeckt. Die Chromatogramme der erneuten Injektionen der Fraktionen in die zweite Trenndimension sind im Anhang unter 7.2 übereinander gelegt dargestellt.

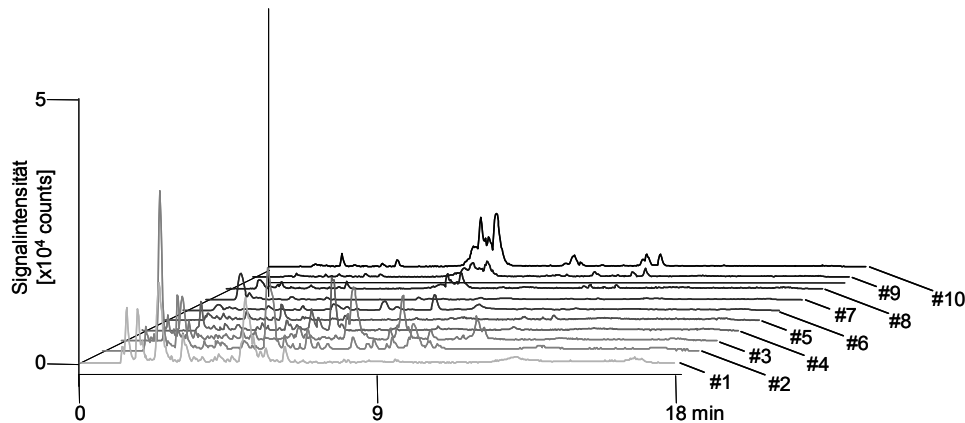


Abbildung 88: BPCs der CF-Fraktionen #1 bis #10 des *E. coli*-Lysats

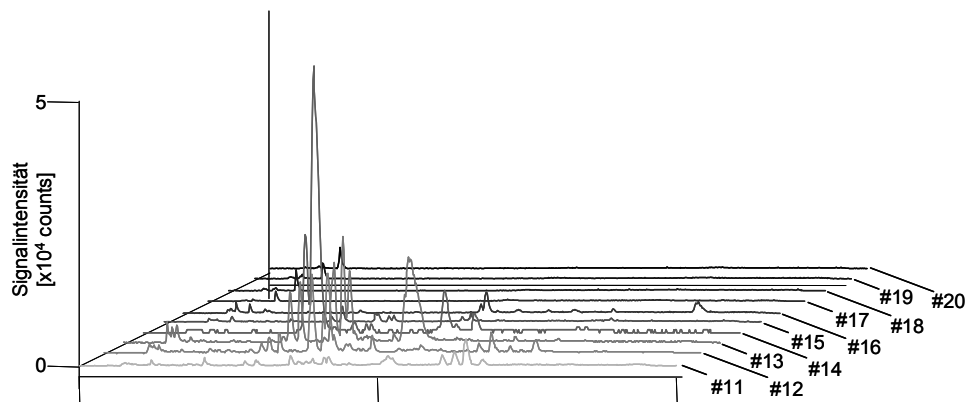


Abbildung 89: BPCs der CF-Fraktionen #11 bis #20 des *E. coli*-Lysats

Anhand der Spektren und Dekonvolutionsspektren aus den MS-Analysen ließen sich einige Proteine den Signalen zuordnen. Beispielhaft sind in Abbildung 90 fünf detektierte Proteine aus einer Injektion der Fraktion #13 anhand ihrer Spektren und Dekonvolutionsspektren dargestellt. Diese Substanzen konnten mit eindeutigen Verteilungen und guten Intensitäten der Ladungszustände detektiert und anschließend auch dekonvolutiert werden. Die Dekonvolution aller erhaltenen Spektren wurde auf den Bereich von 5,000 bis 100,000 Da beschränkt.

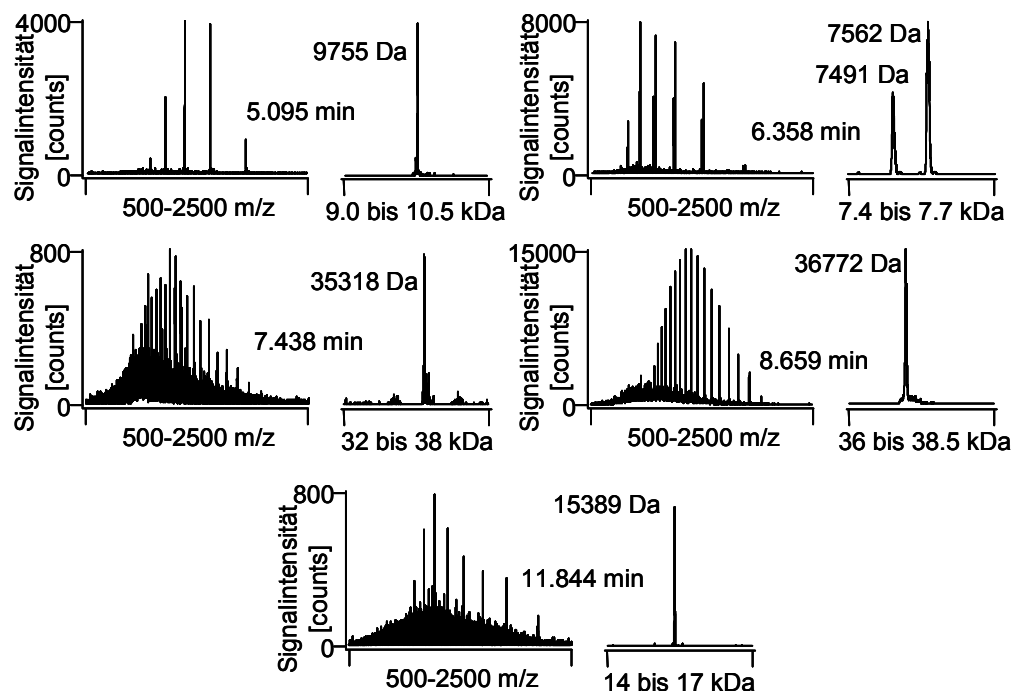


Abbildung 90: Spektren und Dekonvolutionspektren von fünf Peaks aus Fraktion 13 der Chromatofokussierung mit annotierten Retentionszeiten und Dekonvolutionsmassen

Eine Auflistung der gefundenen Massen nach Fraktion und Injektion geben Tabelle 96 bis Tabelle 112 im Anhang (7.3), eine Zusammenfassung der Mengen an detektierten Proteinen zeigt Tabelle 60. Nach Ausschluss der in angrenzenden Fraktionen mehrfach detektierten Proteinmassen blieben insgesamt 1,215 verschiedene Massen übrig, von denen 132 Massen in jeder Wiederholmessung gefunden worden sind. Es wurden nur Proteinmassen beachtet, die im Dekonvolutionspektrum eine Intensität von mindestens 100 counts aufwiesen, bzw. auch bei geringerer Intensität eindeutige Spektren lieferten. Mehrfach detektierte Massen wurden bei Ausschluss der Mehrfachdetektion der Fraktion zugeordnet, in der ihnen die höchste Intensität im Dekonvolutionspektrum zukam. Abbildung 91 zeigt die Verteilung der detektierten Proteinmassen ohne mehrfache Detektion in Abhängigkeit der Retention in beiden Trenndimensionen. Anhand dieser Auftragung wurde erneut die gute Orthogonalität der zwei verwendeten Trennmechanismen ersichtlich.

Tabelle 60: Anzahl der detektierten Proteine je Injektion in den CF-Fractionen des *Escherichia coli*-Lysats mit und ohne mehrfach detektierte Massen, Anzahl der Proteinmassen, die in allen drei Injektionen detektiert wurden

Fraktion	Anzahl detektierter Proteine Messung 1 mit/ohne Mehrfachdetektion	Anzahl detektierter Proteine Messung 2 mit/ohne Mehrfachdetektion	Anzahl detektierter Proteine Messung 3 mit/ohne Mehrfachdetektion	Anzahl der in allen drei Injektionen detektierten Proteine ohne Mehrfachdetektion
#1	17/17	42/42	37/37	10
#2	96/84	113/103	26/17	14
#3	86/72	105/95	43/35	13
#4	81/70	39/32	23/18	8
#5	51/46	33/29	18/14	4
#6	12/9	23/21	33/31	7
#7	13/10	12/9	16/14	6
#8	67/59	22/16	16/10	5
#9	20/6	27/16	35/25	4
#10	19/10	29/21	35/28	2
#11	43/37	48/42	45/39	14
#12	72/55	76/63	87/73	15
#13	46/31	53/41	57/44	8
#14	41/30	34/25	64/56	11
#15	35/26	16/9	28/22	4
#16	64/57	15/13	24/20	7
#17	4/1	4/3	5/4	0
#18, #19, #20	0	0	0	0
Gesamtanzahl	767/620	691/580	592/486	132
insgesamte, unterschiedliche Massenanzahl				1,215

Die SwissProt-Datenbank enthält allein etwa 15,000 Einträge über Proteine von *Escherichia coli*. Ein ausführlicher Abgleich der detektierten Proteinmassen mit den Datenbank-Einträgen konnte manuell nur unter großem Zeitaufwand erfolgen, daher wurde davon abgesehen. Da jedoch neben der Messung der intakten Massen auch die Identifizierung der Proteine in den Fraktionen durch Verdauanalyse durchgeführt wurde (Kapitel 3.2.2), konnten die intakten Massen mit den theoretischen Massen aus der Identifizierung abgeglichen werden, was in Kapitel 3.2.3 erläutert wird.

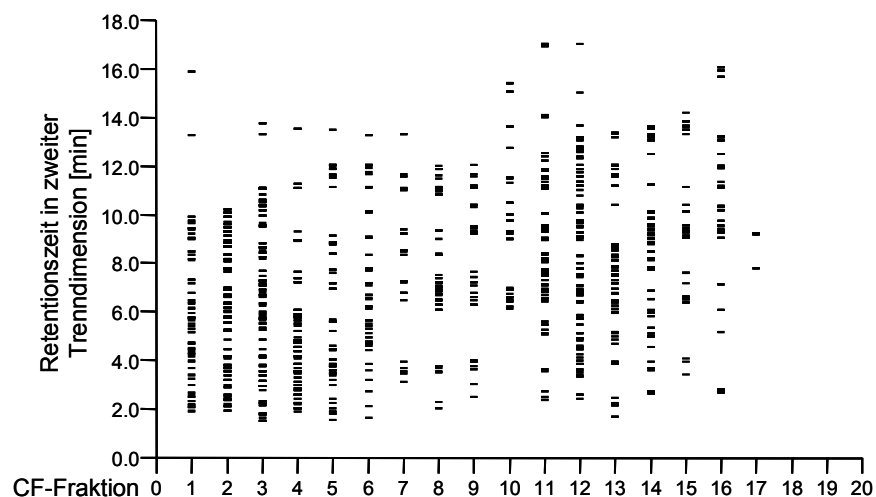


Abbildung 91: Verteilung der 1,215 detektierten Massen zwischen erster und zweiter Trenndimension; die CF-Fraktionennummer ist gegen die Retentionszeit in zweiter Trenndimension aufgetragen

3.2.2 Ergebnisse der Analyse der verdauten Proteine in den Fraktionen

Nach dreimaliger IP-RP-mikro-HPLC-Trennung und Tandem-MS-Detektion wurden die automatisch erzeugten Massenlisten der detektierten Peptide und Peptidfragmente automatisch mittels Mascot ausgewertet. Die zum Vergleich benutzten Datenbanken wurden auf das Bakterium *Escherichia coli* eingeschränkt. Zur Datenbankanalyse wurden weiterhin eine maximale Peptidmassenabweichung von 0.5 Da und eine Peptidfragmentmassenabweichung von 1.2 Da eingestellt. Die Ergebnisse wurden als Proteinlisten dargestellt. Die potentiell identifizierten Proteine sind im Anhang 7.3 in Tabelle 113 bis Tabelle 142 für jede Injektion mit den erhaltenen Namensindices (laut SwissProt), den MOWSE-Scores für die Proteine und den resultierenden Sequenzabdeckungen aufgelistet. Da anhand verschiedener Peptide teilweise mehrere Proteine identifiziert wurden, konnten allein anhand der Verdauanalyse keine konkreten Aussagen getätigt werden, welche Proteine tatsächlich und eindeutig im Lysat vorlagen.

Tabelle 61 zeigt die Anzahl der nachgewiesenen Proteinfamilien je Fraktion und Messung. Auch angegeben ist die Anzahl gleicher Identifizierungen in den drei Parallelmessungen, sowie die Menge aller in mindestens einer Messung einer Fraktion nachgewiesenen Proteine, wobei Mehrfachidentifizierung in angrenzenden Fraktionen ausgeschlossen wurden.

Tabelle 61: Zusammenfassung der Anzahl identifizierter Proteine in den CF-Fractionen anhand jeder Messung, in allen drei Fraktionsmessungen nachgewiesene Proteine (gesamt und mit mindestens 2 Peptiden), Anzahl der Identifikationen ohne Mehrfachdetektion in angrenzenden Fraktionen

Fraktion	Messung 1	Messung 2	Messung 3	in drei Injektionen	mit mindestens 2 Peptiden in allen Injektionen	ohne Mehrfachdetektion
#1	0	2	0	0	0	2
#2	14	13	6	4	3	18
#3	12	10	9	6	5	12
#4	7	0	9	0	0	9
#5	6	4	6	4	4	5
#6	5	0	9	0	0	6
#7	9	0	6	0	0	11
#8	4	0	6	0	0	8
#9	3	1	4	0	0	5
#10	6	3	6	1	1	7
#11	8	8	7	5	5	4
#12	2	0	6	0	0	4
#13	1	2	1	1	1	2
#14	1	1	0	0	0	1
#15	2	2	2	1	1	3
#16	5	6	5	4	4	6
#17	5	3	4	3	3	4
#18	2	3	1	1	1	4
#19	5	4	2	1	1	3
#20	5	6	7	2	2	9
#21	6	5	5	5	5	2
#22	2	3	2	2	2	1
#23	7	6	6	5	5	7
#24	7	6	7	3	3	11
#25	6	4	7	4	4	5
#26	9	8	9	6	6	8
#27	11	10	9	2	2	15
#28	7	8	8	4	4	7
#29	8	4	4	3	3	4
#30	6	5	3	2	2	5
Gesamt	171	127	156	69	67	188

Es wurden in allen 30 verdauten Fraktionen Proteine anhand von Peptidmassen- und -fragmentfingerprints (PMF und PFF) identifiziert, wobei ein Protein allerdings nur selten eindeutig nachgewiesen werden konnte. In den meisten Fällen wiesen die detektierten Proteine auf mehrere datenbankeingetragene Proteine hin, die sich auch anhand der Proteinmassen oder pI-Werte kaum unterschieden, so dass auch anhand dieser Parameter eine Aussage über die genaue Proteinsequenz nicht möglich war.

3.2.3 Vergleich der Messungen auf intakter Protein- und Verdauebene

Die Ergebnisse der Verdauanalyse der Fraktionen und der intakten Proteinuntersuchung der weiteren Fraktionierung wurden verglichen, wobei jeweils zwei Fraktionen der Verdauanalyse mit einer Fraktion der intakten Messungen abgeglichen wurden (intakte Fraktion 1 enthält die Proteine der Verdaufractionen 1 und 2). Tabelle 62 gibt eine vollständige Aufstellung der 94 übertragbaren gemessenen und identifizierten Massen, wobei eine Massenabweichung von etwa 50 Da noch als richtig angenommen wurde. Proteinmodifikationen wurde nicht beachtet. Mehrfach identifizierte Proteine in angrenzenden Fraktionen wurden nicht ausgeschlossen. Auch wurden Mehrfachidentifikationen, die auf denselben Peptidhits innerhalb einer Fraktion beruhten, nicht als eine Proteinfamilie betrachtet, so dass nach Eliminierung der mehrfach detektierten, identifizierten und zugeordneten Proteinmassen die Zahl auf 69 Proteine aus 52 Proteinfamilien verringert wurde.

Tabelle 62: Zuordnung zwischen identifizierten Proteinen aus der Verdauanalyse und den gemessenen Massen in der Messung auf intakter Proteinebene; Fraktionsnummer in der Verdauanalyse und der intakten Massenmessung, theoretische (unmodifizierte) Masse, gemessene intakte Masse und Proteinindex

Verdaufraktion	identifiziertes Protein	theoretische Masse in Da	intakt-gemessene Masse in Da	Fraktion intakte Messung	identifiziertes Protein	theoretische Masse in Da	intakt-gemessene Masse in Da	Fraktion intakte Messung
2	CSPC_ECO57	7267	7272	1	CSPE_ECO57	7328	7334	1
2	SODM_ECOLI	22952	22967	1	1WDNA	24619	24665	1
2	SODM_ECO57	22934	22967	1	CAA23634	8519	8557	1
2	G90725	45927	35932	1				
3	B64772	19035	19020	2	B85872	28466	28477	2
3	ABE08060	28480	28477	2				

Tabelle 62 (Fortsetzung)

Verdau- fraktion	identifiziertes Protein	theoretische Masse in Da	intakt- gemessene Masse in Da	Fraktion intakte Messung	identifiziertes Protein	theoretische Masse in Da	intakt- gemessene Masse in Da	Fraktion intakte Messung
5	ABE06921	63548	63589	3	E91177	12496	12520	3
5	Q8CW44_ECOL6	63560	63589	3	H64755	9914	9908	3
5	S30269	12514	12520	3	E85604	9910	9908	3
6	Q6JZ46_ECOLI	25494	25472	3	H90857	28707	28760	3
6	TSECA	28706	28760	3	S30269	12514	12520	3
6	AAB60046	28708	28760	3	E91177	12496	12520	3
6	AAA65158	28734	28760	3				
7	TSECA	28706	28709	4	AAB60056	28677	28709	4
7	Q6JZ44_ECOLI	25806	25864	4	R5EC33	6368	6348	4
7	AAB60046	28708	28709	4	S30269	12514	12519	4
7	AAB60052	28679	28709	4	E91177	12496	12519	4
7	AAA65158	28734	28709	4	CAA30738	10408	10470	4
7	AAA65170	28673	28709	4	Q5IMN5_SHIFL	21908	21970	4
7	H90857	28707	28709	4				
9	E90859	9380	9361	5	R5EC3	22230	22263	5
9	R5EC24	11309	11353	5				
10	RL19_ECO57	12994	13064	5	F85815	24676	24664	5
10	R5EC3	22230	22263	5	R5EC24	11309	11353	5
11	R5EC24	11309	11366	6				
13	R5EC3	22230	22254	7				
14	R5EC3	22230	22254	7				
15	RS20_ECO57	9547	9554	8				
16	Q8CVZ4_ECOL6	38735	38762	8	B91218	14026	14041	8
16	1T7PB	11395	11361	8	1SRX1	45480	45418	8
18	DNECS2	9529	9552	9				
19	RS20_ECO57	9547	9553	10				
20	DNECS2	9529	9553	10	RS20_ECO57	9547	9553	10
20	C91216	13125	13122	10				
21	ISECT	26955	26990	11	1GAEO	35366	35335	11
21	CAA25253	26954	26990	11	G3P1_ECO57	35379	35335	11
21	R5EC7	12288	12248	11				
22	G3P1_ECO57	35379	35335	11	DEECG3	35510	35504	11
22	1GAEO	35366	35336	11	G3P1_ECO57	35379	35336	11
23	EF ECS	30404	30421	12	AAA24075	39022	39075	12
23	Q2M7C3_ECOLI	39052	39075	12				
24	ENO_ECO57	45495	45444	12	ABE06238	29204	29217	12
24	1GAEO	35366	35336	12	CAA30738	10408	10471	12
24	DEECG3	35510	35509	12	EF ECS	30404	30421	12
24	G3P1_ECO57	35379	35336	12				
25	ENO_ECO57	45495	45465	13	HNS_ECO57	15399	15405	13
25	TPX_ECO57	17693	17668	13	DEECLP	50657	50698	13
26	TPX_ECO57	17693	17667	13	1DOS A1	11156	11186	13

Tabelle 62 (Fortsetzung)

Verdau- fraktion	identifiziertes Protein	theoretische Masse in Da	intakt- gemessene Masse in Da	Fraktion intakte Messung	identifiziertes Protein	theoretische Masse in Da	intakt- gemessene Masse in Da	Fraktion intakte Messung
26	ABE05519	37447	37395	13	1BG8A	8348	8369	13
26	ENO_ECO57	45495	45465	13	AAA24392	50276	50220	13
27	ADEC2A	39123	39140	14	1ACMB	16199	16157	14
27	SYECFA	36809	36773	14	1UCWA	35049	35091	14
27	E90931	36779	36773	14	TALB_ECOL6	35052	35091	14
27	ABE08263	27350	27396	14	TALB_ECO57	35066	35091	14
30	TPX_ECO57	17693	17651	15				

Durch diesen Analysenvergleich konnten aus großen Identifikations-Datensätzen, wie einer beispielsweise in Fraktion #7 der Verdauanalyse auftrat, die möglichen Proteine eingegrenzt werden. Durch die acht Peptide K.EGAFVPFVTLGDPGIEQSLK.I, K.VGVDSVLVADVPVEESAPFR.Q, R.HNVAPIFICPPNADDDLLR.Q, K.LKEYNAAPPLQGGFISAPDQVK.A, K.EYNAAPPLQGGFISAPDQVK.A, K.AAIDAGAAGAISGSAIVK.I, R.AALPLNHLVAK.L und K.IIEQHINEPEK.M wurden insgesamt 25 Proteine mit Massen zwischen 24 und 29 kDa durch die Datenbankanalyse mit sehr ähnlichen Wahrscheinlichkeiten und Sequenzabdeckungen identifiziert. Durch den Vergleich mit der intakten Massenmessung der Fraktion #4 konnte diese Anzahl auf acht mögliche Proteine eingeschränkt werden, wovon sich sieben anhand ihrer Sequenz kaum unterschieden. Unter Einbeziehung der möglichen Modifikationen bzw. einer genaueren Analyse durch Tandem-MS-Analyse des intakten Proteins könnte diese Gruppe weiter eingeschränkt werden.

3.3 Ergebnis und Diskussion der Untersuchung des *E. coli*-Lysats

Die Proteine des kommerziell erhältlichen Lysats von *Escherichia coli* wurde zweidimensional chromatographisch getrennt. Beide Trennmechanismen verhalten sich orthogonal zueinander, was durch die Abbildung 91 verdeutlichtet wurde. Die Zusammensetzung des Lysats wurde auf intakter Proteinebene und durch die Analyse der Verdaupeptide in den Fraktionen der ersten Trenndimension massenspektrometrisch untersucht. Es wurden mittels IP-RP-HPLC-TOF-MS 1,215 verschiedene intakte Proteinmassen in den 20 entnommenen 2 min-Fraktionen detektiert, wobei unterschiedliche Modifikationsgrade oder Proteinisofomen als eigenständige Proteine in die Zahl einbezogen worden sind. Die Analyse des Verdau ergab in den 30 entnommenen 1 min-Fraktionen eine Menge von 188

verschiedenen Proteinfamilien, deren genaue Zusammensetzung nicht weiter untersucht wurde. Durch die Übertragung der intakt gemessenen Proteinmassen auf die einzelnen Proteine der 188 Proteinfamilien konnte die Wahrscheinlichkeit der richtig identifizierten Proteine für 69 einzelne Proteine in 52 Proteinfamilien erhöht werden, was in Abbildung 92 nochmals dargestellt ist.

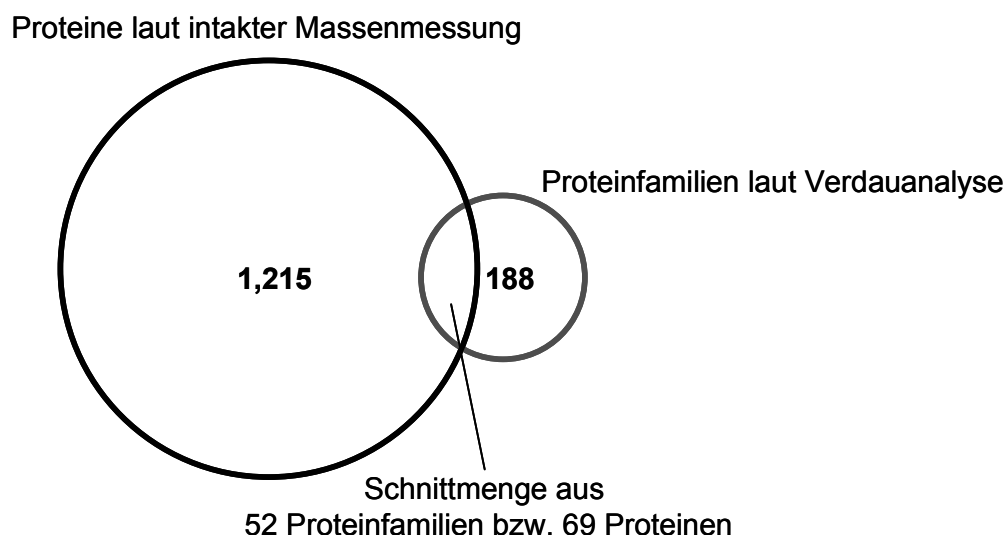


Abbildung 92: Anzahl und Schnittmenge der mit beiden Methoden dargestellten Proteine

Die Untersuchungen wurden mit steilen Gradienten für alle verwendeten Trennmethode durchgeführt, wodurch der Zeitbedarf für die gesamte Proteomanalyse auf maximal eine Woche (inklusive den Fraktionierungen, Konzentrierungen, dem Verdaus und den jeweils drei parallelen Messungen) limitiert wurde. Allerdings hatte dies auch eine reduzierte Peakkapazität und somit nicht optimale Trennung zur Folge, was anhand der vermehrten Koelutionen in der intakten Proteinmessung mittels TOF-MS deutlich wurde. Auch die geringe Anzahl detektierter Peptidmassen und daraus resultierender Identifikationen in den einzelnen Fraktionen resultierten aus Koelution der Peptide und somit unvollständiger Erfassung der enthaltenen Analyte. Dieses Problem wurde durch geringe injizierte Menge und Konzentration der verdauten Fraktionen noch verstärkt. Des Weiteren traten gehäuft Oxidationen und Fehlschnitte an den Peptiden auf, wodurch die Datenbankanalyse zwar nur geringfügig beeinträchtigt wurde (durch die

Einstellung der Oxidation als variable Modifikation), die Konzentration der unmodifizierten Peptidsequenz jedoch teilweise stark herabgesetzt wurde.

Durch die Optimierung der chromatographischen Methoden bezüglich der Gradientensteilheit und -dauer wäre durch den Anstieg der Peakkapazität die Wahrscheinlichkeit einer Steigerung der Anzahl identifizierter bzw. detektierter Peptide und Proteine möglich gewesen, wurde jedoch wie bereits dargestellt zugunsten der Gesamtanalysendauer nicht durchgeführt. Die Trennmechanismen und Detektionsmethoden haben anhand dieser Analyse jedoch ihre Eignung für die Proteomanalytik eindeutig bewiesen, was vor allem durch die Verteilung der detektierten nativen Proteine innerhalb der Trennstrecken bestätigt wurde. Über die gesamte Chromatofokussierung bzw. in allen entnommenen Fraktionen wurden Proteine nachgewiesen, die innerhalb der zweiten Trenndimension wiederum eine Retentionsverteilung über die gesamte Gradientendauer zeigten. Durch das Fehlen geeigneter Werkzeuge oder Datenbanken für den direkten Abgleich intakter, gemessener Proteinmassen mit theoretischen Massen nativer Proteine (inklusive aller möglichen Modifikationen) gestaltete sich die Auswertung und Übertragung der Ergebnisse als schwierig und sehr zeitaufwändig. Gerade in Hinblick auf die zukünftig verstärkte Anwendung der top-down-Strategie innerhalb der Proteomanalytik stellt dieses Defizit eine besondere Herausforderung für bioinformatische Entwicklungen dar.

4 Charakterisierung und Identifizierung von Bromelain

Bromelain ist eine 1957 in der Ananas entdeckte glycosylierte Cystein-Protease. Sie kommt sowohl in der Frucht als auch im Stamm der Pflanze vor und kann aus beiden mit hoher Ausbeute gewonnen werden. Ihren Einsatz findet sie auf vielfältigen Gebieten. In der Medizin wird sie in Form von magensaftresistenten Kapseln zur Behandlung akuter und chronischer Entzündungen und als Verdauungshilfe eingesetzt ^[8,9]. Außerdem wies sie bereits in verschiedenen vorklinischen und pharmakologischen Studien wundheilende und antimetastatische Wirkungen auf. Bromelain zeigt gerinnungs- und entzündungshemmende Wirkungen, die auf den geförderten Abbau des Proteins Fibrin im Blut zurückgeführt werden. Die Protease beeinflusst das Immunsystem positiv, indem sie die Auflösung körperfremder Antigene fördert und somit die Infektion bzw. Antikörperreaktion hemmt ^[8,10]. Lebensmitteltechnologisch wird Bromelain eingesetzt als Fruchtsaftklärendes Mittel und als Zartmacher für Fleisch. Auch als Weichmacher für Gelatine findet es Anwendung sowie in der Lederverarbeitung. In Latexfarbstoffen wirkt es als Stabilisator.

Neben der reinen Protease wird umgangssprachlich auch der Rohextrakt der Pflanzenteile als Bromelain bezeichnet. Dieser enthält neben der Protease und Calcium mehrere weitere sulfhydrylhaltige, proteolytisch wirksame Enzyme, ein Peroxidase-Enzym, ein Phosphatase-Enzym und verschiedene Protease-Hemmstoffe. Gegenüber der reinen Protease zeichnet sich der Extrakt durch eine erhöhte Aktivität die nachgewiesenen medizinischen Wirkungen betreffend aus, was auf synergistische Effekte zwischen den einzelnen Substanzen und/oder eine erhöhte Stabilität der aktiven Komponente schließen lässt ^[9,11,12]. Als Protease kann es zur Strukturaufklärung anderer Proteine durch spezifische Verdaureaktion benutzt werden. Die eigene Struktur der Ananasprotease und speziell des Bromelains ist jedoch nur unzureichend anhand der entschlüsselten DNA-Kodierung belegt ^[11,13]. Je nach Unterart der Pflanze variiert die tatsächlich exprimierte Aminosäuresequenz. Auch die enthaltenen Glycanstrukturen als Modifikationen unterscheiden sich aufgrund der Unterart und erwartungsgemäß natürlicher Gegebenheiten wie dem Alter und geographischer Lage sowie Klima und Pflanzengesundheit. Neben der Strukturprüfung im Vergleich zu veröffentlichten Sequenzen sollte in diesem Kapitel auch die Charakterisierung der Proteine und Proteinmodifikationen eines Ananas-

Rohextraktes anhand der intakten Masse erfolgen. Der verwendete Rohextrakt wurde durch Auslaugen von Ananasstämmen und Trocknung von Frau Dr. Nora Luniak aus dem Arbeitskreis Pharmazeutische Biotechnologie von Prof. Dr. Rolf Müller von der Universität des Saarlandes hergestellt und für die Analysen zur Verfügung gestellt.

4.1 Übersicht der verwendeten Methoden

Der Bromelain-Extrakt wurde in einer Konzentration von 110 µg/mL mit destilliertem Wasser gelöst, mit einer SCX-Methode getrennt und nach Peak manuell fraktioniert. Die Fraktionen wurden durch Ultrazentrifugation gewaschen und bis zu bis zu einem Volumen von 100 µL aufkonzentriert. Die Fraktionen wurden mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS auf intakter Proteinebene mit einem schnellen Gradienten von 15 min analysiert. Anhand der Analyse der intakten Proteine ließen sich Aussagen über den Glycosylierungsgrad der Proteine treffen. Außerdem wurde ein Teil der Fraktionen nach Denaturierung und Reduzierung der Proteine tryptisch verdaut und die Peptide wurden anschließend mittels IP-RP-mikro-HPLC-Ionenfallen-Tandem-MS analysiert. Nach Datenbank-gestützter Auswertung konnten Aussagen über die Sequenz der untersuchten Proteine getroffen werden.

4.1.1 Kationenaustauschchromatographie von Bromelain-Rohextrakt

In Anlehnung an die Bromelain-Trennung von Harrach et al. ^[11] wurde die Kationenaustausch-Methode adaptiert. Auf einer starken Kationenaustauscherphase mit 2 mm i.D. wurden die bereits bewährten Eluentenmischungen mit dem von Harrach benutzten 4-Stufengradienten wie in Tabelle 63 angegeben zur Trennung verwendet.

Tabelle 63: Trennparameter der SCX-Methode

- | | |
|------------------|---|
| ➤ Vorsäule: | ProPac SCX-10, 50x2 mm |
| ➤ Trennsäule: | ProPac SCX-10, 250x2 mm |
| ➤ Trenneluenten: | A: 50 mM Bicin in Wasser, pH 8.9
B: 50 mM Bicin, 200 mM Natriumchlorid in Wasser, pH 8.9 |

Tabelle 63 (Fortsetzung)

- Säulenfluss: 0.25 mL/min
- 4-Stufengradient:
 1. Stufe: 0-42 % Eluent B in 46 min
 2. Stufe: 42-71 % Eluent B in 24 min
 3. Stufe: 71-100 % Eluent B in 1 min
 4. Stufe: 19 min isokratisch 100 % Eluent B
- Trenntemperatur: Raumtemperatur
- Injektionsvolumen: 20 µL
- Detektion: UV bei 280 nm
- Fraktionennahme: manuell, nach Peak

Die entnommenen Fraktionen wurden in Filterröhrchen (10,000 MWCO) durch Zentrifugation mit 4,000 Umdrehungen pro Minute mit 2 mL destilliertem Wasser gewaschen und anschließend bis auf ein Volumen von etwa 50 bis 80 µL aufkonzentriert.

4.1.2 IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS intakter Proteine in den SCX-Fraktionen

Zur Analyse der intakten Proteinmassen in den Fraktionen wurden die in Tabelle 64 aufgeführten Trennparameter und die in Tabelle 65 beschriebenen MS-Parameter verwendet.

Tabelle 64: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der intakten Proteine in den SCX-Fraktionen

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 2.0 µL/min

Tabelle 64 (Fortsetzung)

- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 15 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 5 µL

Tabelle 65: TOF-MS-Parameter zur Darstellung der intakten Proteine

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.5 bar	Pulsar Push/Pull	389 V
Dry Gas	5.0 L/min	Corrector Fill	95 V
Dry Temperature	200 °C	Reflector	1300 V
End plate offset	-500 V	Flight Tube:	9000 V
Capillary	3500 V	Corrector Extract	849 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	1990 V
Parameter der Ionenoptik			
Capillary exit	230.0 V	Lens 1 storage	40.0 V
Skimmer 1	49.2 V	extraction	21.8 V
Hexapole 1	17.5 V	Lens 2	3.8 V
Skimmer 2	24.2 V	Lens 3	13.7V
Hexapole 2	22.3 V	Lens 4	-30.0V
Hexapole RF	637.1 V	Lens 5	16.6 V
Pre Puls Storage Time	20 µs	Focus	nicht aktiv
		Transfer Time	81.0 µs

4.1.3 IP-RP-mikro-HPLC-Ionenfallen-MS von Peptiden in SCX-Fractionen

Für den Verdau wurden die aufkonzentrierten Fraktionen zunächst jeweils mit 5 mM Tributylphosphin versetzt und 30 min bei 60°C zur quantitativen Denaturierung und Reduzierung der Disulfide inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung in Wasser (pH 7.8) auf etwa das doppelte Volumen verdünnt. In Trypsin-Puffer gelöstes Trypsin wurde für 15 min bei 37°C aktiviert und dann im Enzym-zu-Substratverhältnis 1:50 hinzugegeben, wobei von einer einheitlichen Verteilung der Proteine in den einzelnen Fraktionen ausgegangen wurde, was zu einer Substratkonzentration von etwa 500 ng/Fraktion

fürte. Den Fraktionen wurden somit 10 ng Trypsin zugegeben und diese Lösungen wurden anschließend bei 37°C über Nacht im Thermomixer inkubiert und die Proteine verdaut. Die Verdaureaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1 µL TFA, wodurch die Lösung sauer und das Trypsin denaturiert wurde. Die verdauten Peptide wurden anschließend mit den in Tabelle 66 angegebenen Parametern chromatographisch getrennt und gemäß der Parameter in Tabelle 67 Tandem-massenspektrometrisch analysiert. Für die Tandem-MS-Detektion wurde eine im Arbeitskreis bereits bewährte Methode gewählt, Optimierungen wurden nicht durchgeführt.

Tabelle 66: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der Verdaupeptide in den SCX-Fraktionen

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 60x0.1 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 0.7 µL/min
- Gradient: linear 0-40 % Eluent B in 30 min
- Trenntemperatur: 55°C
- Injektionsvolumen: 2 µL

Tabelle 67: Ionenfallen-Tandem-MS-Parameter zur Darstellung von Peptiden

Spraygas	20.0 psi	Capillary exit	253.8 V
Dry Gas	4.0 L/min	Trap Drive	93.2
Dry Temperature	300 °C	Octopole RF Amplitude	88.5 Vpp
End plate offset	-500 V	Lens 2	-36.1 V
Capillary	-4000 V	Max. Accu Time	200 ms

Tabelle 67 (Fortsetzung)

Scanbereich	450-1500 m/z	ICC Target	70,000
MS Spektren-Summierung	5	Ms(n) Spektren-Summierung	5
Vorläuferionen Auto-MS(2)	3	Ausschluss nach	2 Spektren 0.5 min

4.2 Ergebnisse

Mittels der Kationenaustauschtrennung wurden die basischen, hochkonzentrierten Proteine im Rohextrakt des Ananasstammes vereinzelt und konnten mit den weiteren HPLC-MS-Methoden unbeeinflusst charakterisiert werden. Insgesamt wurden die vier intensivsten Peaks aus der SCX-Trennung fraktioniert und untersucht. Diese weiteren Analysen verfolgten verschiedene Ziele: mittels Flugzeit-MS wurden die intakten Massen der Proteine gemessen und Zuordnungen zu theoretischen Massen veröffentlichter Ananas-Protein-Sequenzen getroffen, die eigentliche Identifizierung sowie die parallele Überprüfung der Sequenzen erfolgte mittels Tandem-MS der tryptischen Peptide.

4.2.1 Kationenaustausch-HPLC - Trennung und Fraktionierung

Die in Tabelle 63 beschriebene Kationenaustausch-Methode wurde zur Trennung der in 2.2 µg Rohextrakt enthaltenen Proteine benutzt und zeigt das in Abbildung 93 dargestellte Chromatogramm. Es wurden insgesamt 11 Fraktionen mit unterschiedlichen Volumina entnommen. Die Bezeichnung der Fraktionen erfolgte in Anlehnung an die veröffentlichte Methode nach Harrach et al. ^[11] mit wenigen Modifikationen, da teilweise eine bessere Antrennung der Peaks in der benutzten Methode erfolgte.

Die als F4 und F5 bezeichneten Hauptfraktionen bzw. -peaks konnten mit hinreichend guter Trennung von einander dargestellt werden. Die Trennung wies wie erhofft trotz verschiedener stationärer Phase einen ähnlichen Verlauf auf, wie die Originalmethode. Die Fraktionen F4, F5 und F9, die laut Harrach et al. ^[11,13] die Proteine Ananain und Bromelain enthalten sollten sowie die Fraktion F1, in der alle sauren Ananas-Proteine vereint waren, wurden im Folgenden

massenspektrometrisch untersucht, wobei es in erster Linie um die Identifizierung von Bromelain-Sequenzen und von Ananain ging. Die restlichen Fraktionen wurden verworfen.

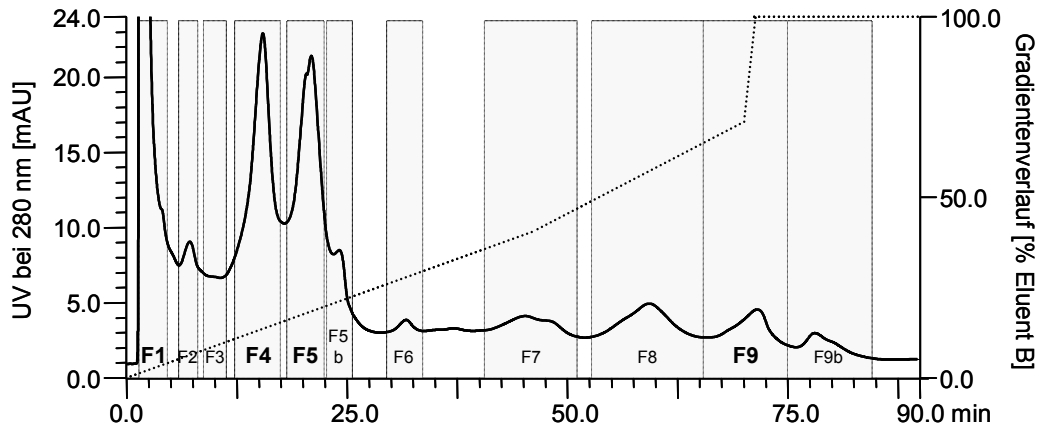


Abbildung 93: UV-Chromatogramm und Gradientenverlauf der SCX-Trennung des Bromelain-Rohextraktes; entnommene Fraktionenbereiche sind hinterlegt und nach Harrach et al. annotiert.

Die Ultrazentrifugation der Fraktionen mit einem Größenausschluss von 10 kDa zeigte gegenüber Lösemittelverdampfung den Vorteil, dass die enthaltenen Puffersubstanzen der Eluenten aus der Fraktion entfernt wurden und somit weder die anschließende Verdaureaktion noch eine direkte massenspektrometrische Analyse stören konnten. Auch war es möglich, diesen Effekt durch Waschschriffe mit destilliertem Wasser zu unterstützen.

4.2.2 Darstellung der intakten Proteinmassen

Die aufkonzentrierten, entsalzten Fraktionen F1, F4, F5 und F9 wurden mit der in Tabelle 64 und Tabelle 65 angegebenen Methoden zur Ermittlung der intakten Molekülmassen der enthaltenen Proteine untersucht. Die BPCs dieser Trennungen sind in Abbildung 94 dargestellt.

In jeder Fraktion wurden verschiedene intakte Proteinmassen detektiert, woraus sich schließen lässt, dass entweder die Fraktionierung mit der zuvor beschriebenen Kationenaustausch-Methode nicht spezifisch genug für das vorliegende Trennproblem war oder dass zwischen der Fraktionierung und der Reinjektion in die zweite Trenndimension Zersetzungen des vereinzelt Proteins stattfanden, was aufgrund der Anwesenheit verschiedener Proteasen im Rohextrakt durchaus möglich

war. Beide Thesen wurden nicht weiter untersucht, es wurden somit alle detektierten Proteinmassen anhand vorliegender Sequenzen interpretiert. Tabelle 68 gibt eine Zusammenfassung der in den Fraktionen detektierten intakten Proteinmassen, die in Form der Spektren und Dekonvolutionspektren in Folge ihrer Retentionszeit in Anhang 7.5 als Abbildung 115 bis Abbildung 118 gezeigt sind.

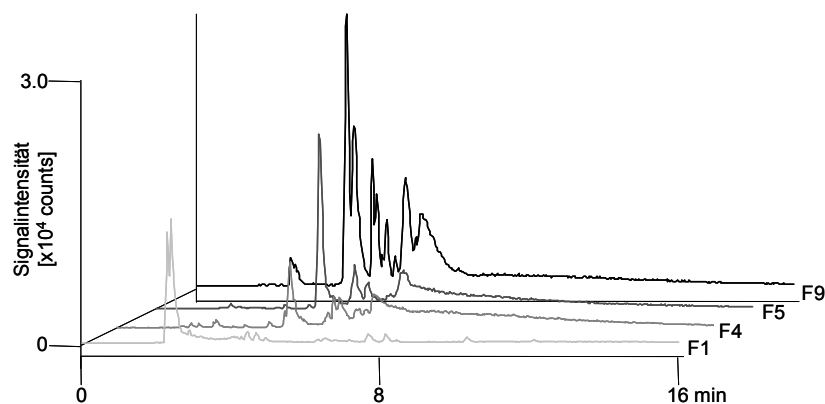


Abbildung 94: BPCs der intakten Proteinmessungen der Bromelain-SCX-Fraktionen F1, F4, F5 und F9

Tabelle 68: Gemessene, intakte Proteinmassen

Fraktion	Retentionszeit in min in zweiter Trenndimension	Gemessene, intakte Masse in Da	Fraktion	Retentionszeit in min in zweiter Trenndimension	Gemessene, intakte Masse in Da
F1	4.466	19141.5	F5	4.480	17966.9
		17967.6	F5	5.425	24774.0
F1	6.384	24469.6	F5	5.740	24468.7
F1	6.603	24394.1	F5	6.685	48938.6
F1	7.781	26508.7			
F1	10.370	15388.9	F9	4.069	19141.4
F1	12.165	35664.8	F9	4.302	10466.8
			F9	4.754	12025.3
F4	4.575	17967.4	F9	4.850	11735.9
F4	4.767	17789.0	F9	5.014	13194.4
F4	5.699	24698.6	F9	5.110	13629.0
F4	5.904	24501.6	F9	5.384	23469.2
F4	6.096	24394.4			13339.8
F4	6.753	48865.9	F9	5.645	23453.2
F4	7.055	48787.7	F9	5.905	23789.6
			F9	6.124	23821.1

Da es sich bei den erwarteten Proteinen um glycosylierte Strukturen mit nicht komplett aufgeklärter Sequenz handelte, war eine direkte Übertragung der gemessenen auf theoretische Massen nicht möglich. Die Interpretation der erhaltenen Massen erfolgte somit erst im Vergleich zu den auf Peptidbasis identifizierten Proteinen. Die Proteinspektren im Retentionsbereich von 5 bis 7 min in den Fraktionen F4 und F5 ließen jedoch bereits darauf schließen, dass es sich bei den Substanzen um glycosylierte Proteine in unterschiedlichen Glycosylierungsstadien handelte. Anhand der Dekonvolutionsspektren dieser Substanzen waren deutlich verschiedene Massen mit Massendifferenzen von etwa 1,600 Da erkennbar.

4.2.3 Sequenzanalyse und Datenbankvergleich

Nach dreimaliger IP-RP-mikro-HPLC-Trennung und Tandem-MS-Detektion wurden die automatisch erzeugten Massenlisten der detektierten Peptide und Peptidfragmente automatisch mittels Mascot ausgewertet. Die zum Vergleich benutzten Datenbanken wurden manuell erzeugt und beinhalteten zum einen die veröffentlichten Proteinsequenzen für Bromelain und Ananain der Spezies *Ananas comosus* und zum anderen neu generierte Sequenzen, die durch eine von Dr. Luniak durchgeführte DNA-Dekodierung zur Verfügung standen. Die in dieser Datenbank enthaltenen Sequenzen sind im Anhang 7.5 in Tabelle 143 aufgeführt. Zur Datenbankanalyse wurden weiterhin eine maximale Peptidmassenabweichung von 0.5 Da und eine Peptidfragmentmassenabweichung von 1.2 Da eingestellt. Die Ergebnisse wurden als Proteinlisten dargestellt. Die identifizierten Proteine sind in Anhang 7.5 für die Fraktionen F4 und F5 mit jeder Injektion (Doppelbestimmung) mit den erhaltenen Namensindices (laut SwissProt bzw. eigenem Datenbankeintrag), den MOWSE-Scores für die Proteine und den resultierenden Sequenzabdeckungen in Tabelle 144 bzw. Tabelle 145 aufgelistet. Da anhand verschiedener Peptide teilweise mehrere Proteine mit geringen Sequenzabdeckungen identifiziert wurden, konnten allein anhand der Verdauanalyse keine konkreten Aussagen getätigt werden, mit welcher Sequenz die Proteine tatsächlich in der Fraktion bzw. dem Rohextrakt vorlagen.

In Fraktion F1 wurde mittels Tandem-MS ein Peptid detektiert, dessen Sequenz jedoch keinen Treffer innerhalb der verwendeten Datenbank lieferte. In der zweiten Injektion der Fraktion F9 wurde ein Peptid detektiert, das mit geringer

Sequenzabdeckung und einem sehr kleinen Score von 20 der Ananain-Proteinfamilie zugeordnet werden konnte. Aufgrund des kleinen Scores konnte diese Zuordnung jedoch nicht als sicher angesehen werden und musste durch den Vergleich mit der gemessenen intakten Masse abgesichert werden. In den Fraktionen F4 und F5 wurden jeweils zwei sehr ähnliche Peptidgruppen detektiert, die auf zwei Proteinfamilien hindeuteten, wobei eine dieser Familien die veröffentlichten Bromelainsequenzen umfasste.

4.3 Interpretation und Diskussion der Ergebnisse

Die Identifikation mittels Tandem-MS-Analyse der Proteine in den Fraktionen F4 und F5 war wie bereits beschrieben nicht eindeutig, da verschiedene Proteinsequenzen den detektierten Peptiden zugeordnet wurden. Durch die zweifache Injektion der Fraktionen konnten Einschränkungen der Proteinlisten vorgenommen werden, sofern die betrachtete Sequenz nicht innerhalb beider Messungen identifiziert wurde. Tabelle 69 gibt einen Überblick über die jeweils identifizierten Proteine und die vorgenommenen Einschränkungen und zeigt zusammengefasst die theoretischen Massen der Sequenzen.

Zuordnungen zu gemessenen intakten Proteinmassen konnten nicht getroffen werden, da die Massen der identifizierten Sequenzen größer waren als die intakt gemessenen Massen. Aufgrund der geringen Sequenzabdeckungen bei der Identifizierung konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Proteine bereits vor dem Verdauvorgang undefiniert fragmentiert vorlagen und daraus die vergleichsweise geringeren intakten Massen resultierten. Aus den Spektren der intakten Proteinmessungen ging hervor, dass verschiedene Proteine in glycosylierter Form vorlagen. Dies stützte die vorgenommenen Identifizierungen hinsichtlich der Proteinfamilie des Bromelains, da dies ein glycosyliertes Protein ist. Aufgrund der Ähnlichkeiten innerhalb der vorgeschlagenen Sequenzen wurde die genaue Strukturanalyse erschwert. Bei der verwendeten Methodik hätten ganz spezifische Peptide detektiert werden müssen, um genaue Aussagen treffen zu können. Selbst die Unterscheidung der Fraktionen F4 und F5, die aufgrund der verschiedenen Retentionszeiten im Kationenaustausch sowie wegen unterschiedlichen Proteinmassen innerhalb der intakten Messung nicht die gleiche Zusammensetzung besitzen konnten, war nicht möglich. Ohne die genaue Sequenzmasse zu kennen,

konnte auch keine Aufklärung der Glycosylierungsstruktur erfolgen, da hierfür die Differenzmasse zwischen Aminosäuresequenz und glycosylierter Sequenz eine wichtige Rolle spielte.

Tabelle 69: Zusammenfassung der Proteinidentifikationen in den Fraktionen F4 und F5, hervorgehoben sind Identifikationen, die in beiden Injektionen auftraten

Fraktion	Identifiziertes Protein	Theoretische Masse in Da	Score in Messungen 1 / 2
F4	Translation of 91-85	25467	145 / 145
	An8CAA08860	25194	145 / 145
	BromAn11	40090	145 / 0
	BromAn11aktAV	25757	145 / 0
	BromAn11aktV	25686	145 / 0
	BAA22544	25227	145 / 0
F4	AAB70820	42624	9 / 21
F5	Translation of 91-85	25467	17 / 34
	An8CAA08860	25194	16 / 35
	BromAn11	40090	16 / 34
	BromAn11aktAV	25757	16 / 34
	BromAn11aktV	25686	16 / 34
	BAA22544	25227	16 / 16
F5	AAB70820	42624	25 / 0

In der Fraktion F9 wurden verschiedene Ananain-Sequenzen anhand eines Peptides in der zweiten Reinjektionen der Fraktion identifiziert. Hierüber gibt Tabelle 70 einen Überblick. Auch für die identifizierten Proteine war ein Abgleich mit den intakt gemessenen Massen nicht möglich. Allerdings zeigten die intakten Proteinspektren dieser Fraktion keine typischen Glycosylierungsmuster (Massenverschiebungen, Ladungszustandsgruppierung), so dass von der Anwesenheit eines oder mehrerer unglycosylierter Proteine in dieser Fraktion ausgegangen werden konnte. Dies unterstützte zumindest die identifizierte Proteingruppe des Ananains, da dieses Protein unglycosyliert vorliegt. Welche Struktur genau dem Ananain zugesprochen werden muss, konnte an dieser Stelle jedoch nicht geklärt werden.

Tabelle 70: Zusammenfassung der Proteinidentifikationen in der Fraktion F9, in Messung 1 wurde kein Protein identifiziert

Peptidsequenz	Identifiziertes Protein	Theoretische Masse des Proteins in Da	Score / Sequenzabdeckung in Messung 2 in %
K.FWIVR.N	AnanAkt	24109	20 / 2
	AnanPrec	38248	20 / 1
	Ananain precursor CAA05487	24109	20 / 2
	BromAn1	38248	20 / 1
	BromAn1Akt	24109	20 / 2
	An11CAA08861	25501	20 / 2

Anhand der vorgenommenen Fraktionierung mittels Kationenaustausch und der Folgeuntersuchungen der intakten Proteinmassen sowie der Tandem-MS-Analyse der tryptisch verdauten Proteine in den Fraktionen ließ sich erkennen, dass in den Fraktionen F4 und F5 verschiedene Formen des Bromelains detektiert werden konnten. Die Fraktion F9 enthielt Ananain. Genaue Strukturinformationen bezüglich der Sequenz und der im Bromelain vorhandenen Glycane wurden nicht erhalten.

Eine direkte Fragmentierung der intakten Proteine könnte speziell bezüglich der Sequenzanalyse den Vorteil bringen, eine höhere Sequenzabdeckung zu erzielen und somit eine bessere Einschränkung der Sequenzvorschläge durchführen zu können. Eine andere Methode zur Vorfraktionierung hätte möglicherweise ebenfalls den Vorteil, die Sequenzabdeckung der identifizierten Proteine zu erhöhen, falls das verwendete Bicin trotz Ultrazentrifugation einen Einfluss auf die Verdaubarkeit oder anschließende MS-Analyse besitzt.

5 Analyse der Hauptproteine von Molke

Molke ist die verbleibende gelbgrünliche Flüssigkeit innerhalb der Käseherstellung nach Abscheidung des Caseins und des Milchfettes. Man unterscheidet Süßmolke und Sauermolke anhand der Wasserabscheidung mittels Lab oder Säuerung, wobei Süßmolke Verwendung als Trinkmolke findet, wegen ihres ernährungsphysiologisch wertvollen Gehaltes an Proteinen und Milchzucker^[14]. Der nicht abzentrifugierbare Proteinanteil von Molke besteht zum Großteil aus α -Lactalbumin und den β -Lactoglobulinen A und B. Diese drei Proteine wurden nach Aufbereitung der handelsüblichen Proben durch Zentrifugation anhand ihrer intakten Proteinmassen mit den beiden massenspektrometrischen Methoden dargestellt und nachgewiesen und anschließend anhand einer externen Kalibrierreihe bestehend aus den drei Proteinen mit definierten Konzentrationen quantifiziert^[15-18]. Absolute und allgemeingültige Proteingehalte stehen für biologische Matrices nicht zur Verfügung, da die Ausprägung der Zusammensetzung von verschiedenen Faktoren abhängt: Alter und genaue Spezies des/der Tiere(s), Lagerung der Rohmilch und der Zwischenprodukte, Herstellungsverfahren zur Erlangung des Endproduktes, Lagerart und -zeit des Endproduktes. Somit können auch Abweichungen zwischen den Herstellerangaben und den tatsächlichen Gehalten auftreten^[14].

5.1 Zur Darstellung und Quantifizierung von Molkeproteinen verwendete Methoden

Die Hauptproteine der Molke wurden nach Zentrifugation mittels IP-RP-mikro-HPLC getrennt und massenspektrometrisch dargestellt. Hierbei wurden eine Ionenfallen- und eine Flugzeit-MS-Methode verwendet und die Ergebnisse verglichen. Neben der reinen Darstellung der Proteine wurden externe Kalibrierreihen mit beiden Methoden angefertigt und die Gehalte der Proteine in den Proben ermittelt.

5.1.1 Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung wurden zwei handelsübliche Molkeproben jeweils mit 20 % Acetonitril in 0.05 % wässriger TFA-Lösung im Verhältnis 1:9 verdünnt und 20 min bei Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit

0.05 % wässriger TFA auf Endverdünnungen mit den Faktoren 100 für Molkeprobe 1 (Hersteller Strothmann) und 500 für Molkeprobe 2 (Hersteller Demeter) versetzt. Diese verdünnten Proben wurden wie in den folgenden Kapiteln angegeben qualifiziert und quantifiziert.

5.1.2 Nachweis und Quantifizierung von Molkeproteinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS

Es wurden die folgenden Parameter zur Trennung und Detektion innerhalb der Untersuchung mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS verwendet.

Tabelle 71: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der intakten Proteine in den CF-Fractionen

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 10 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 2 µL/min
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 15 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 1 µL

Tabelle 72: TOF-MS-Parameter zur Darstellung intakter Molkeproteine

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.5 bar	Pulsar Push/Pull	771 / 0 V
Dry Gas	4.0 L/min	Corrector Fill	53 V
Dry Temperature	200 °C	Reflector	1688 V
End plate offset	-400 V	Flight Tube:	8612 V
Capillary	4000 V	Corrector Extract	555 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	2140 V
Parameter der Ionenoptik			
Capillary exit	215.9 V	Lens 1 storage	50.0 V
		extraction	25.7 V
Skimmer 1	79.0 V	Lens 2	-9.5 V
Hexapole 1	46.0 V	Lens 3	30.2 V
Skimmer 2	12.0 V	Lens 4	-17.5V
Hexapole 2	25.4 V	Lens 5	-46.6 V
Hexapole RF	368.3 V	Focus	aktiv
Pre Puls Storage Time	15.0 µs	Transfer Time	88.0 µs

5.1.3 Nachweis und Quantifizierung von Molkeproteinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-IT-MS

Es wurden die folgenden Parameter zur Trennung und Detektion innerhalb der Untersuchung mittels IP-RP-mikro-HPLC-IT-MS verwendet.

Tabelle 73: IP-RP-mikro-HPLC-Bedingungen zur Trennung und Untersuchung intakter Molkeproteine bei Kopplung an das IT-MS

- Trapsäule: PS/DVB, 10x0.2 mm
- Beladungsflüssigkeit: 0.1 % HFBA in Wasser
- Beladungsfluss: 15 µL/min
- Beladungsdauer: 3 min
- Beladungstemperatur: Raumtemperatur
- Trennsäule: PS/DVB, 50x0.2 mm

Tabelle 73 (Fortsetzung)

- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 2 $\mu\text{L}/\text{min}$
- Gradient: linear 20-50 % Eluent B in 15 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 1 μL

Tabelle 74: IT-MS-Parameter zur Darstellung intakter Molkeproteine
Ionisierung und Ionenoptik

Sprayspannung	3.0 kV	Kapillarlänge	0.33 mm
Sprühgas	15 arb	Sprayer z-Richtung	B-Ring mittig
Hilfsgas	1.5 arb	Sprayer y-Richtung	0.06 Skt
Kapillartemperatur	250°C	Sprayer x-Richtung	mittig
Kapillarspannung	91.0 V	Tube Lens	170.5 V
Multipole 00 offset	-1.0 V	Multipole RF	657 Vp-p
Lens 0	-7.5 V	Front Lens	-7.25 V
Multipole 0 offset	-11.5 V	Front Section offset	-9.0 V
Lens 1	-22.0 V	Center Section offset	-12.0 V
Gate Lens	-32.0 V	Back Section offset	-7.0 V
Multipole 1 offset	-8.0 V	Back Lens	0.0 V

5.1.4 Zusammensetzung der Kalibrierreihen und Durchführung der externen Kalibrierung

Die Proteine α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A und β -Lactoglobulin B wurden in einer Konzentration von 1 mg/mL in 0.05 % wässriger TFA-Lösung gelöst, in kleinen Portionen gleicher Volumina zusammen pipettiert und mit 0.05 % wässriger TFA-Lösung auf eine Konzentration von 100 ng/ μL verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurden Kalibrierstandards von 1 bis 10 ng/ μL für jedes Protein in 0.05 % wässriger TFA-Lösung hergestellt und wie die Molkeproben analysiert (vgl. Kapitel 5.1.2 und 5.1.3). Die Konzentration der Standardreihe lag somit um einen Faktor 10 bis 100

unter veröffentlichten externen Kalibrierreihen ^[18]. Auf diese Art sollte die Empfindlichkeit der angewendeten Methode untersucht werden, so dass zukünftig die Untersuchung dieser Proteine in den vorliegenden Konzentrationen im Spurenbereich gewährleistet werden könnte.

5.2 Ergebnisse der Molkeuntersuchung mittels Flugzeit-MS

Die mittels Flugzeit-MS eindeutig darstellbaren Standardproteine α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A und β -Lactoglobulin B sollten an dieser Stelle innerhalb einer einfachen biologischen Matrix, der Molke, nachgewiesen werden. Die Eignung der Methode zur Proteinquantifizierung anhand externer Standardreihen sollte durch den Vergleich der Ergebnisse mit den Herstellerangaben abgeschätzt werden.

5.2.1 Darstellung der Molkeproteine

Der qualitative Nachweis innerhalb der Proben war mit der Flugzeit-MS-Methode für alle drei Proteine deutlich und eindeutig. Abbildung 95 zeigt die Chromatogramme (TIC und BPC) der beiden Proben (100 bzw. 500fach verdünnt) und eines vorgesehenen Standards (6 ng/ μ L).

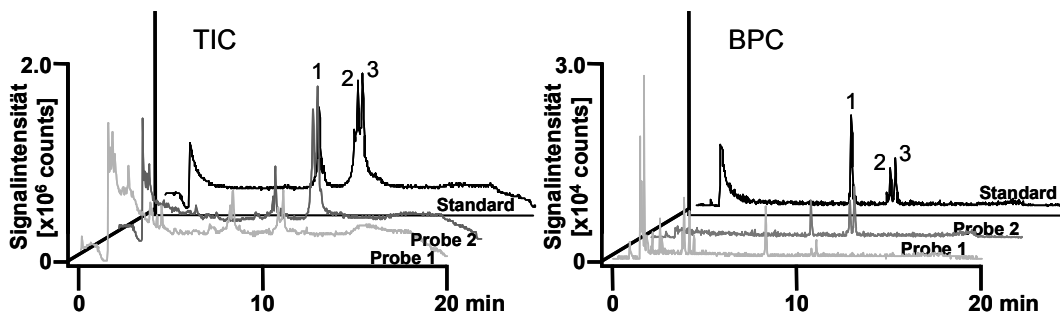


Abbildung 95: TICs (links) und BPCs (rechts) der Molkeproben 1 (F = 100) und 2 (F = 500) sowie eines Standards aus jeweils 6 ng/ μ L α -Lactalbumin (1), β -Lactoglobulin B (2) und β -Lactoglobulin A (3)

Anhand der Spektren und dekonvolvierten Massen wurden die drei Hauptpeaks der Analyten identifiziert. Abbildung 96 zeigt die Summenspektren und Dekonvolutionsspektren vergleichend für jedes der drei Proteine aus den zwei Proben und dem Standard. Anhand der dekonvolvierten Massen der untersuchten

Proben und Standards konnte eine eindeutige Identifizierung der drei Hauptproteine durch den Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Massen der Substanzen erfolgen [16-18]. Für die Proben und die Standardmischungen wichen die dekonvolvierten Massen für α -Lactalbumin (theoretische Masse: 14178.0 Da) um nur 7 bis 28 ppm ab, die Abweichung für β -Lactoglobulin B (theoretische Masse: 12877.2 Da) lag zwischen 54 und 124 ppm und für β -Lactoglobulin A (theoretische Masse: 18363.3 Da) zwischen 49 und 71 ppm.

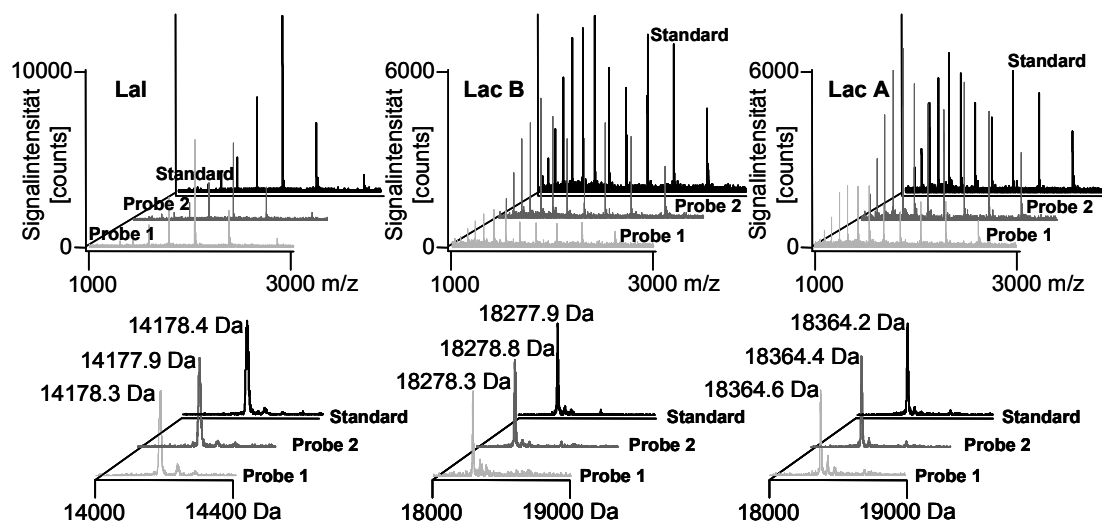


Abbildung 96: Summenspektren und Dekonvolutionsspektren der Peaks von α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin B und A überlagert in den Proben und dem Standard

5.2.2 Quantifizierung der Molkeproteine

Die dekonvolvierten Massen und die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Ionen stimmten für jedes Protein in allen Untersuchungslösungen überein. Daher konnten für die Proben und Standards einheitliche EICs generiert werden. Die anhand des Standards gemessenen Ladungszustände wurden mit einem Massenbereich von ± 0.05 Da für jedes Protein eingegeben. Ein breiterer Bereich von bis zu ± 0.5 Da zeigte unsymmetrische Peaks und bezüglich der Kalibriergeraden keine gute Linearität. Dies resultierte aus der Ähnlichkeit der Massen einiger Ladungszustände der untersuchten Proteine. Daher wurden die Chromatogramme durch Benutzung sehr kleiner Massenbereiche nur aus den Maxima der Massenpeaks der Ionen extrahiert. Tabelle 25 zeigt die eingegebenen Massen zur EIC-Erstellung und in

gleicher Reihenfolge die Ladung des benutzten Ions. In Abbildung 97 sind die EICs der Proben und des bereits unter Abbildung 95 gezeigten Standards sowie die EICs der gesamten Kalibrierstandardreihe vergleichend dargestellt.

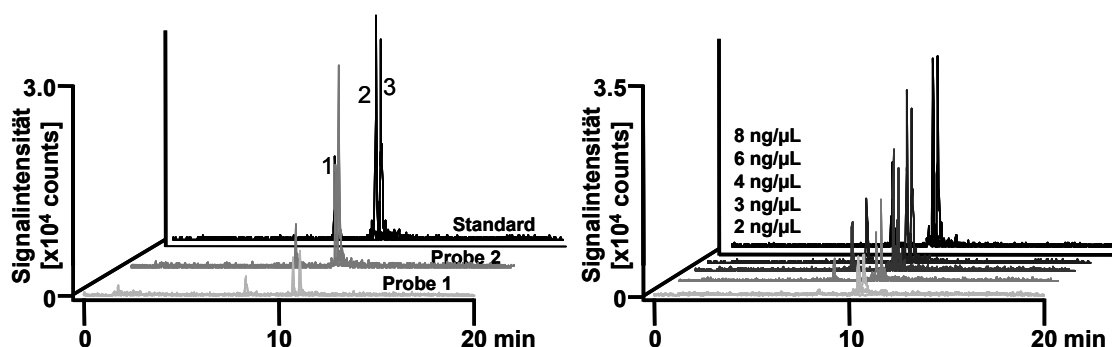


Abbildung 97: EICs im Vergleich: Proben und Standard 6 ng/µL (links), Standardreihe mit Konzentrationen von 2 bis 8 ng/µL je Protein

Tabelle 75: Ionenspuren für die Erstellung der EICs der Molkeproteine

Protein	Ionenspuren in m/z Massenbereiche ± 0.05 m/z	Ladungszustände
α -Lactalbumin	1418.75, 1576.40, 1773.53, 2023.43, 2363.77, 2835.70	10- bis 5-fach positiv
β -Lactoglobulin B	1143.46, 1219.74, 1306.68, 1407.10, 1524.10, 1662.66, 1828.84, 2031.95, 2285.71, 2611.74	16- bis 7-fach positiv
β -Lactoglobulin A	1149.00, 1225.36, 1312.80, 1413.80, 1531.26, 1670.43, 1837.40, 2041.59, 2296.45, 2624.18	16- bis 7-fach positiv

Die Integration der Peaks erfolgte manuell. Tabelle 146 in Anhang 7.6 zeigt die ermittelten Flächen für die dreifache Bestimmung der Kalibrierstandardreihe, sowie die daraus berechneten Parameter der Regressionsgeraden. Die Geraden selbst sind in Abbildung 98 dargestellt. Für die Proben wurden die in Anhang 7.6 Tabelle 147 angegebenen Peakflächen wiederum durch manuelle Integration der Peaks der EICs erhalten.

Neben guten Regressionskoeffizienten R von 0.95 und 0.99 wurden innerhalb der Messwerte gleicher Konzentration nur geringe Schwankungen entdeckt. Aus den Regressionsparametern und den jeweiligen Flächen der Probenmessungen wurde unter Einbeziehung der Verdünnung mittels der Analysenfunktion der Gehalt der einzelnen Proteine in der Probe ermittelt. Der Vertrauensbereich V_b des Ergebnisses

wurde mit dem Studentfaktor $t = 2.16$ ($P = 95 \%$, $f = N-2$, beidseitig) gemäß Formel 9 berechnet ^[19].

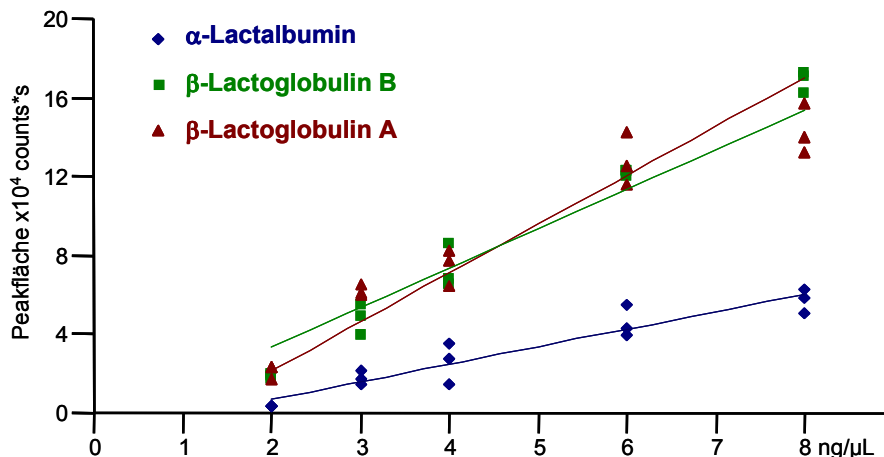


Abbildung 98: Regressionsgeraden der externen Kalibrierung

Formel 9: Berechnung eines Vertrauensbereichs bei Verwendung externer Kalibrierreihen

$$V_b = s_{\hat{x}} \cdot t = \frac{s_y}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\hat{y} - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \cdot t$$

- | | |
|---|---|
| $s_{\hat{x}}$ = Standardabweichung des Erwartungswertes der Probe [ng/μL] | \hat{y} = Probenmesswert [counts*sec] |
| s_y = Standardabweichung des Messwertes [counts*sec] | \bar{y} = Berechneter Messwert bei durchschnittlicher gemessener Konzentration [counts*sec] |
| b = Steigung der Geraden [counts*sec*μL/ng] | |
| N = Anzahl der Kalibrierpunkte | x_i = Einzelstandardkonzentration [ng/μL] |
| n = Anzahl der Probenmessungen | \bar{x} = Durchschnittlich gemessene Konzentration [ng/μL] |

Es wurden mit den in Tabelle 147 angegebenen Flächen der Probensubstanzen die folgenden Gehalte der Proteine in den zwei Molkeproben anhand externer Kalibrierung mit den Regressionsparametern aus Tabelle 146 ermittelt.

Molkeprobe 1:	α-Lactalbumin:	0.40 ± 0.100 g/L
	β-Lactoglobulin B:	0.22 ± 0.034 g/L
	β-Lactoglobulin A:	0.25 ± 0.095 g/L
Molkeprobe 2:	α-Lactalbumin:	0.96 ± 0.500 g/L
	β-Lactoglobulin B:	1.56 ± 0.169 g/L
	β-Lactoglobulin A:	2.11 ± 0.475 g/L

5.3 Ergebnisse der Molkeuntersuchung mittels Ionenfallen-MS

Die mittels Ionenfallen-MS ebenfalls eindeutig darstellbaren Standardproteine α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A und β -Lactoglobulin B sollten an dieser Stelle innerhalb der einfachen biologischen Matrix Molke nachgewiesen werden. Die Eignung der Ionenfallen-MS-Methode zur Quantifizierung von Proteinen anhand externer Standardreihen sollte durch den Vergleich der Ergebnisse mit den Herstellerangaben abgeschätzt werden.

5.3.1 Darstellung der Molkeproteine

Der qualitative Nachweis innerhalb der Proben war mit der Ionenfallen-MS-Methode für alle drei Proteine deutlich. Abbildung 99 zeigt die Chromatogramme (TIC und BPC) der beiden Proben (100 bzw. 500fach verdünnt) und eines vorgesehenen Standards (6 ng/ μ L). Anhand der Spektren und dekonvolutierten Massen wurden die drei Hauptpeaks der Analyten identifiziert. Abbildung 100 zeigt die Summenspektren und Dekonvolutionsspektren vergleichend für jedes der drei Proteine aus den zwei Proben und dem Standard. Anhand der dekonvolutierten Massen der untersuchten Proben und Standards konnte eine eindeutige Identifizierung der drei Hauptproteine durch den Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Massen der Substanzen erfolgen ^[16-18].

Für die Proben und die Standardmischungen wichen die dekonvolutierten Massen für alle drei untersuchten Proteine stark ab, was auf eine Ungenauigkeit in der Kalibrierung zurückgeführt wurde, da die Abweichungen sich deutlich ähnelten. So zeigte α -Lactalbumin (theoretische Masse: 14178.0 Da) eine Abweichung von 5.3 bis 5.8 Da (374 bis 409 ppm), die Abweichung für β -Lactoglobulin B (theoretische Masse: 12877.2 Da) lag zwischen 3.3 und 3.4 Da (256 bis 264 ppm) und für β -Lactoglobulin A (theoretische Masse: 18363.3 Da) zwischen 5.9 und 6.0 Da (321 bis 327 ppm).

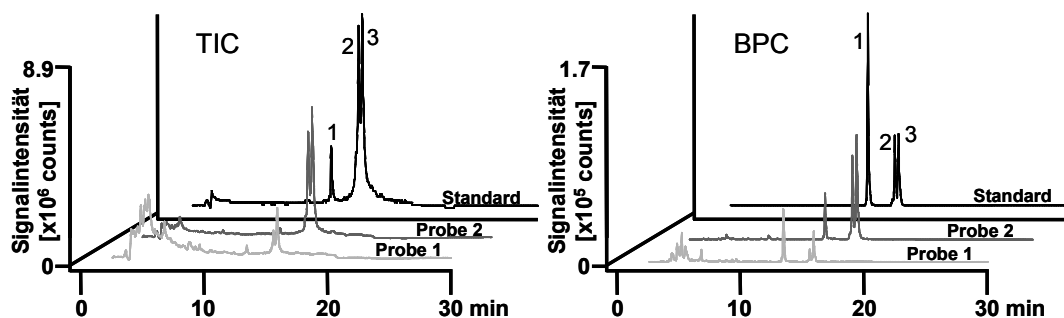


Abbildung 99: TICs und BPCs der Molkeproben 1 (F = 100) und 2 (F = 500) sowie eines Standards aus jeweils 6 ng/µL α -Lactalbumin (1), β -Lactoglobulin B (2) und β -Lactoglobulin A (3)

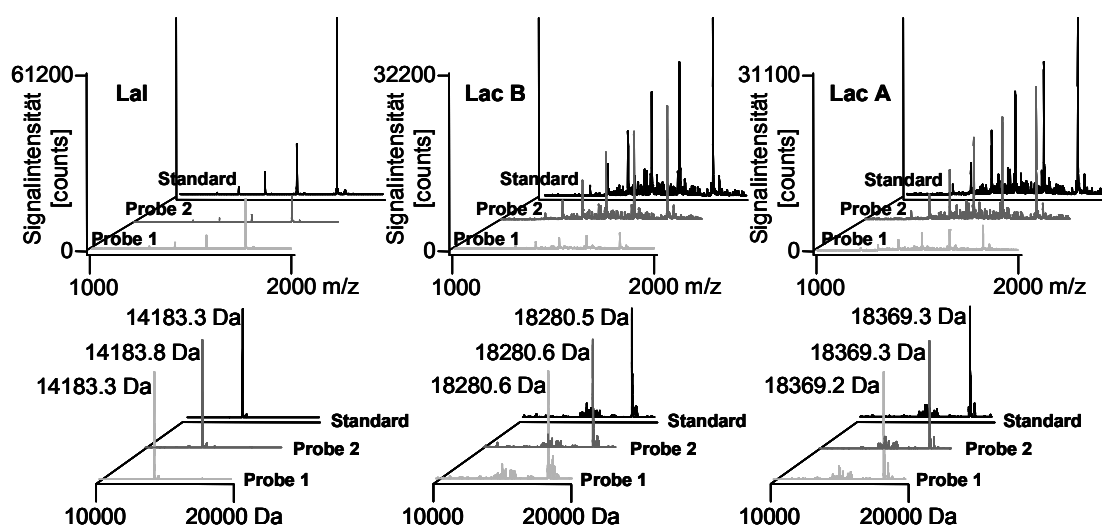


Abbildung 100: Summenspektren (oben) und Dekonvolutionsspektren (unten) der Peaks von α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin B und A überlagert in den Proben und dem Standard

Die dekonvoluierten Massen und die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Ionen stimmten für jedes Protein in allen Untersuchungslösungen überein. Daher konnten für die Proben und Standards einheitliche EICs generiert werden. Die anhand des Standards gemessenen Ladungszustände wurden mit einem Massenbereich von ± 0.1 Da für jedes Protein eingegeben. Tabelle 76 zeigt die eingegebenen Massen zur EIC-Erstellung und in gleicher Reihenfolge die Ladung des benutzten Ions. In Abbildung 101 sind die EICs der Proben und des bereits unter Abbildung 99 gezeigten Standards sowie die EICs der gesamten Kalibrierstandardreihe vergleichend dargestellt.

Tabelle 76: Ionenspuren für die Erstellung der EICs der Molkeproteine

Protein	Ionenspuren in m/z Massenbereiche ± 0.1 m/z	Ladungszustände
α -Lactalbumin	1289.92, 1418.75, 1576.17, 1773.17	11- bis 8-fach positiv
β -Lactoglobulin B	1406.92, 1524.00, 1662.42, 1828.58	13- bis 10-fach positiv
β -Lactoglobulin A	1413.42, 1531.25, 1670.25, 1837.17	13- bis 10-fach positiv

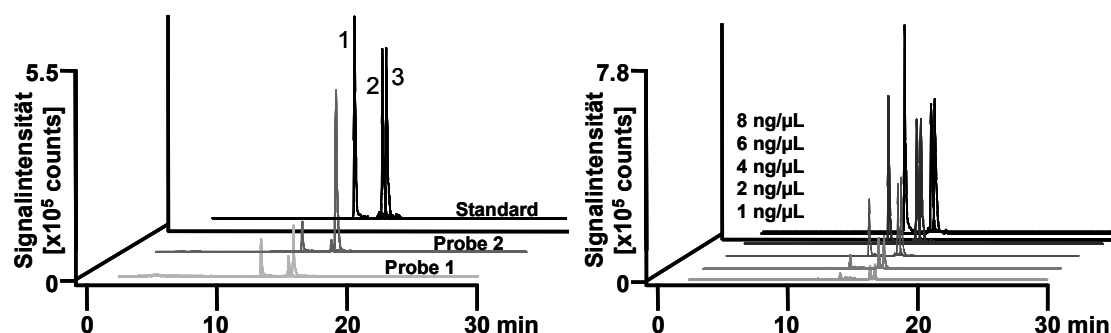


Abbildung 101: EICs im Vergleich: Proben und Standard 6 ng/μL (links), Standardreihe mit Konzentrationen von 1 bis 8 ng/μL je Protein

Die Integration der Peaks erfolgte manuell. Tabelle 148 in Anhang 7.7 zeigt die ermittelten Flächen für die dreifache Bestimmung der Kalibrierstandardreihe, sowie die daraus berechneten Parameter der Regressionsgeraden. Die Geraden selbst sind in Abbildung 102 dargestellt. Für die Proben wurden die in Anhang 7.7 Tabelle 149 angegebenen Peakflächen wiederum durch manuelle Integration der Peaks der EIC's erhalten.

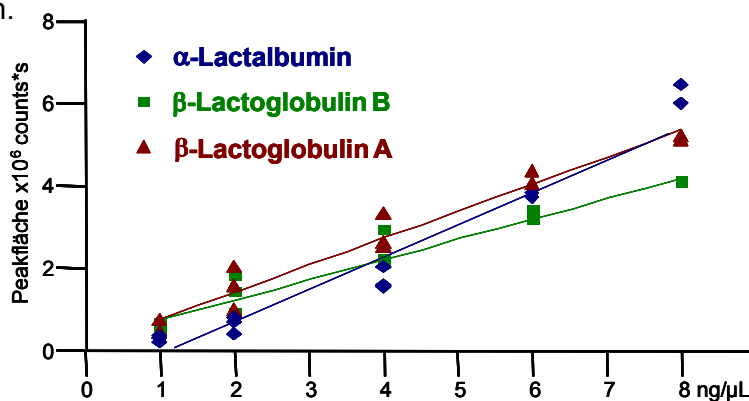


Abbildung 102: Regressionsgeraden der externen Kalibrierung

Neben guten Regressionskoeffizienten R von 0.97 und 0.98 wurden innerhalb der Messwerte gleicher Konzentration nur geringe Schwankungen entdeckt. Für α -Lactalbumin wurde ein leicht verschiedenes lineares Verhalten verglichen zu den β -Lactoglobulinen gemessen. Innerhalb der vermessenen Konzentrationsreihe zeigte sich, dass α -Lactalbumin bereits an der Grenze des linearen Bereiches gemessen wurde. Aus den Regressionsparametern und den jeweiligen Flächen der Probenmessungen wurde unter Einbeziehung der Verdünnung mittels der Analysenfunktion der Gehalt der einzelnen Proteine in der Probe ermittelt. Der Vertrauensbereich V_b des Ergebnisses wurde mit dem Studentfaktor $t = 2.16$ ($P = 95 \%$, $f = N-2$, beidseitig) gemäß Formel 1 berechnet. Es wurden mit den in Tabelle 149 angegebenen Flächen der Probensubstanzen die folgenden Gehalte der Proteine in den zwei Molkeproben anhand externer Kalibrierung mit den Regressionsparametern aus Tabelle 148 ermittelt.

Molkeprobe 1:	α -Lactalbumin:	$0.27 \pm 0.102 \text{ g/L}$
	β -Lactoglobulin B:	$0.06 \pm 0.087 \text{ g/L}$
	β -Lactoglobulin A:	$0.17 \pm 0.070 \text{ g/L}$
Molkeprobe 2:	α -Lactalbumin:	$0.97 \pm 0.509 \text{ g/L}$
	β -Lactoglobulin B:	$2.34 \pm 0.434 \text{ g/L}$
	β -Lactoglobulin A:	$2.97 \pm 0.348 \text{ g/L}$

5.4 Vergleich der Ergebnisse und Diskussion der Methoden

Laut Angabe der Hersteller hatte die erste Probe einen Gesamtproteinanteil von 5 g/L, Molkeprobe 2 hatte 9 g/L Gesamtprotein. Somit bilden die drei untersuchten Proteine laut Ionenfallen-Analyse in Molkeprobe 1 etwa 10 % des Gesamtproteingehaltes (0.5 g/L von 5 g/L) und in Molkeprobe 2 sogar 70 % (6.28 g/L von 9 g/L). Bei den Flugzeit-Analysen ergaben sich Proteinanteile von 17 % in Molkeprobe 1 (0.87 g/L von 5 g/L) und von 51 % in Molkeprobe 2 (4.63 g/L von 9 g/L) gemessen am Gesamtproteingehalt laut Hersteller. Die starken Unterschiede der Gehalte bei der Verwendung der verschiedenen massenspektrometrischen Methoden wiesen auf ein Problem in der Genauigkeit der Messung hin. Welche Methode allerdings die sichereren Ergebnisse für Proteinquantifizierungen lieferte, konnte nicht eindeutig nachvollzogen werden. Die unterschiedlichen prozentualen Anteile der Proteine an den Gesamtproteingehalten der Proben ließ sich mit den zu

Beginn dieses Kapitels angesprochenen biologischen und technologischen Unterschieden unabhängiger Produkte erklären und konnte somit nicht als weiteres Indiz für die Klassifizierung der Methodengenauigkeit dienen. Da mit beiden Methoden etwa gleiche Linearitäten für die externe Kalibrierung erhalten wurden, ließ sich auch anhand der Kalibrierungsparameter keine Aussage treffen. Ein Vergleich der Vertrauensbereiche der berechneten Gehalte zeigte jedoch geringere Abweichungen bei der Verwendung der Flugzeit-MS-Methode. Es wurde eine maximale Abweichungen (prozentualer Vertrauensbereich) von 52 % mit der TOF-MS-Methode gegenüber der IT-MS-Methode mit 145 % (gemessen am berechneten mittleren Gehalt des Proteins in der Probe) erzielt. Tabelle 77 fasst die berechneten Ergebnisse und die Vertrauensbereiche nochmals zusammen.

Neben den Ergebnissen der Quantifizierung konnten die eindeutigeren Ladungsverteilungen bei Benutzung der TOF-MS-Methode verglichen zur IT-MS-Methode hinzugezogen werden. Am Beispiel der β -Lactoglobuline ist deutlich geworden, dass Proteine eine Vielzahl stabiler, detektierbarer Ionen bilden können. Die Erzeugung extrahierter Ionenströme in Form von Chromatogrammen konnte bei breiterer Verteilung mittels TOF-MS (8 bis 10 Ladungszustände) mit geringeren Detektionsverlusten durchgeführt werden, als es im engen m/z -Messbereich der Ionenfallen-Methode (jeweils 4 Ladungszustände) möglich war (vgl. Tabelle 25 und Tabelle 76).

Tabelle 77: Zusammenfassung der Proteinquantifizierungen in den untersuchten Molkeproben; mittlerer Gehalt, Vertrauensbereich und prozentualer Vertrauensbereich bezogen auf den gemessenen Gehalt

Protein	Flugzeit-Methode		Ionenfallen-Methode	
	Mittlerer Gehalt in g/L	Vertrauensbereich in g/L (in % vom Gesamtproteingehalt)	Mittlerer Gehalt in g/L	Vertrauensbereich in g/L (in % vom Gesamtproteingehalt)
Molkeprobe 1				
α -Lactalbumin	0.40	0.100 (25.0)	0.27	0.102 (37.8)
β -Lactoglobulin B	0.22	0.034 (15.5)	0.06	0.087 (145.0)
β -Lactoglobulin A	0.25	0.095 (38.0)	0.17	0.070 (41.2)
Molkeprobe 2				
α -Lactalbumin	0.96	0.500 (52.1)	0.97	0.509 (52.5)
β -Lactoglobulin B	1.56	0.169 (10.8)	2.34	0.434 (18.5)
β -Lactoglobulin A	2.11	0.475 (22.5)	2.97	0.348 (11.7)

6 Darstellung, Charakterisierung und Quantifizierung von Gliadinen

Im ernährungsphysiologischen Sinn wurde die Analytik von Gliadinen bzw. Getreideprodukten allgemein in den letzten Jahren immer wichtiger. Die ständig an Bedeutung zunehmende Zöliakie, eine Unverträglichkeit einzelner Personen bezüglich Gliadin-Peptiden, veranlasste bereits die Lebensmittelhersteller gliadinfreie Nahrung, besonders im Bereich der Säuglings- und Kleinkindernahrung, herzustellen und zu vertreiben [20-22]. Da sich die Krankheit nur anhand ihrer auftretenden Symptome, die aus der verminderten Aufnahme von Nährstoffen resultieren, diagnostizieren lässt, erfolgt die eindeutige Diagnose zumeist sehr spät, da die Symptome auf eine Vielzahl verschiedener Krankheiten hinweisen [23-26]. Weder der genaue Aufbau der toxischen Peptide noch der Proteine, in denen die Peptide vorliegen, sind hinreichend bekannt, um eine spezifische Analytik für die Diagnostik oder auch für die lebensmittelchemische Untersuchung zu entwickeln. Verschiedene Enzym-Immunoassays wurden in den letzten Jahren etabliert, die jedoch nur im lebensmittelchemischen Bereich Anwendung finden und mit hohen Kosten und einigem Zeitaufwand verbunden sind [27,28].

Die chromatographische Trennung der untereinander strukturell sehr ähnlichen Proteine erfordert flache Gradientensteigungen, um die Detektion einzelner Analyte gewährleisten zu können. Die massenspektrometrische Detektion verdauter Gliadinpeptide führte bislang nur zu geringen Sequenzabdeckungen und somit zu nicht eindeutigen Identifizierungen der genauen Sequenzen. Durch die DNA-Entschlüsselung des Weizens sind bereits viele Proteinsequenzen bekannt. Die Bestätigung der Aminosäureabfolge durch die Proteinanalytik fehlt zurzeit jedoch noch.

6.1 Zur Darstellung und Quantifizierung von Gliadinen verwendete Methoden

Nachdem in Kapitel 5 bereits die Möglichkeit qualitativer und quantitativer Proteinanalytik aus einer vergleichsweise einfachen Matrix untersucht worden ist, wurden die bereits vorgestellten Methoden auf eine biologische Probe mit komplexerer Matrix angewendet. Hierzu wurde die Gliadinfraktion eines Weizenextraktes untersucht. Die Proteine wurden zunächst anhand der gemessenen

intakten Massen mit Datenbank-bekannten Weizenproteinen verglichen, charakterisiert und identifiziert, sofern es möglich war. Zwei ausgewählte γ -Gliadine wurden anschließend quantifiziert. Der Extrakt wurde vom Institut für Referenzmaterialien und -messungen der Europäischen Union zur Verfügung gestellt und wie folgt angefertigt:

- Entfettung der gemischten, gemahlene Weizensorten mit n-Hexan nach Soxhlet, Entfernung des Lösungsmittels durch Vakuumdestillation.
- Extraktion von Albuminen und Globulinen durch Aussalzen mit 0.4 M Natriumchloridlösung und Zentrifugation.
- Extraktion der Gliadine durch fraktioniertes Lösen aus dem Rückstand der Zentrifugation mit 60 % wässrigem Ethanol, Vorkonzentrierung durch Ultrafiltration mit einem Ausschluss von 5000 Da, Entsalzung des Filtrats mit 0.01 M wässriger Essigsäure mittels erneuter Ultrafiltration.
- Lyophilisierung des Gliadinextraktes.

6.1.1 Probenvorbereitung

Aufgrund der strukturbedingten hydrophoben Eigenschaften der Gliadine wurde das Lyophilisat in Hinblick auf chromatographische und massenspektrometrische Analysen in 70 % wässrigem Ethanol unter Zusatz von 0.1 % Trifluoressigsäure gelöst, wenn nicht anders angegeben. Weitere Verdünnungen wurden mit 70 % wässrigem Ethanol mit 0.1 % TFA bzw. mit reiner 0.1 % wässriger TFA-Lösung durchgeführt, so dass letztlich injizierte Lösungen einen Ethanolgehalt von 7 % aufwiesen.

6.1.2 Nachweis und Quantifizierung von Gliadinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS

Es wurden die folgenden Parameter zur Trennung und Detektion innerhalb der Untersuchung mittels IP-RP-mikro-HPLC-TOF-MS verwendet.

Tabelle 78: IP-RP-mikro-HPLC-Trennparameter zur Analyse der intakten Proteine

- Trennsäule: PS/DVB, 150x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 1.5 µL/min
- Gradient: linear 25-37.5 % Eluent B in 90 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 1 µL

Tabelle 79: TOF-MS-Parameter zur Darstellung intakter Proteine

Ionisierungsparameter		Detektionsparameter	
Spraygas	0.5 bar	Pulsar Push/Pull	771 / 0 V
Dry Gas	4.0 L/min	Corrector Fill	53 V
Dry Temperature	200 °C	Reflector	1688 V
End plate offset	-400 V	Flight Tube:	8612 V
Capillary	4000 V	Corrector Extract	555 V
Kapillarlänge	3.0 mm	Detector TOF	2140 V
Parameter der Ionenoptik			
Capillary exit	215.9 V	Lens 1 storage	50.0 V
Skimmer 1	79.0 V	extraction	25.7 V
Hexapole 1	46.0 V	Lens 2	-9.5 V
Skimmer 2	12.0 V	Lens 3	30.2 V
Hexapole 2	25.4 V	Lens 4	-17.5V
Hexapole RF	368.3 V	Lens 5	-46.6 V
Pre Puls Storage Time	15.0 µs	Focus	aktiv
		Transfer Time	88.0 µs

6.1.3 Nachweis und Quantifizierung von Gliadinen mittels IP-RP-mikro-HPLC-IT-MS

Es wurden die folgenden Parameter zur Trennung und Detektion innerhalb der Untersuchung mittels IP-RP-mikro-HPLC-IT-MS verwendet.

Tabelle 80: IP-RP-mikro-HPLC-Bedingungen zur Trennung und Untersuchung intakter Proteine bei Kopplung an das IT-MS

- Trennsäule: PS/DVB, 150x0.2 mm
- Trenneluenten: A: 0.05 % TFA in Wasser,
B: 0.05 % TFA in Acetonitril
- Säulenfluss: 1.5 µL/min
- Gradient: linear 25-37.5 % Eluent B in 90 min
- Trenntemperatur: 50°C
- Injektionsvolumen: 1 µL

Tabelle 81: IT-MS-Parameter zur Darstellung intakter Proteine
Ionisierung und Ionenoptik

Sprayspannung	3.0 kV
Sprühgas	15 arb
Hilfsgas	1.5 arb
Kapillartemperatur	250°C
Kapillarspannung	91.0 V
Multipole 00 offset	-1.0 V
Lens 0	-7.5 V
Multipole 0 offset	-11.5 V
Lens 1	-22.0 V
Gate Lens	-32.0 V
Multipole 1 offset	-8.0 V

Kapillarlänge	0.33 mm
Sprayer z-Richtung	B-Ring mittig
Sprayer y-Richtung	0.06 Skt
Sprayer x-Richtung	mittig
Tube Lens	170.5 V
Multipole RF	657 Vp-p
Front Lens	-7.25 V
Front Section offset	-9.0 V
Center Section offset	-12.0 V
Back Section offset	-7.0 V
Back Lens	0.0 V

6.1.4 Gewinnung reiner Gliadine zur Bereitung eines Gliadinstandards

Da für die Quantifizierung keine kommerziell erhältlichen Standardgliadine zur Verfügung standen, wurde eine manuelle Fraktionierung der γ -Gliadine wie in Tabelle 82 angegeben vorgenommen.

Tabelle 82: Trennung und Fraktionierung der γ -Gliadine aus dem Lyophilisat

- Stat. Phase: Vydac Protein C4, 250x4.6 mm Innendurchmesser, 5 μ m Partikelgröße
- Mob. Phase: Eluent A: 20 % Acetonitril in 0.05 % wässriger TFA
Eluent B: 50 % Acetonitril in 0.05 % wässriger TFA
- Gradient: 0-100 % Eluent B in 80 min
- Säulenfluss: 1 ml/min
- Trenntemperatur: 50°C
- Detektion: UV bei 210 nm
- Injektion: 50 μ L
- Konzentration des Lyophilisats: 20 μ g/ μ L in 70 % wässrigem Ethanol
- Fraktionierung: nach Peak, die Fraktionen von 12 Trennläufen wurden vereint
- Verdampfung des Lösungsmittels im Vakuum bei 30°C

6.1.5 Zusammensetzung der Kalibrierreihen und Durchführung der externen Kalibrierung

Die gewonnenen γ -Gliadine wurden jeweils in 50 μ L 70 % wässrigem Ethanol mit Zusatz von 0.1 % TFA gelöst. Es erfolgte anschließend eine weitere Verdünnung in destilliertem Wasser um einen Faktor 10 und die Messung des Proteingehaltes nach Bradford. In Abbildung 103 ist das UV-Chromatogramm bei 210 nm der Trennung des Extraktes zur Fraktionierung gezeigt. Innerhalb der gekennzeichneten Zeiten wurden die Fraktionen entnommen.

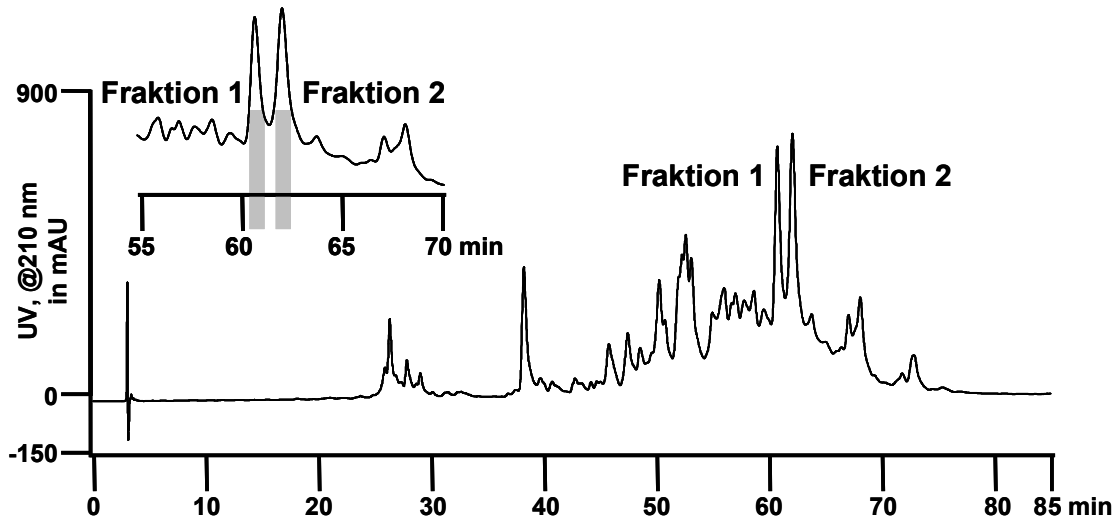


Abbildung 103: UV-Chromatogramm zur Fraktionierung der γ -Gliadine aus dem Gliadinextrakt zur Gewinnung von Standards für die Quantifizierung, Ausschnitt Minute 55 bis 70 mit Fraktionenschnitten

Durch die Integration der bei der Fraktionierung erhaltenen Peaks im UV-Chromatogramm konnte eine Abschätzung des Anteils beider Proteine anhand ihrer prozentualen Fläche gemessen an der Gesamtfläche aller detektierten Peaks getroffen werden. So ergab sich für das γ -Gliadin 1 ein prozentualer Anteil von 9.58 % am untersuchten Gesamtprotein und für das γ -Gliadin 2 ein entsprechender Anteil von 11.98 %. Hochgerechnet auf die injizierte Menge von 1 mg entsprachen die Anteile einer geschätzten Menge von 95.8 μg (γ -Gliadin 1) bzw. 119.8 μg (γ -Gliadin 2). Um die Proteinbestimmung nach Bradford mit nur einem Teil der Fraktionen durchführen zu können, wurde wenigstens 1 mg reines Protein benötigt, so dass die Fraktionen von mindestens 10 Trennungen vereint werden mussten. Da bei der Fraktionierung Verluste vorraussehbar waren, wurde die Menge auf 12 Trennläufe erhöht.

Für die Bradford-Proteinmessung wurde Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0.1 bis 0.75 mg/mL in 7 % wässrigem Ethanol mit 0.01 % TFA gelöst und als externe Standardreihe vermessen. Die gelösten, um den Faktor 10 verdünnten Fraktionen wurden zum Test eingesetzt. 7% wässrige Ethanollösung mit 0.01 % TFA diente als Blindwert. Jeder Messlösung von jeweils 50 μL wurden 1.5 mL Bradford-Reagenz bestehend aus dem Farbstoff Brilliant Blau G-250 (C.I. 42655) in Phosphorsäure und Methanol in Einwegküvetten zugegeben, die Ansätze wurden gemischt und nach 30 min bei Raumtemperatur bei 595 nm photometrisch

vermessen. Nach Abzug des Blindwertes von jedem Messwert wurde die in Abbildung 104 gezeigte BSA-Kalibriergerade erhalten, anhand derer die Proteinkonzentrationen in den gelösten Gliadinfraktionen berechnet wurden. Die gemessenen Absorptionen und die graphisch resultierenden Konzentrationen in den Fraktionen sind gestrichelt dargestellt.

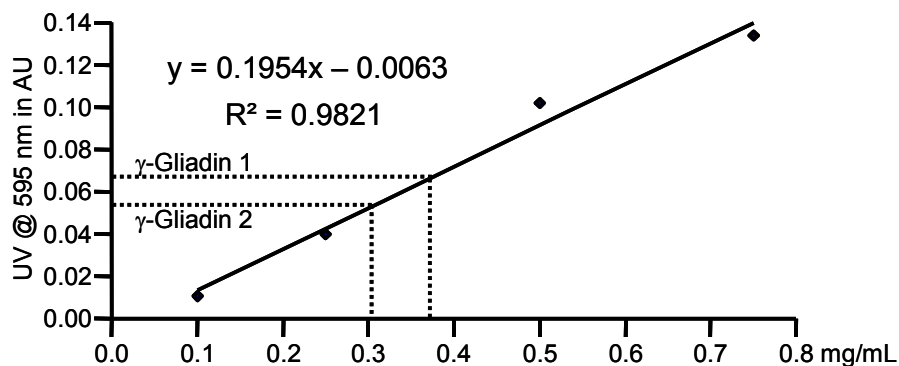


Abbildung 104: Bradford-Proteinmessung zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Gliadinfraktionen

Nach Einbeziehen der Verdünnung ergab sich für die γ -Gliadin 1-Fraktion eine Konzentration von 3.36 mg/mL und für die γ -Gliadin 2-Fraktion eine Konzentration von 3.17 mg/mL. Das Mischen der Fraktionen zu gleichen Teilen und eine Verdünnung mit 0.05 % wässriger TFA um den Faktor 35 führte anschließend zu einer Konzentration um die 100 ng/ μ L je Protein.

Nach Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Stammlösungen mittels Bradford-Proteinbestimmung wurden Standards aus der vereinten Stammlösung zusammengestellt und bis zur gewünschten Konzentration mit 0.05 % wässriger TFA verdünnt. Es wurde darauf geachtet, dass jeder Standard und die zu messende Probelösung in 7 % wässrigem Ethanol mit 0.01 % TFA gelöst waren.

6.2 Ergebnisse der Gliadinuntersuchung mittels Flugzeit-MS

Der Gliadinextrakt als komplexe Matrix verglichen zur einfachen Zusammensetzung einer Molke sollte anhand der detektierbaren intakten Proteine auf seine Zusammensetzung hin charakterisiert werden. Die Eignung der Flugzeit-MS-Methode zur Darstellung intakter Proteine wurde erneut um die Quantifizierung ausgesuchter Proteine anhand externer Standardreihen ergänzt und beurteilt.

6.2.1 Darstellung der Gliadine

Abbildung 105 zeigt je ein mit den in Kapitel 6.1.2 aufgeführten Trenn- und Detektionsmethoden erhaltenes TIC und BPC von 100 ng des Gliadinextraktes (Konzentration 100 ng/ μ L, Injektionsvolumen 1 μ L). Auf die Abbildung der Retentionszeiten vor Minute 10 wurde wegen der Elution verschiedener nicht identifizierter kleiner Substanzen zugunsten der besseren graphischen Darstellung verzichtet.

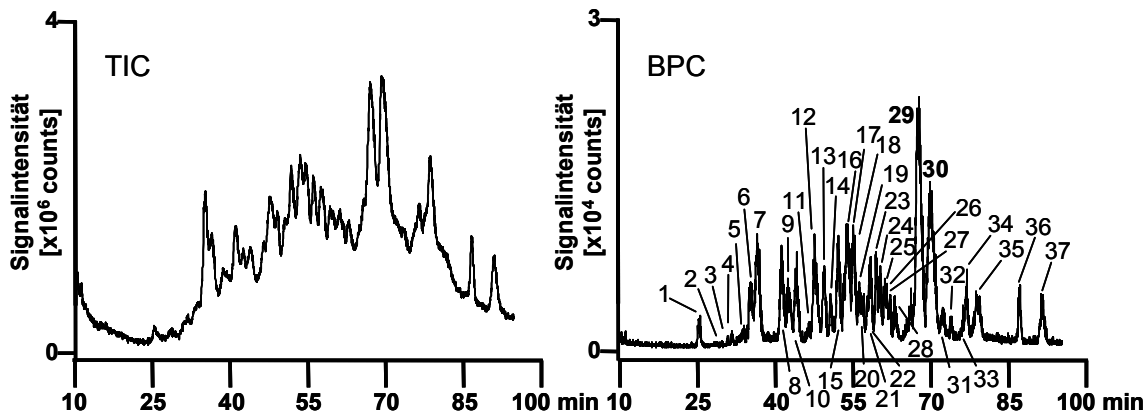


Abbildung 105: TIC und BPC von 100 ng Gliadinextrakt nach monolithischer IP-RP-mikro-HPLC-Trennung, 25-37.5 % Acetonitril in 0.05 % wässriger TFA in 90 min, 1 bis 37: Peaks, bestehend aus unterschiedlichen Proteinmassen; 29, 30: γ -Gliadine 1 und 2

Es wurden unter den Peaks verschiedene Proteine anhand der Spektrenzusammensetzung detektiert. Nach Dekonvolution wurden die erhaltenen intakten Massen mit den in Swiss/Prot veröffentlichten Sequenzmassen für Weizenproteine verglichen. In Abbildung 106 und Abbildung 120 im Anhang 7.8 sind die Summenspektren und Dekonvolutionsspektren der detektierten und im BPC (Abbildung 105) annotierten Proteine mit Ausnahme der γ -Gliadine (Peak 29 und 30) gezeigt, die unter Angabe der Ladungswertigkeit in Abbildung 106 gezeigt sind.

In allen gezeigten Spektren dieser Analyse waren eindeutige Ladungsverteilungen erkennbar anhand derer die intakten Massen mittels Dekonvolution ermittelt werden konnten. Zur Identifizierung durch den Vergleich der Proteinmassen mit Datenbank-Sequenzmassen wurden nur die intensivsten intakten Massen herangezogen.

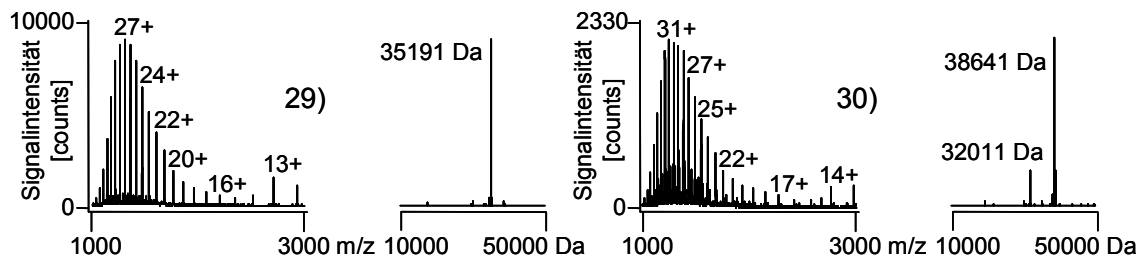


Abbildung 106: Summen- und Dekonvolutionsspektren der Peaks 29 und 30

Tabelle 83 fasst die Übertragung von gemessener und veröffentlichter Masse zusammen, sofern eine Identifizierung möglich war. Insgesamt wurden 37 Proteine detektiert, 12 davon konnten durch den Massenvergleich auch identifiziert werden. Zwei der identifizierten Proteine waren hochkonzentrierte Proteine der γ -Gliadine, die als Peaks 29 und 30 detektiert wurden. Unterschieden werden sie im Folgenden durch die Indices 1 und 2, wobei das als Peak 29 eluierende Protein als γ -Gliadin 1 und das als Peak 30 detektierte Protein als γ -Gliadin 2 bezeichnet wird. Für diese beiden Proteine erfolgte die Quantifizierung anhand externer Standardkalibrierung. Auf die Identifizierung der restlichen Proteine durch Peakfraktionierung, enzymatischen Verdau und Tandem-massenspektrometrische Analyse der entstandenen Peptide wurde an dieser Stelle verzichtet.

Tabelle 83: In dem untersuchten Gliadinextrakt detektierte intakte Proteinmassen, Identifikation der Proteine anhand der intakten Masse (n.i.: nicht identifiziert) und dazugehöriger Datenbank-Code

Peaknummer	Gemessene dekonvolutierte Masse in Da	Theoretische Masse in Da	Protein	SwissProt-Eintrag (ID-Code)
1	12933		n.i.	
2	22352		n.i.	
3	39079	39044	LMW Glutenin Untereinheit	Q18NR2
4	15522		n.i.	
5	42745		n.i.	
6	41863		n.i.	
7	30751	30748	γ-Gliadin	Q9FEG9

Tabelle 83 (Fortsetzung)

<i>Peaknummer</i>	Gemessene dekonvolutierte Masse in Da	Theoretische Masse in Da	Protein	SwissProt-Eintrag (ID-Code)
8	30170		n.i.	
9	31435	31416	LMW Glutenin Untereinheit	Q5MGR3
10	34644		n.i.	
11	38844	38857	LMW Glutenin	Q0GNG1
12	33970	33978.5 oder 33969	LMW Glutenin Untereinheit bzw α/β-Gliadin	Q0GQX1 bzw. Q41632
13	30804	30803	B1 Hordein	Q40021
14	32048		n.i.	
15	31585		n.i.	
16	31034		n.i.	
17	31537		n.i.	
18	33279	33284	α/β-Gliadin	P18573
19	31114		n.i.	
20	30501		n.i.	
21	31478		n.i.	
22	30486		n.i.	
23	30901		n.i.	
24	30996	30982	γ-Gliadin B	P06659
25	32069		n.i.	
26	30884		n.i.	
27	29990		n.i.	
28	32048		n.i.	
29	35191	35198	γ-Gliadin (γ-Gliadin 1)	Q9M6P7
30	38641	38634	γ-Gliadin (γ-Gliadin 2)	Q94G96
31	30975		n.i.	
32	32151		n.i.	
33	29410		n.i.	
34	36657	36666	α-Gliadin	Q308Q7

Tabelle 83 (Fortsetzung)

Peaknummer	Gemessene dekonvolutierte Masse in Da	Theoretische Masse in Da	Protein	SwissProt-Eintrag (ID-Code)
35	30610		n.i.	
36	31045		n.i.	
37	31796	31791	LMW Glutenin Untereinheit	Q1ZZT4

6.2.2 Quantifizierung der γ -Gliadine

Zur Quantifizierung der γ -Gliadine wurden die aus den zugehörigen Spektren ermittelten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der gemessenen Ionen für die Erstellung von EICs benutzt, die für die gemessene Probe in Abbildung 107 dargestellt sind. Eine Zusammenfassung der Massen bzw. EIC-Zusammensetzung liefert Tabelle 84.

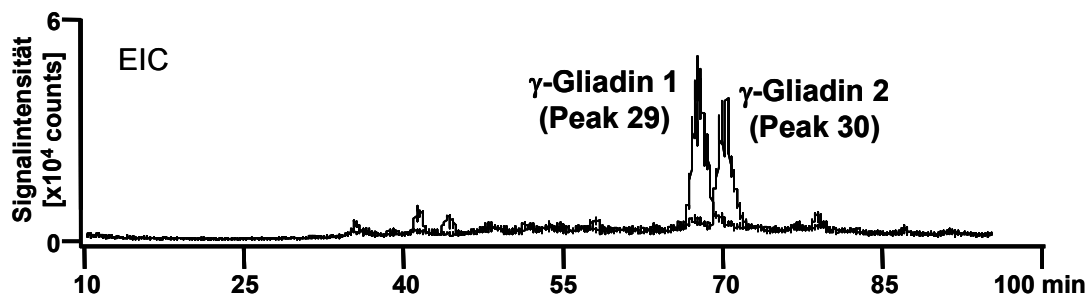


Abbildung 107: EICs der γ -Gliadine 1 und 2 (Peak 29 und 30 aus dem BPC in Abbildung 105)

Durch die Integration der EICs der Standardchromatogramme und Bezug der Peakflächen auf die Konzentration des jeweiligen Standards wurden die in Tabelle 152 in Anhang 7.8 aufgelisteten Flächen (je Messung der dreifachen Injektion eines Standards) und die daraus resultierenden Regressionsparameter erhalten. Die Geraden sind in Abbildung 108 nochmals inklusive der berechneten Regressionsgleichung und dem erhaltenen Bestimmtheitsmaß aufgeführt.

Tabelle 84: Zusammensetzung und Ladungszustände der γ -Gliadinspektren und -EICs

Protein	Ionenspuren in m/z Massenbereiche ± 0.1 m/z	Ladungszustände
γ -Gliadin 1	1174.1, 1214.6, 1258.0, 1304.5, 1354.7, 1408.8, 1467.4, 1531.2, 1600.8, 1676.9, 1760.6, 1853.5, 1955.9, 2071.0, 2200.4, 2346.7	28- bis 18-fach positiv
γ -Gliadin 2	1172.1, 1208.9, 1247.7, 1289.2, 1333.5, 1381.1, 1432.2, 1487.4, 1546.7, 1611.2, 1681.4, 1757.5, 1841.2, 1933.1, 2034.7, 2147.6, 2273.8, 2415.8	26- bis 20-fach positiv

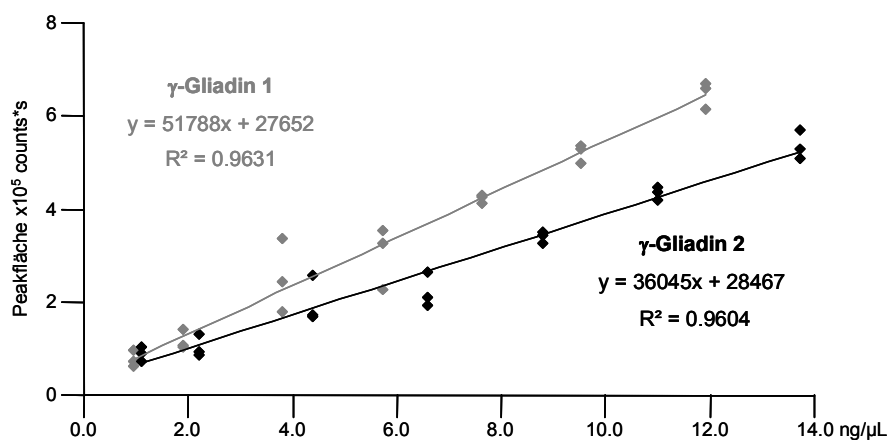


Abbildung 108: Regressionsgeraden der γ -Gliadinproteine für die externe Kalibrierung

Für die analysierte Extraktprobe mit einem Gehalt von 100 ng Extrakt/ μ L Lösungsmittel wurden die in Anhang 7.8 in Tabelle 153 gezeigten Peakflächen durch Integration der EICs beider γ -Gliadine ermittelt. Mit Hilfe der Parameter der Regressionen wurden die Gehalte beider Gliadine in den untersuchten 100 ng bzw. je g Extrakt berechnet. Auch der Vertrauensbereich wurde gemäß Formel 1 für beide Proteingehalte berechnet, wobei der Studentfaktor $t = 2.09$ für 21 Kalibrierungswerte ($f = 19$) beidseitig mit $P = 95\%$ benutzt wurde.

Daraus ergaben sich für das γ -Gliadin 1 ein Anteil von **22.2 ± 10.20 mg/g** und für das γ -Gliadin 2 ein Gehalt von **28.4 ± 13.87 mg/g** Gliadinextrakt.

6.3 Ergebnisse der Gliadinuntersuchung mittels Ionenfallen-MS

Die Eignung der Ionenfallen-MS-Methode wurde an dieser Stelle ebenfalls bezüglich der Darstellung und Charakterisierung sowie der Quantifizierung von Proteinen im Massenbereich von 30 bis 40 kDa untersucht.

6.3.1 Darstellung der Gliadine

Abbildung 109 zeigt je ein mit den in Kapitel 0 aufgeführten Trenn- und Detektionsmethoden erhaltenes TIC und BPC von 100 ng des Gliadinextraktes (Konzentration 100 ng/ μ L, Injektionsvolumen 1 μ L). Auf die Abbildung der Retentionszeiten vor Minute 10 wurde wegen der Elution verschiedener nicht identifizierter kleiner Substanzen zugunsten der besseren graphischen Darstellung verzichtet. Nach Minute 70 wurden keine weiteren Proteine detektiert, weshalb auch dieser Bereich nicht abgebildet wurde.

Es wurden unter den Peaks verschiedene Proteine anhand der Spektrenzusammensetzung detektiert. Nach Dekonvolution wurden die erhaltenen intakten Massen mit den in Swiss/Prot veröffentlichten Sequenzmassen für Weizenproteine verglichen. In Abbildung 121 im Anhang 7.9 sind die Summenspektren und Dekonvolutionsspektren der detektierten und im BPC (Abbildung 109) annotierten Proteine mit Ausnahme der γ -Gliadine (Peak 14 und 15) gezeigt, die unter Angabe der Ladungswertigkeit in Abbildung 110 gezeigt sind.

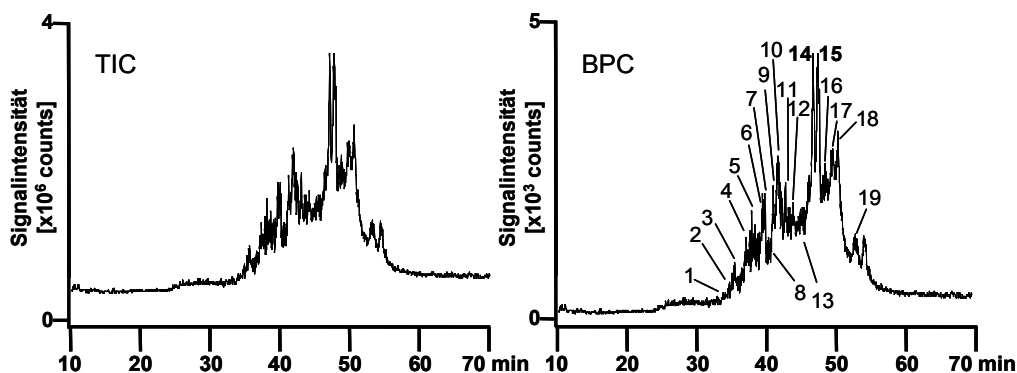


Abbildung 109: TIC und BPC von 100 ng Gliadinextrakt nach monolithischer IP-RP-mikro-HPLC-Trennung, 25-37.5 % Acetonitril in 0.05 % wässriger TFA in 90 min, 1 bis 19: Peaks, bestehend aus unterschiedlichen Proteinmassen; 14, 15: γ -Gliadine 1 und 2

In allen gezeigten Spektren dieser Analyse waren eindeutige Ladungsverteilungen erkennbar, anhand derer die intakten Massen mittels Dekonvolution ermittelt werden konnten. Zur Identifizierung durch den Vergleich der Proteinmassen mit Datenbank-Sequenzmassen wurden nur die intensivsten intakten Massen herangezogen.

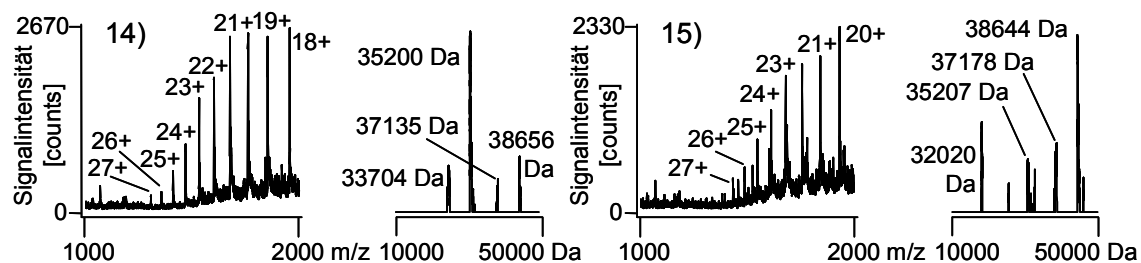


Abbildung 110: Summen- und Dekonvolutionsspektren der Peaks 14 und 15 (γ -Gliadine) des untersuchten Gliadinextraktes

Tabelle 85 fasst die Übertragung von gemessener und veröffentlichter Masse zusammen, sofern eine Identifizierung möglich war. Insgesamt wurden 19 Proteine detektiert, 7 davon konnten durch den Massenvergleich auch identifiziert werden. Zwei der identifizierten Proteine waren hochkonzentrierte Proteine der γ -Gliadine, die als Peaks 14 und 15 detektiert wurden. Unterschieden werden sie im Folgenden durch die Indices 1 und 2, wobei das als Peak 14 eluierende Protein als γ -Gliadin 1 und das als Peak 15 detektierte Protein als γ -Gliadin 2 bezeichnet wird. Für diese beiden Proteine erfolgte die Quantifizierung anhand externer Standardkalibrierung. Auf die Identifizierung der restlichen Proteine durch Peakfraktionierung, enzymatischen Verdau und Tandem-massenspektrometrische Analyse der entstandenen Peptide wurde an dieser Stelle verzichtet.

Tabelle 85: In dem untersuchten Gliadinextrakt detektierte intakte Proteinmassen, Identifikation der Proteine anhand der intakten Masse (n.i.: nicht identifiziert) und dazugehöriger Datenbank-Code

<i>Peaknummer</i>	Gemessene dekonvolutierte Masse in Da	Theoretische Masse in Da	Protein	SwissProt-Eintrag (ID-Code)
1	12936		n.i.	
2	30761	30748	γ-Gliadin	Q9FEG9
3	30176		n.i.	
4	34651		n.i.	
5	33979	33979 oder 33969	LMW Glutenin Untereinheit bzw. α/β-Gliadin	Q0GQX1 bzw. Q41632
6	30816	30803	B1 Hordein	Q40021
7	32061		n.i.	
8	31587		n.i.	
9	33287	33284	α/β-Gliadin	P18573
10	30496		n.i.	
11	30905		n.i.	
12	32076		n.i.	
13	35212		n.i.	
14	35200	35198	γ-Gliadin (γ -Gliadin 1)	Q9M6P7
15	38649	38634	γ-Gliadin (γ -Gliadin 2)	Q94G96
16	30977	30982	γ-Gliadin B	P06659
17	30657		n.i.	
18	31058		n.i.	
19	31808		n.i.	

6.3.2 Quantifizierung der γ -Gliadine

Zur Quantifizierung der γ -Gliadine wurden die aus den zugehörigen Spektren ermittelten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der gemessenen Ionen für die Erstellung von EICs benutzt, die für die gemessene Probe in Abbildung 111 dargestellt sind. Eine Zusammenfassung der Massen bzw. EIC-Zusammensetzung liefert Tabelle 86.

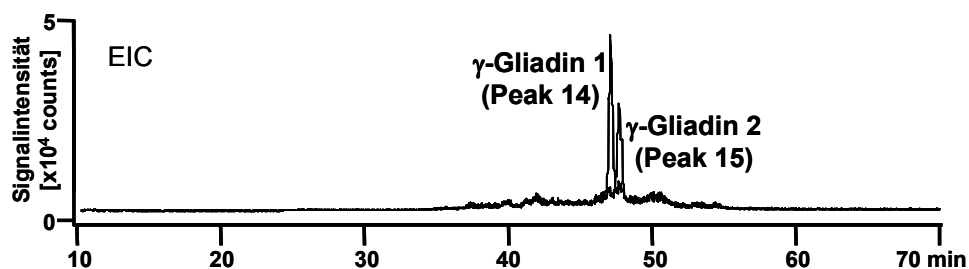


Abbildung 111: EIC's der γ -Gliadine 1 und 2 (Peak 14 und 15 aus dem BPC in Abbildung 109)

Tabelle 86: Zusammensetzung und Ladungszustände der γ -Gliadinspektren und -EICs

Protein	Ionenspuren in m/z Massenbereiche ± 0.1 m/z	Ladungszustände
γ -Gliadin 1	1304.20, 1354.30, 1408.30, 1467.10, 1530.80, 1531.00, 1600.30, 1676.40, 1760.30, 1852.80, 1955.80	28- bis 18-fach positiv
γ -Gliadin 2	1486.80, 1546.30, 1610.80, 1680.80, 1757.20, 1840.80, 1932.80	26- bis 20-fach positiv

Durch die Integration der EICs der Standardchromatogramme und Bezug der Peakflächen auf die Konzentration des jeweiligen Standards wurden die in Tabelle 152 in Anhang 7.9 aufgelisteten Flächen (je Messung der dreifachen Injektion eines Standards) und die daraus resultierenden Regressionsparameter erhalten. Die Geraden sind in Abbildung 112 nochmals inklusive der berechneten Regressionsgleichung und dem erhaltenen Bestimmtheitsmaß aufgeführt.

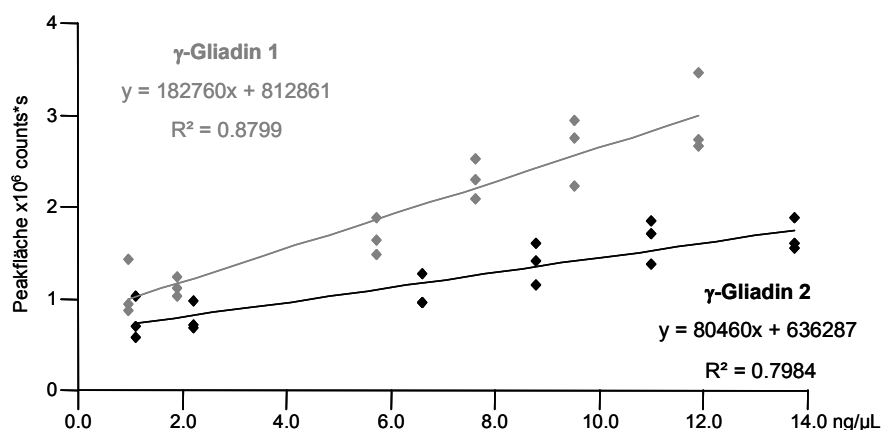


Abbildung 112: Regressionsgeraden der γ -Gliadinproteine für die externe Kalibrierung

Für die analysierte Extraktprobe mit einem Gehalt von 100 ng Extrakt/ μ L Lösungsmittel wurden die in Anhang 7.9 in Tabelle 153 gezeigten Peakflächen durch Integration der EICs beider γ -Gliadine ermittelt. Mit Hilfe der Parameter der Regressionen wurden die Gehalte beider Gliadine in den untersuchten 100 ng bzw. je g Extrakt berechnet. Auch der Vertrauensbereich wurde für beide Proteingehalte gemäß Formel 1 berechnet, wobei der Studentfaktor $t = 2.12$ für 18 Kalibrierungswerte ($f = 16$) beidseitig mit $P = 95\%$ benutzt wurde.

Daraus ergaben sich für das γ -Gliadin 1 ein Anteil von **50.5 ± 20.37 mg/g** und für das γ -Gliadin 2 ein Gehalt von **57.7 ± 35.09 mg/g** Gliadinextrakt.

6.4 Vergleich der Ergebnisse und Diskussion der Methoden

Im vorliegenden Gliadinextrakt konnten mit beiden benutzten Methoden verschiedene intakte Proteinmassen dargestellt und theoretischen Massen von Weizenproteinen zugeordnet werden. Mittels der Flugzeit-MS-Methode wurden 37 verschiedene Peaks unterschiedlicher Proteine bzw. Massen detektiert, mit der Ionenfallen-MS-Methode waren es 19 verschiedene dargestellte Proteine. Eine Zuordnung zu theoretischen Proteinmassen konnte mit der TOF-MS-Methode für 19 und mittels Ionenfallen-MS für 7 der detektierten Massen durchgeführt werden. Die γ -Gliadine (1 und 2) konnten mit beiden Detektionsmethoden eindeutig dargestellt werden, auch die Erstellung extrahierter Ionenchromatogramme war erfolgreich, wodurch die Quantifizierung mit beiden Methoden durchführbar war. Allerdings war anhand der mittels Ionenfallen-MS erhaltenen Spektren erneut eine Limitierung der abgebildeten Ladungszustände aufgrund des gewählten Massenbereichs erkennbar. Während mittels TOF-MS glockenförmige Verteilungen erhalten wurden, innerhalb derer eindeutig ein Ladungszustand als Hauption abgebildet wurde, war ein solches Maximum in den Spektren aus der Ionenfallen-MS-Methode nicht immer eindeutig erkennbar. Die gebildeten EICs mit der Ionenfallen-MS-Methode basierten somit nicht auf dem maximalen Anteil der generierten Ionen, aber auf dem maximalen Anteil der abgebildeten Ionen.

Die Abweichungen der gemessenen Massen am Beispiel der γ -Gliadine betragen für das γ -Gliadin 1 +7 Da mit der TOF-MS-Methode und -2 Da mit der Ionenfallen-MS-Methode, für das γ -Gliadin 2 wurden entsprechend Abweichungen von -7 Da und

-15 Da erhalten. Im Allgemeinen waren die Beträge der Abweichungen der Dekonvolutierten Massen bei den Ionenfallen-MS-Messungen höher als in den TOF-MS-Messungen. Außerdem zeigten die mit Ionenfallen-MS gemessenen Massen hauptsächlich niedrigere Werte verglichen mit den theoretischen Massen der Proteine. Mit der TOF-MS-Methode wurden sowohl höhere als auch niedrigere Massen gemessen im Vergleich zu den theoretischen Massen. Dies ließ erneut auf eine nicht optimale Massenkalisierung des Ionenfallen-Massenspektrometers für Proteine schließen. Im Fall der Analytik von Proteinen werden für jegliche Beschreibung der Analyten anhand ihrer Masse die durchschnittlichen Massen (*average masses*) herangezogen. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der Darstellung der Proteine innerhalb von Spektren, die aufgrund der hohen Ladungszustände keine isotopen aufgelösten Verteilungen zeigen können und somit durch Dekonvolution auch die monoisotopische Masse nicht korrekt berechnet werden kann. Die Massenkalisierung mit Proteinen auf die durchschnittlichen Massen der Ladungszustände gleicht die fehlende Isotopenauflösung teilweise aus, was am Beispiel der Masengenauigkeit des verwendeten TOF-Massenspektrometers belegt wurde. Diese spezielle Kalibrierung ist an dem verwendeten Ionenfallen-Massenspektrometer nicht möglich, es blieb hier nur die Durchführung der Kalibrierung mit kleinen, isotopen aufgelösten Molekülen. Da über Modifikationen in oder an Gliadinsequenzen nur wenig Informationen zur Verfügung standen, konnte davon ausgegangen werden, dass sich auch die hohen Abweichungen von 7 Da (entsprechen >300 ppm) mit weiteren Kenntnissen über die exakte Sequenz und modifizierte Aminosäurereste noch relativiert hätten.

Bei den Quantifizierungen der γ -Gliadine wurden mit der TOF-MS-Methode Regressionskoeffizienten von 0.96 erhalten. Mit der Ionenfallen-MS-Methode fielen die Regressionskoeffizienten für beide Analyte weitaus geringer aus (0.88 für γ -Gliadin 1, 0.80 für γ -Gliadin 2), was auf eine schlechtere Linearität hindeutete. Auch innerhalb der Wiederholinjektionen des gleichen Standards einer Konzentration wurden für beide Analyten mit der Ionenfallen-MS-Methode größere Schwankungen beobachtet als mit der TOF-MS-Methode, was erneut auf den nicht-optimalen Massenbereich zurückzuführen ist, da nicht die gesamte mögliche Ionenverteilung in die Erstellung der EICs eingeflossen ist, wodurch Schwankungen in den relativen Intensitäten der einzelnen Ionen nicht ausgeglichen werden konnten.

Wie bereits in Kapitel 5 für die untersuchten Molken, wurden auch für die γ -Gliadine keine eindeutigen Quantifizierungsergebnisse erhalten. Während mit der TOF-MS-Methode eine Konzentration von 22.2 mg γ -Gliadin 1 und 28.4 mg γ -Gliadin 2 je g Extrakt erhalten wurden, beliefen sich mit der Ionenfallen-MS-Methode die Konzentrationen auf 50.5 mg/g bzw 57.7 mg/g. Somit variierten die erhaltenen Konzentrationen methodenabhängig um den Faktor 2, wodurch ein direkter Methodenvergleich nur anhand der Ergebnisse nicht möglich war. Auch bei dieser Untersuchung war es schwierig, eine Einschätzung über die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse und somit der Methodik zu treffen. Die berechneten Vertrauensbereiche je Analyt wichen ebenfalls etwa um Faktor 2 methodenabhängig voneinander ab. Durch Addition der beiden Konzentrationen je Methode konnte der Anteil (γ -Gliadin 1 + 2) am Gesamtprotein innerhalb des Extraktes berechnet werden, der für die TOF-MS-Methode 5.1 % (2.22 % + 2.84 %) und für die IT-MS-Methode 10.8 % (5.05 % + 5.77 %) betrug.

Wie bereits zur Bestimmung der Anzahl an Trennläufen zur Fraktionierung beschrieben, ergab die mittlere Abschätzung der Anteile von γ -Gliadin 1 und 2 aus den UV-Chromatogrammen zur Fraktionierung Vergleichswerte für die Ergebnisse der Quantifizierungen. So wurde der Anteil des γ -Gliadin 1 anhand aller 12 Fraktionierungsläufe auf 8.6 ± 0.71 % (arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung) und der Anteil des γ -Gliadin 2 auf 11.3 ± 0.78 % am Gesamtprotein des Extraktes geschätzt bzw. berechnet. Diese prozentualen Anteile liegen summiert wiederum über den mittels MS bestimmten Mengen, wobei die Ergebnisse aus der TOF-MS-Untersuchung etwa um den Faktor 4, die Ergebnisse der IT-MS-Analyse nur um etwa Faktor 2 abweichen. Auch mit dieser Schätzungsmethode konnten somit keine eindeutigen Aussagen über die MS-Methodengenauigkeit bei der Quantifizierung gemacht werden.

Die Verwendung von internen Standards oder der Standardadditionsmethode hätte theoretisch zu genaueren Ergebnissen führen können. Da ein nutzbarer interner Standard, z.B. ein isotoopenreines oder isotoopenmarkiertes Gliadin, nicht zur Verfügung stand wurde von dieser Methode abgesehen. Die Standardadditionsmethode wurde getestet, führte jedoch nicht zu den gewünschten linearen Zusammenhängen, weshalb auf die Darstellung der Methode in dieser Arbeit verzichtet wurde. Worin die schlechte Darstellbarkeit aufgestockter Gliadinlösungen begründet war, ist nicht bekannt und wurde nicht weiter untersucht.

7 Anhang

7.1 Tabellen zu Kapitel 2

Tabelle 87: Detektierte Massen in Fraktion #1 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
2.470	13751.5772
2.681	13684.4237
4.547	8450.6432
5.856	12361.8293
5.067	5807.1993
5.600	13604.4330
5.600	13558.7743
5.600	13528.2613
6.743	14307.0472
6.897	11368.7436
8.862	66557.3387
8.862	65199.8278

Tabelle 88: Detektierte Massen in Fraktion #2 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
2.273	5580.5000
2.652	5059.0178
5.044	5808.0590
5.577	13525.0958
6.700	14306.3273
8.931	66558.8433

Tabelle 89: Detektierte Massen in Fraktion #3 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
2.513	13697.3523
5.138	5807.4994
6.302	25394.1518
6.780	14304.8891
8.947	66557.2222

Tabelle 90: Detektierte Massen in Fraktion #4 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
2.442	13700.0511
5.123	5808.2113
6.765	14303.0884
8.252	77601.9642
8.379	77587.2601
8.884	66583.0378

Tabelle 91: Detektierte Massen in Fraktion #5 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
2.469	13698.5440
6.104	25430.2760
6.104	9756.8787
6.342	9298.7953
6.342	5363.7474
6.623	14304.4594
8.012	79626.5917

Tabelle 92: Detektierte Massen in Fraktion #6 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
5.108	8269.5650
5.108	5168.6845
6.048	13168.6070
6.048	11875.1741
6.048	23771.4341
6.048	67326.0585
6.315	5365.1327
6.315	24124.6681
6.680	14304.7448
8.729	66592.8554
8.729	44800.5263
9.051	66461.6903

Tabelle 93: Detektierte Massen in Fraktion #7 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
5.834	66526.0023
8.867	66813.0104
8.867	81067.3805

Tabelle 94: Detektierte Massen in Fraktion #8 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
2.189	5223.0878
2.989	6414.7717
5.094	8269.5438
5.094	5168.7313
5.698	9532.5757
5.908	9516.3672
6.091	8199.3874
6.091	13318.1080
6.091	20495.5540
6.413	9580.5280
6.596	14304.2784
6.750	13105.9461
6.750	30396.0605
6.750	15689.4558
6.933	7618.7037
6.933	16204.2293
6.933	29526.3362
6.933	45798.2955
7.620	38758.539
7.873	60768.0502
7.873	25102.4926
8.117	66733.6806
8.609	66719.2367
9.212	66975.8230
10.545	57880.5643
10.545	25240.5577
10.545	75721.9497
12.215	51222.2446
12.215	13097.2247
12.454	51197.8574
12.454	8727.2618
12.454	13091.6759
12.454	21818.8129
12.454	55860.4935
12.454	69843.6047
12.454	76833.7464
12.636	51174.6593

Tabelle 95: Detektierte Massen in Fraktionen #9 und #10 der Chromatofokussierung von menschlichem Serum

Fraktion	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmassen in Da
#9	8.901	66567.2196
#10	8.882	66562.6015

7.2 Abbildungen zu Kapitel 3.1.2

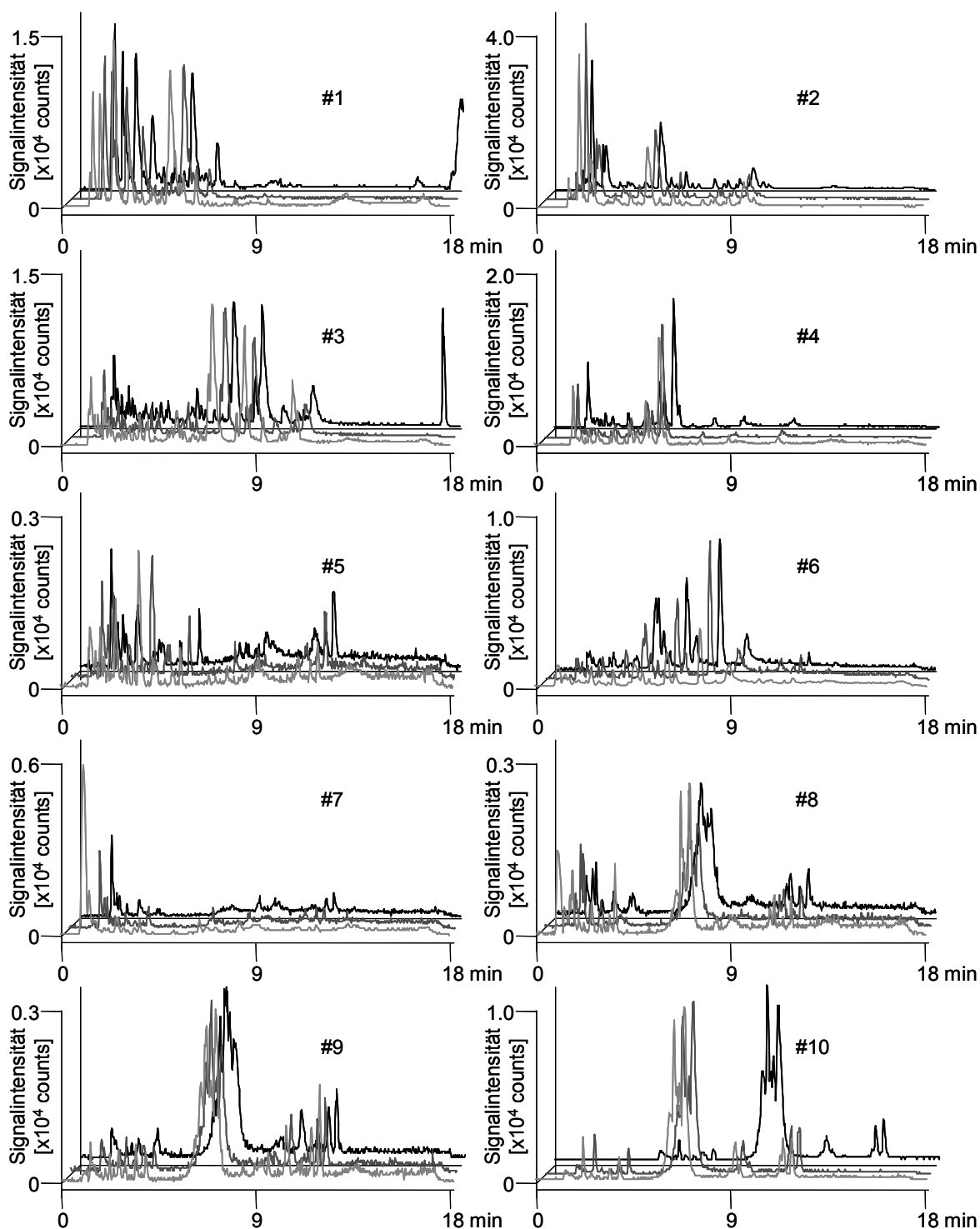


Abbildung 113: BPCs der Parallelinjektionen der CF-Fraktionen #1 bis #10; durch einen fehlerhaften Start der Aufnahme bei der Analyse von Fraktion #10 trat in diesem Fall eine Verschiebung auf.

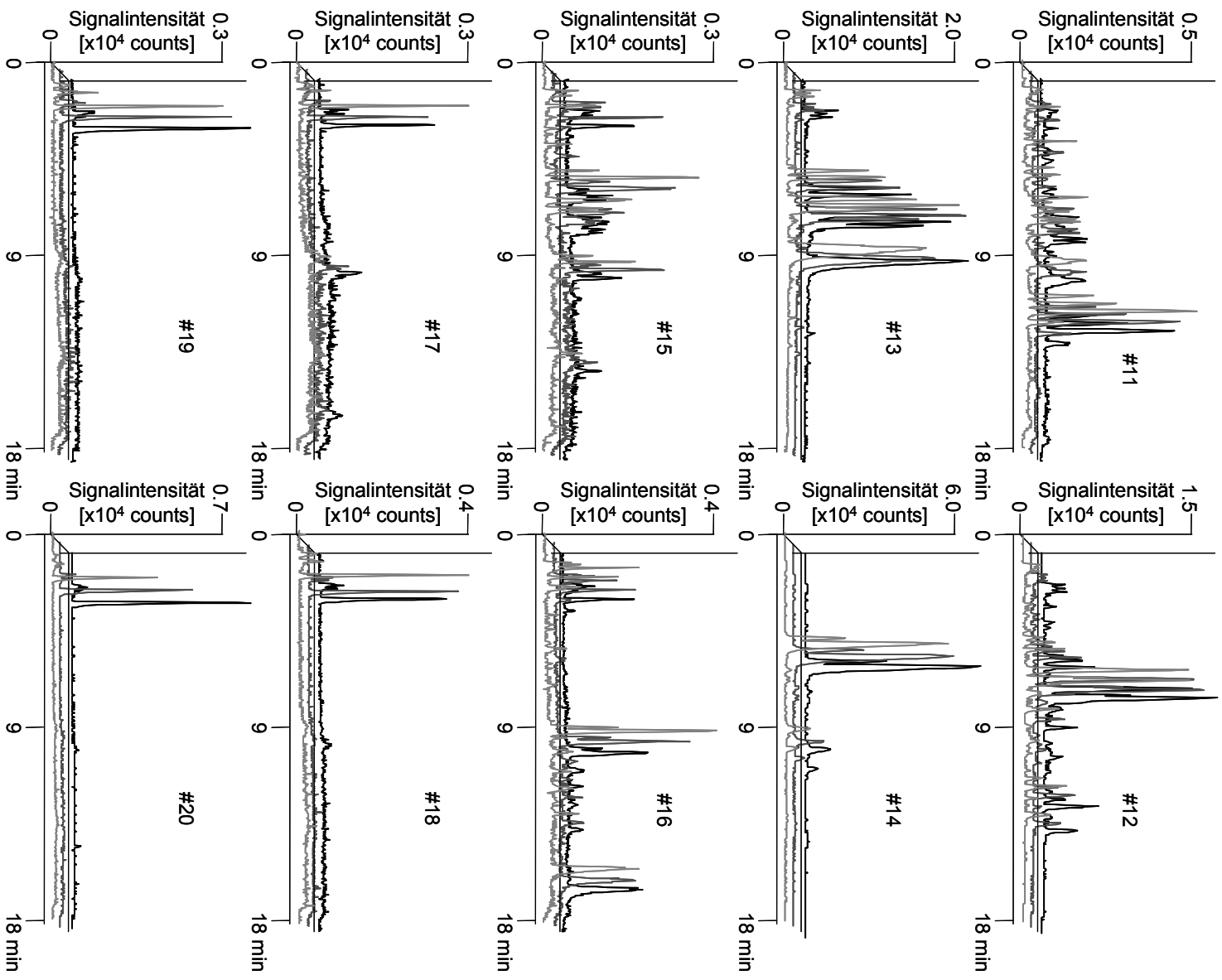


Abbildung 114: BPCs der Parallelinjektionen der CF-Fraktionen #11 bis #20

7.3 Tabellen zu Kapitel 3.2.1

Tabelle 96: Detektierte Massen in Fraktion #1 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
1.895	5457.4716	1.937	5458.0638	2.044	5458.0636
2.527	13683.7681	2.049	5213.3729	2.044	10913.9839
3.242	6867.3536	2.190	16372.2371	2.156	5213.3928
4.239	6998.1256	2.330	9248.7832	2.156	16372.3096
4.646	8556.5676	2.330	46241.7925	2.661	13683.8885
5.151	8451.4361	2.498	13426.3375	3.419	6867.2460
5.389	7272.3173	2.498	52933.2954	3.952	9356.5461
5.640	7334.4317	2.611	13683.6795	4.345	9039.8571
6.316	15694.2753	2.976	7799.8268	4.486	8557.2387
6.751	10315.0083	3.369	6866.9917	4.682	8451.3899
7.144	16207.9034	3.677	6998.2303	5.272	7272.3753
7.144	18077.8825	3.930	7356.5136	5.749	7334.5969
8.098	24661.8029	4.126	8573.3244	5.749	9739.0626
9.613	25787.6496	4.267	32770.6061	5.749	14967.1467
9.613	22968.3354	4.267	58757.6975	5.917	13095.2555
13.234	27578.7198	4.435	8557.1995	6.142	15693.4822
13.234	44335.3909	4.435	35045.1343	6.366	15710.9944
		4.688	8451.1542	6.366	47138.4728
		4.688	32893.4180	6.759	10314.0347
		5.137	7276.2817	6.759	56711.9521
		5.277	7272.4690	7.292	16210.4802
		5.501	7334.4964	7.292	18078.1278
		5.698	14966.7896	8.331	25784.9619
		5.698	45095.9058	8.331	24664.3078
		5.698	70212.7487	8.976	10751.7908
		6.091	8779.1790	8.976	24909.1941
		6.456	15693.5690	8.976	28476.4923
		6.456	33431.1604	9.425	36774.9630
		7.326	16209.8055	9.425	19573.2615
		8.168	25022.0066	9.425	65204.1488
		8.168	68405.0072	9.425	21733.9605
		8.448	24664.9335	9.425	14515.1164
		8.448	49335.4515	9.875	22967.9120
		8.448	72330.8820	9.875	45932.1900
		9.010	10751.6843	9.875	11483.3325
		9.010	24908.5746	15.853	61535.2826
		9.010	53731.1944	15.853	72850.6057
		9.206	65253.8160		
		9.374	21734.9964		
		9.374	53756.2712		
		9.739	22966.7463		
		9.739	35578.4386		

Tabelle 97: Detektierte Massen in Fraktion #2 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.078	5458.2863	1.909	5458.1224	1.994	5458.1692
2.078	10428.5479	1.909	10913.1782	2.499	7444.2825
2.078	16371.9148	1.909	20855.7374	2.583	13683.5751
2.078	33841.9268	2.190	16371.5542	3.341	6867.3251
2.078	12272.5188	2.415	7444.1035	3.706	5204.0134
2.344	7444.2622	2.415	13700.5839	4.407	8557.3613
2.344	8373.9084	2.555	13683.8070	5.193	7272.3885
2.344	26045.1165	2.555	25625.0940	5.193	10176.8558
2.541	13684.7893	2.555	6841.5196	5.193	13094.5053
2.541	12452.9844	2.948	7751.2018	5.754	6548.1602
2.864	7751.1991	3.285	6867.2525	5.754	7334.7069
2.864	15495.8218	3.677	5203.6398	6.372	15693.7274
3.186	6866.7777	3.677	9505.1632	6.681	26226.8215
3.186	5236.5084	3.677	8116.4786	6.681	10314.2263
3.186	10486.7906	3.677	33263.1162	7.719	31230.9137
3.186	13728.9197	3.677	62976.1603	7.719	20719.4525
3.186	15703.4387	3.790	23765.4101	8.337	26232.0119
3.341	5219.4920	3.790	42761.6592	8.337	25784.4524
3.341	12518.1432	3.790	73658.1384	8.337	13116.2011
3.509	5203.4937	3.790	58216.0292	8.337	77345.3088
3.509	9503.8225	4.126	8573.1856	8.926	10751.8288
3.509	14309.3141	4.126	41628.3662	8.926	24921.1373
3.509	15613.8717	4.126	60032.8512	8.926	45082.579
4.070	8573.1833	4.126	66048.5544	9.684	22967.5013
4.379	8557.3758	4.126	80817.6477	9.684	34853.0465
4.660	8451.3235	4.126	90614.4284	9.684	11484.0187
5.165	7272.3699	4.435	8557.3154		
5.165	10176.9935	4.435	59916.1671		
5.165	13092.4736	4.435	78311.2994		
5.165	16005.7614	4.660	8451.2782		
5.165	18910.7349	4.856	52907.6341		
5.165	21756.2393	5.165	7272.4560		
5.165	24735.8374	5.165	5935.3680		
5.165	7402.5092	5.165	10176.6968		
5.530	6548.2286	5.165	13093.0525		
5.530	7333.4533	5.165	24736.1287		
5.530	5874.0525	5.165	55787.3059		
5.530	8811.3849	5.165	65290.5960		
5.530	9790.2563	5.165	77766.2280		
5.530	13091.9625	5.221	13093.0875		
5.530	14680.2451	5.221	53800.3586		
5.782	7334.2879	5.221	80142.2871		
5.782	10344.7954	5.754	6548.0764		
6.021	5393.4750	5.754	7334.6446		
6.021	15695.6208	5.754	13092.3604		
6.021	17251.4728	5.754	8810.6484		
6.316	15692.8260	5.754	57764.7191		

Tabelle 97 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
6.316	7847.3644	5.979	7334.6635		
6.316	9489.1195	5.979	15694.2905		
6.316	11307.3230	5.979	41052.8021		
6.316	15524.4923	6.147	5394.2847		
6.316	15269.0650	6.147	10788.8257		
6.568	10314.5040	6.147	43132.6303		
6.568	26226.3547	6.147	33446.8840		
6.568	15693.4014	6.344	45810.3121		
6.568	19017.9429	6.344	33429.2383		
7.635	31231.3171	6.652	10314.0138		
7.635	20717.8588	6.652	26227.0052		
8.042	25786.4354	6.652	19020.0945		
8.042	12893.0375	6.652	52453.0875		
8.042	6801.6105	6.652	72191.2362		
8.042	8141.6834	6.652	38040.0564		
8.308	26232.8032	6.877	9827.9039		
8.673	28474.7823	6.877	26226.4800		
8.673	25043.1496	6.877	75338.9725		
8.673	18219.9294	6.905	9828.0035		
8.673	10934.9153	6.905	57227.6022		
8.673	50086.9365	6.905	78676.5689		
8.856	10752.4995	6.989	6575.8544		
8.856	24921.6058	6.989	8260.2270		
8.856	45081.1763	6.989	13153.5343		
8.856	9589.2010	6.989	52826.5224		
8.856	1246.7323	6.989	78465.6000		
9.094	21734.0832	7.747	31230.9845		
9.094	34851.8319	7.747	20719.9188		
9.094	66467.9408	7.747	62463.9175		
9.277	34852.2639	7.747	78705.7216		
9.277	10293.4973	7.747	95292.2082		
9.277	22969.2279	8.140	25784.7197		
9.277	45937.2079	8.140	12891.7302		
9.277	68862.4414	8.140	51570.3778		
9.473	22967.0907	8.140	68258.4000		
9.473	34854.5445	8.308	26332.4297		
9.473	5388.4017	8.308	13115.6372		
9.473	10778.5635	8.308	31229.3256		
9.473	17787.7817	8.308	51567.9719		
9.473	11483.6608	8.308	77339.0258		
9.908	35061.1954	8.673	28476.6557		
9.908	23150.5896	8.673	25041.9244		
9.908	10778.1860	8.673	14237.7182		
9.908	21266.8025	8.673	50066.4121		
10.203	45934.1024	8.673	69894.7663		
10.203	21197.3794	8.841	10751.7085		
10.203	22970.1363	8.841	24921.1271		
13.276	44330.4741	8.841	45086.5617		
13.276	27577.1719	8.841	53759.9318		

Tabelle 97 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
		9.262	21734.9472		
		9.262	10867.558		
		9.262	62311.8796		
		9.262	24921.4892		
		9.262	84218.6383		
		9.571	22967.5059		
		9.571	34852.3281		
		9.571	5388.7482		
		9.571	11484.2551		
		9.571	17788.4163		
		9.571	68855.9024		
		9.571	45935.7442		
		10.048	35060.0522		
		10.048	22967.5487		
		10.048	21268.3275		
		10.048	62484.516		
		10.048	10778.3727		

Tabelle 98: Detektierte Massen in Fraktion #3 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
1.474	7324.7471	1.740	5869.6550	1.621	7324.8515
1.474	33920.8631	1.740	27454.4408	2.322	13684.6901
1.474	21971.2050	2.217	13684.4492	2.322	9553.4460
1.474	11546.1171	2.217	9552.9223	2.322	33429.5247
1.474	5773.1040	2.217	33443.7103	2.322	62102.4013
1.769	5457.8773	2.217	41098.0706	3.136	5872.2910
1.769	6862.0614	2.217	62101.1077	3.136	11743.3455
1.769	10914.7717	2.217	70704.0555	3.136	25236.9910
1.769	11826.0403	2.919	5359.6092	3.136	46985.1601
1.769	27441.0458	2.919	10719.6957	4.203	18164.6422
1.769	34308.6613	2.919	7750.9106	5.325	7272.5917
2.120	9552.8564	2.919	30818.6706	5.325	14364.8603
2.120	14326.4408	2.919	50915.5158	5.55	9064.3867
2.120	33429.1834	2.919	56800.8208	5.775	5095.3333
2.372	13684.2006	2.919	61639.3032	5.775	10344.4704
2.751	5872.2354	2.919	75090.2959	5.775	9047.3750
3.158	12519.8720	2.919	8256.5628	5.971	9137.1342
3.158	50672.2636	3.340	5872.4401	5.971	7970.6574
3.509	5203.5952	3.340	12519.9949	6.392	15693.6918
3.509	10406.7644	3.340	11743.4028	6.785	10873.9868
3.509	9505.7425	3.340	40023.2307	6.785	26227.3189
3.509	15611.0280	3.340	55386.6766	7.122	9189.5222
3.761	6348.5391	3.340	78676.7794	7.122	64282.0273
3.761	31735.5946	3.536	5203.4258	7.122	18274.1018

Tabelle 98 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
3.761	54580.7548	3.536	10406.1642	7.290	9121.0618
4.084	7324.5650	3.536	9505.6253	7.290	16716.1141
4.084	18164.7731	3.789	6348.5322	7.290	27363.8515
4.449	50124.9309	3.789	9505.3720	7.290	56997.4909
4.842	14364.3527	3.789	31744.3205	7.683	9453.3155
4.842	28759.9595	3.789	69816.7442	7.683	10822.0224
5.319	9064.3007	4.125	7324.5890	8.329	26232.2188
5.319	7272.3729	4.125	18164.4486	8.497	26071.2265
5.684	9136.8957	4.125	36695.9803	9.648	13561.3009
5.684	19642.3093	4.125	60082.0605	9.648	22967.8924
5.684	10344.3062	4.125	72587.5046	10.602	21132.2466
6.231	15693.2198	5.248	7272.5584	10.602	45934.3796
6.231	7847.4476	5.248	14364.4908	10.602	57437.2505
6.231	10890.1805	5.248	33464.5925	10.602	10565.6469
6.568	10873.9614	5.501	9064.3606	11.079	57407.9771
6.568	26227.2319	5.501	7536.5352	11.079	38254.5132
6.568	52910.2779	5.501	10361.9648	11.079	29400.6553
6.877	9189.4562	5.725	5095.2939	11.079	10328.7039
6.877	18410.0586	5.725	9153.1582	11.079	87801.0022
6.877	27422.3756	5.725	10343.9307		
7.143	9121.0903	5.725	20685.7021		
7.143	16715.6670	5.725	25472.0400		
7.466	10821.7875	5.725	35672.9771		
7.662	31229.1781	5.725	56048.6249		
8.140	26232.0604	5.725	72410.7755		
8.140	70985.8532	5.894	9136.9602		
8.617	26070.2006	5.894	7970.6088		
8.617	13034.8077	6.315	15693.9463		
8.617	23683.8242	6.315	7846.6052		
8.617	52135.3204	6.315	76362.8138		
9.487	13561.1405	6.315	45806.2149		
9.487	22967.1538	6.315	62770.8682		
9.487	26960.3984	6.679	10873.9043		
9.487	54758.8017	6.679	15692.4513		
9.487	91911.1375	6.679	52818.8625		
9.936	21236.0106	6.679	62542.4266		
9.936	42366.1035	6.679	74590.2297		
9.936	67790.2397	7.044	9189.5229		
10.146	21165.1429	7.044	37865.5318		
10.146	45932.4628	7.044	69842.8897		
10.146	10582.9715	7.044	18274.2797		
10.146	41076.9727	7.241	9121.0113		
10.146	63589.4398	7.241	16718.3953		
10.385	21131.9680	7.241	26139.7011		
10.385	10566.2796	7.241	57005.9757		
10.385	57446.0582	7.241	45373.5996		
10.385	42269.1817	7.241	87136.5240		
10.581	57428.0569	8.251	26232.0265		
10.806	57408.8056	8.251	13117.0901		

Tabelle 98 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
11.030	38255.7343	8.251	51069.5406		
11.030	57407.9120	8.251	70991.8019		
11.030	31905.6910	8.419	26071.2318		
11.030	76509.4662	8.419	13035.5761		
11.030	19129.7543	8.419	52100.2457		
11.030	9907.9696	8.419	76901.8576		
13.304	44332.7482	8.419	94726.7256		
13.304	27575.1433	8.608	52142.3453		
13.304	55149.6117	8.608	76899.3777		
13.304	89017.2764	8.608	62962.5133		
13.725	88795.9381	8.804	26070.4517		
13.725	70219.3989	8.804	18214.3094		
13.725	44642.2457	8.804	52133.8823		
		9.562	13561.1565		
		9.562	22967.1317		
		9.562	34853.3984		
		9.562	91908.0455		
		10.320	21165.5450		
		10.320	45934.2435		
		10.320	10583.2183		
		10.320	71957.0321		
		10.320	92193.6379		
		10.516	21131.7558		
		10.516	10566.0398		
		10.516	45937.0749		
		10.516	91856.2621		
		11.050	57409.3726		
		11.050	38255.1771		
		11.050	29555.3150		
		11.050	87811.6664		
		11.050	76504.3086		
		11.050	10328.7461		

Tabelle 99: Detektierte Massen in Fraktion #4 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.022	7323.6290	1.937	7324.0070	1.601	7324.0930
2.022	53888.2369	2.162	9552.3109	1.853	5457.4256
2.022	14648.6290	2.162	21969.8580	2.415	21959.9621
2.022	23302.4873	2.555	13683.0192	2.779	13682.8162
2.022	61346.5715	2.555	53034.2528	3.481	12519.2429
2.204	5457.5130	2.555	80584.4309	3.481	8000.5100
2.204	10914.4487	2.836	36709.2870	4.520	7340.6812
2.204	16372.7143	2.836	63426.5919	4.520	9128.8428
2.204	51280.7588	3.116	5235.4740	4.800	9096.1492

Tabelle 99 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.204	27294.7168	3.116	60715.8262	4.941	9112.0134
2.569	9553.2006	3.285	8000.7072	5.614	9080.0309
2.569	21969.9137	3.453	8994.1916	5.614	9063.7868
2.569	72878.0511	3.818	6348.4145	5.867	9046.7915
2.569	58285.1222	3.818	8963.6036	5.867	63322.0912
2.765	13714.6415	4.070	7340.6533	5.867	77886.4222
2.765	53036.4100	4.379	9096.0272	6.484	15693.6281
2.765	80671.1409	4.547	9112.3441	7.495	9120.9067
2.948	13682.9754	4.547	39516.4596	8.898	26070.3340
2.948	5131.2426	4.547	56361.6204	8.898	52125.1236
2.948	8550.8488	4.800	9080.0316	8.898	13034.5825
3.523	5235.4338	4.800	34957.9699	11.227	57411.5701
3.523	10469.7289	4.800	62061.2938	11.227	38255.8311
3.523	15706.4800	5.474	9063.7420	11.227	76494.7263
3.523	36657.1350	5.474	57416.1298		
3.523	58481.5736	5.754	9046.6862		
3.523	76445.4035	5.754	57314.5370		
3.649	8000.8232	5.754	79649.8725		
3.818	12519.6100	7.382	9120.5267		
3.818	8994.9444	7.382	18276.3509		
3.818	71970.7792	7.382	63806.2627		
3.818	57324.2651	7.382	83632.4331		
3.818	25863.9760	8.926	26070.7744		
4.155	6348.3404	8.926	13033.4381		
4.155	8962.4417	8.926	52145.9115		
4.155	12697.3053	8.926	92484.8675		
4.155	57139.8273	11.059	57408.2718		
4.155	80746.3289	11.059	38256.2983		
4.379	7340.4862	11.059	28709.1439		
4.379	9130.3892	11.059	76495.9432		
4.379	15736.7448				
4.379	45507.0144				
4.519	7324.4675				
4.519	9099.9938				
4.519	14448.2026				
4.688	9095.7721				
4.688	7579.7012				
4.688	6520.3343				
4.688	56103.2845				
4.688	92488.6027				
4.814	57653.6447				
4.814	92774.9565				
4.814	38220.8619				
5.165	9080.1011				
5.165	7564.9821				
5.389	71123.6321				
5.816	9063.7873				
5.816	38291.2184				
5.816	61943.0248				

Tabelle 99 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
5.816	77948.4099				
5.816	61943.0248				
6.069	9046.7325				
6.069	19643.4036				
6.069	57321.8647				
6.069	72028.0812				
6.686	15693.5234				
7.178	14305.8435				
7.178	42922.7754				
7.178	51849.8009				
7.613	9120.5164				
7.613	55907.5209				
7.613	33438.9151				
8.932	26069.4642				
8.932	52508.4303				
8.932	13035.6274				
8.932	69969.5238				
8.932	93544.4283				
9.297	66720.3971				
11.247	57410.1933				
13.506	44576.2829				
13.506	27576.4886				
13.506	67968.3596				

Tabelle 100: Detektierte Massen in Fraktion #5 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
1.894	5457.3139	1.769	5939.8170	1.508	7324.2233
1.894	10915.4768	1.769	11877.8322	2.069	5457.5165
1.894	79184.7899	2.022	5457.4914	2.771	13682.9673
2.231	9552.4826	2.022	10914.6600	3.781	12519.4371
2.666	13682.7789	2.414	9553.3252	5.662	9063.5326
2.961	5160.1385	2.751	13683.0423	7.599	9121.0797
3.199	5235.4950	3.341	5235.4585	7.599	8532.9369
3.424	12519.7239	3.565	23518.6818	8.834	26127.7981
3.424	8902.6717	3.565	8902.0018	8.834	36873.9616
3.424	5563.4244	3.565	5563.3289	8.834	52136.6258
3.424	40056.7240	3.565	22262.9919	8.834	13034.9660
3.747	5064.0390	3.846	9360.9276	8.834	73746.0588
3.747	9361.1306	3.846	5064.0717	11.135	57403.3244
3.747	10127.2982	3.846	14045.2289	11.640	15404.9796
3.747	14040.8591	4.014	6348.3371	12.033	15388.9972
3.747	15196.3491	4.014	10127.8386	12.033	8005.4285
3.747	12697.2448	4.014	12697.1272	12.033	75558.1765
4.406	7861.2130	4.463	8426.8343	12.033	26581.6343

Tabelle 100 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
4.406	55002.4049	4.463	24229.2526		
5.206	5807.6264	4.463	38997.6216		
5.599	9063.4531	4.463	51623.5930		
5.599	19641.5724	4.575	7861.6626		
5.599	7552.6087	5.586	9063.3506		
5.599	10572.3609	7.719	8532.8653		
6.938	14305.5779	8.813	26127.0508		
6.938	22722.0029	8.813	41142.2386		
6.938	33978.1058	8.813	13059.1465		
6.938	51858.7378	11.115	57404.6691		
6.938	74696.5005	11.115	38324.0027		
7.134	22707.4566	11.592	15405.1787		
7.134	45778.1489	11.592	57411.7822		
7.134	11352.5926	11.592	46213.8907		
7.331	9120.8418	11.929	15389.0580		
7.710	8533.0490				
8.369	47302.0646				
8.369	24663.7550				
8.369	93220.6345				
8.748	26128.8496				
8.748	13064.4708				
8.748	52140.5740				
8.748	92718.0730				
9.127	36876.7070				
9.127	66608.0081				
10.923	57412.1604				
11.499	15404.7447				
11.499	82619.1488				
11.864	15389.3257				
11.864	8005.5553				
11.864	12584.3444				
13.449	44576.1887				
13.449	65375.5894				

Tabelle 101: Detektierte Massen in Fraktion #6 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.555	13681.7696	2.499	7820.4637	1.600	7324.2116
3.663	9359.6861	2.695	13682.8740	2.077	5457.5149
4.646	8564.4223	3.172	5159.9355	2.723	13682.7617
4.646	10875.9352	3.593	12519.0668	3.172	5160.1460
4.940	10906.4994	3.790	9360.8712	3.846	9360.6456
5.277	11049.3118	4.407	10570.5886	3.846	12519.6823
6.111	8215.7025	4.576	8565.2278	3.846	14042.1720
6.490	15076.2527	4.688	10875.6762	4.744	8565.2817

Tabelle 101 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
7.655	11365.4258	4.940	10905.6798	4.744	10875.5259
9.016	66568.0953	5.277	11048.6138	5.109	10905.7443
11.879	15389.4290	5.502	11078.8268	5.417	11048.7205
11.879	34518.7120	6.175	8215.0193	5.614	11078.6912
		6.175	15090.2913	5.614	15962.0983
		6.203	15073.1520	6.203	8214.2589
		6.540	8456.2070	6.680	15076.2289
		7.045	8684.4086	6.680	8456.3360
		7.719	11366.0173	7.157	8684.3671
		9.038	66564.3446	7.157	11382.6024
		10.048	7859.5166	7.775	11336.0180
		10.048	35923.9765	7.775	55613.4209
		11.087	47084.5153	7.775	98064.3132
		11.704	57409.2525	8.336	55370.9332
		11.985	15405.3877	9.066	66562.8000
				10.133	7859.4455
				10.133	47081.9387
				11.115	26540.2808
				11.115	57411.8332
				11.648	15404.8446
				12.013	15389.1431
				12.013	34520.1991
				12.013	69277.5031
				13.248	36601.9926
				13.248	44526.4002

Tabelle 102: Detektierte Massen in Fraktion #7 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.709	13680.2326	2.667	13682.8032	2.808	13683.1283
3.453	12519.6467	3.088	5159.9368	3.649	12519.0583
3.691	9360.1596	3.509	12519.2500	6.765	22738.3292
3.944	6347.7460	3.734	9360.6523	6.765	7561.8897
6.442	7561.3635	6.737	7562.1175	7.186	22723.2111
6.765	22723.4238	6.737	22738.6424	7.186	14306.3935
7.228	22711.2245	7.214	22722.6878	8.477	55371.9308
8.322	55369.8659	8.441	55374.8204	8.477	47296.9173
11.017	44675.4036	11.051	44670.1668	8.477	20338.1512
11.556	15405.2289	11.051	57400.1202	9.207	66553.6012
11.850	15390.3846	11.556	15404.7106	9.207	51618.8000
13.310	44349.4364	11.893	15389.2919	9.375	58371.9899
13.310	22253.8715			10.995	44670.9493
				10.995	57419.4479
				11.641	15405.2220
				12.005	15389.0150

Tabelle 103: Detektierte Massen in Fraktion #8 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.022	7543.0235	2.639	13682.6721	2.763	13682.9181
2.246	9554.0934	3.537	12519.3157	3.662	12519.1892
2.639	13682.4517	3.537	32053.4419	3.662	6410.0470
3.467	12519.4003	6.512	22739.2565	6.677	22738.8700
3.467	6410.0575	6.737	22723.4596	6.677	11368.9832
3.467	62297.9078	6.933	11362.6641	6.901	22723.2282
3.734	9360.9930	6.933	38762.2941	6.901	11362.6106
3.734	5849.3084	7.129	22707.1377	7.378	22707.3618
3.734	14041.0981	7.129	11353.8572	7.378	11353.5921
6.077	22774.8108	8.336	45418.6521	8.361	47300.6794
6.077	11976.6380	8.336	64153.0707	9.315	58362.5859
6.077	81194.1561	10.938	44679.5313	10.943	44680.7283
6.077	45609.6911	10.938	57417.0496	10.943	57416.7879
6.077	59870.9332	10.938	90908.0944	11.139	44667.2041
6.274	22756.3412	11.135	44670.1419	11.560	15405.1255
6.274	45528.1485	11.135	57412.3009	11.981	15388.9834
6.274	79697.0181	11.135	22339.3002		
6.274	68224.2075	11.135	87993.9569		
6.274	11377.0048	11.612	15404.8448		
6.470	22739.0647	11.612	57446.6602		
6.470	11369.7557	11.977	15389.3933		
6.470	45678.8773	11.977	75548.8965		
6.470	64704.1016				
6.470	7580.4499				
6.715	22722.9889				
6.715	11361.4319				
6.715	45557.0749				
6.715	64703.7159				
6.715	79664.9188				
6.715	7574.1950				
6.715	26749.2715				
6.855	55381.5358				
6.855	67616.3574				
6.855	92872.8363				
6.855	45564.3286				
7.023	45613.0612				
7.023	56036.5158				
7.023	66470.2127				
7.023	89440.3655				
7.206	22707.0219				
7.206	11353.4025				
7.206	40205.6926				
7.206	45369.0438				
7.206	78825.3289				
7.514	68129.1608				
8.342	47302.7890				
8.342	55370.8773				

Tabelle 103 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
8.342	67733.3133				
8.342	93318.3704				
8.988	66580.8060				
9.311	58362.4508				
9.311	96364.2971				
10.826	44685.0308				
10.826	57418.7709				
10.826	93168.7999				
10.826	66281.4602				
11.009	44669.0563				
11.009	66234.9470				
11.009	87886.4344				
11.009	57410.9645				
11.444	15404.9257				
11.444	75682.2004				
11.836	15389.1669				
11.836	8005.5029				
11.836	45344.0564				
11.836	61611.8189				
11.836	30763.9219				

Tabelle 104: Detektierte Massen in Fraktion #9 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.288	9552.6740	2.358	9552.5066	2.414	9552.6337
2.625	13681.9014	2.471	7821.4580	2.751	13683.5171
3.453	12521.1448	2.639	13683.0314	3.621	12519.4675
3.916	6347.9112	3.004	5416.8582	3.621	6466.6872
6.153	22756.1891	3.481	12519.3658	3.986	6348.4508
6.434	22740.3312	3.734	12518.6168	3.986	12702.5531
6.434	11371.4752	3.734	9361.0685	6.259	22755.2509
6.434	12146.8653	3.930	6348.5270	6.259	11288.7645
6.672	22724.1501	6.372	22739.0832	6.259	45190.4030
6.672	11363.0594	6.372	11370.2105	6.259	64714.0626
7.093	22706.2899	6.596	22723.5554	6.568	22739.4939
9.212	19272.9645	6.596	11361.6453	6.568	11276.8110
9.212	31136.6912	7.073	22707.3188	6.568	37403.8721
9.212	58369.4213	7.073	11353.7033	6.568	64705.5306
9.521	12361.6434	7.410	45387.6711	6.736	22723.4895
10.363	40725.4652	7.635	45417.0961	6.736	11362.0997
11.023	44661.0677	9.291	19273.0880	6.736	40239.7274
11.023	57412.7213	9.291	31155.6054	6.736	64699.7593
11.472	15404.6979	9.291	58363.2519	6.989	22723.3143
11.879	15387.9919	9.515	12362.4268	6.989	11361.4360
		10.301	40726.2315	7.185	22707.3708

Tabelle 104 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
		11.087	44681.4701	7.185	11353.3260
		11.087	57413.2004	7.185	40206.7338
		11.087	66305.8713	9.402	19273.4177
		11.087	89379.5087	9.402	12362.9028
		11.536	15405.3039	9.402	58364.8216
		11.536	44987.2401	9.402	31149.2674
		11.893	15388.9859	10.357	40725.2716
				10.357	22881.0479
				10.357	69626.8759
				11.171	44678.0189
				11.171	89371.7705
				11.171	57473.3279
				11.620	15405.0864
				11.620	7702.3041
				12.013	15389.3524
				12.013	8005.2055

Tabelle 105: Detektierte Massen in Fraktion #10 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.288	9552.1593	2.302	9553.3618	5.839	9553.1356
2.625	13680.2883	2.639	13682.8172	6.119	13682.7494
3.453	12519.3204	3.425	12519.4184	6.119	8551.6765
3.958	6348.0746	3.902	6348.4618	6.512	5416.4557
6.147	22556.2643	6.175	22556.0438	6.961	12519.2967
6.442	22540.5419	6.175	37404.2847	6.961	6409.9321
6.905	22523.6928	6.175	64707.6971	7.438	6348.5096
6.905	9371.9557	6.428	22540.2177	9.712	22556.1557
6.905	11262.8647	6.428	64715.1601	9.712	11277.7201
6.905	20102.2929	6.568	45145.3812	9.712	18701.3148
6.905	43530.6545	6.568	55170.2896	9.712	37401.9499
9.206	31138.4986	6.568	66214.6948	9.712	64718.8600
9.206	8509.6640	6.709	41284.0654	9.712	43724.8070
9.206	13122.0231	6.933	22524.2100	9.964	22540.2503
9.459	12361.9294	6.933	40209.4193	9.964	11270.1473
11.269	19536.7231	6.933	66444.9767	9.964	40242.6071
11.452	15403.2281	8.982	31153.7687	9.964	64718.6223
11.452	8021.0219	8.982	13122.7312	10.441	22524.2792
11.873	15388.6643	8.982	36875.2377	10.441	11262.5777
		8.982	62292.3073	10.441	40209.2174
		9.262	31137.7628	12.743	31138.0633
		9.262	8508.8317	12.743	8508.7850
		9.262	53805.1958	12.743	13122.2290
		9.262	62270.3718	12.743	25333.5249
		9.262	95009.1856	13.585	43544.1370

Tabelle 105 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
		9.543	12362.4768	13.585	22523.6923
		9.543	31136.2406	13.585	70229.2971
		11.508	15405.0973	13.585	94772.3998
		11.508	19537.1004	15.016	15405.2087
		11.508	39074.0941	15.016	19536.9572
				15.016	39072.7774
				15.016	7702.1684
				15.381	15389.2927
				15.381	59743.3949
				15.381	8005.2087

Tabelle 106: Detektierte Massen in Fraktion #11 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.246	9555.8402	2.329	9553.0084	2.358	9552.6231
2.485	11476.9871	3.340	12519.3203	2.358	52566.0631
3.383	12519.0883	3.536	11185.4143	2.695	13683.1014
3.607	11185.1483	3.873	6348.4787	3.453	12519.7109
3.874	6348.9367	5.108	9755.3542	3.846	6348.4232
5.067	9754.6217	5.445	9739.1354	5.249	9755.1015
5.432	9738.6696	6.483	7562.1468	5.586	9739.2059
6.428	7561.7196	6.483	22556.4154	6.540	7562.1254
6.428	22554.9461	6.679	22540.2215	6.540	22556.6727
6.665	22542.4055	6.679	11269.3324	6.540	45136.9015
6.905	8185.9236	6.932	8185.8506	6.540	66458.9351
6.905	22538.1385	7.100	22524.6977	6.793	22540.5529
7.073	22523.3138	7.100	9535.6156	6.793	45093.1575
7.073	9535.2617	7.465	10618.3543	6.793	66201.7705
7.438	10617.5838	7.465	35321.4902	6.793	82282.0150
7.438	35333.9168	7.465	21232.2811	7.270	22524.3750
7.438	12248.4613	7.606	10602.4525	7.270	8185.7065
7.593	10602.2073	7.606	46954.8306	7.270	45560.6626
7.593	35318.9437	7.606	21169.6746	7.550	10618.3938
8.028	9241.9006	8.111	9242.2980	7.550	35334.9184
8.028	14083.9415	8.111	14084.4612	7.550	53085.8686
8.182	9226.8265	8.111	18482.1717	7.719	10602.3412
8.926	36878.0068	8.111	55476.4343	7.719	35318.4595
8.926	65214.3848	8.335	9226.3666	7.719	46941.5107
9.375	26990.3124	9.009	36876.4195	8.364	9226.0936
9.375	53927.3572	9.009	62300.4865	8.364	14084.5314
9.375	79651.2304	9.009	31164.0771	8.364	55386.7415
10.006	43535.1109	9.290	27004.6795	9.543	26988.9885
10.006	27155.6620	9.290	31139.8589	9.543	13494.7041
10.006	13493.3081	9.290	13501.2175	9.543	53940.4790
10.006	53958.9276	9.290	54017.9863	11.171	11689.8386

Tabelle 106 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
10.006	87194.3883	9.458	26989.2341	11.171	15422.0211
11.017	11690.0292	9.458	13949.8105	11.171	35083.6210
11.017	15421.1778	9.458	53927.9730	11.171	65131.8981
11.353	15405.4446	11.114	11689.9263	11.536	15405.1094
11.774	15390.1514	11.114	5845.4343	11.536	7702.5579
11.774	8004.8821	11.114	65119.7623	11.873	15389.2087
11.774	12587.8460	11.451	15405.1034	11.873	8005.1949
11.774	7694.2803	11.451	8021.2320	12.490	11673.7868
12.209	11673.1345	11.451	67472.6631	12.490	37082.8602
16.910	26989.3302	11.815	15389.1100	14.062	42854.4893
16.910	15386.3151	11.815	8005.3137	14.062	53971.6463
16.910	53911.5579	11.815	67383.6046	17.008	26988.3965
		11.815	30692.6140	17.008	53970.2274
		12.377	11673.7750	17.008	81032.2734
		12.377	16901.5765		
		14.005	42852.1959		
		14.005	56909.8503		

 Tabelle 107: Detektierte Massen in Fraktion #12 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.416	7629.6789	2.555	7631.3940	3.311	1219.5133
3.271	12517.8336	2.555	11442.7099	3.311	37560.2930
3.481	11185.2293	2.555	34326.9994	3.311	88994.9932
3.481	12703.1345	3.397	12519.4311	3.564	11185.4339
3.818	5616.8189	3.397	6466.4895	3.564	12702.3982
3.818	6042.2910	3.621	11185.6844	3.845	6348.5228
3.818	6348.1237	3.621	12702.1300	4.209	6856.0744
3.818	7348.2393	3.958	7348.4795	4.546	10154.1883
4.463	10153.7985	4.098	6856.3429	4.546	20311.0364
4.814	10138.1902	4.435	9248.8555	4.883	10138.1305
5.053	9755.4451	4.435	6442.9955	4.883	7243.1541
5.375	9738.5331	4.576	10154.1882	5.108	9755.2875
5.726	9191.1422	4.884	10138.1422	5.444	9739.0466
5.726	10946.1922	4.884	7243.1325	5.444	29217.3874
5.726	10471.4385	5.109	9755.2512	5.444	59811.3610
6.344	7561.8553	5.109	50685.6286	5.723	10946.6226
6.344	7490.7858	5.109	40557.7471	5.723	31418.2371
6.344	15692.3887	5.109	30420.7498	5.723	62831.8085
6.666	14305.0841	5.389	9739.2490	6.427	7562.1472
6.666	8186.3415	5.726	10946.4844	6.427	15692.4242
6.666	7944.8638	5.726	10470.9866	6.427	30185.7846
6.666	8029.1236	5.838	9191.4458	6.427	55646.9015
6.666	8086.3202	5.838	15708.6012	6.427	78474.3247
6.666	7887.6308	5.838	62837.1694	6.763	8015.5424
6.666	7744.7873	5.838	31414.4520	6.763	14306.3103

Tabelle 107 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
6.666	7151.7829	5.838	47173.2586	6.763	22682.2401
6.849	8015.9333	6.428	7562.1480	6.763	63122.1301
6.849	7013.7046	6.428	15692.4503	6.904	8185.7552
6.849	8087.4574	6.428	30187.1139	6.904	9551.6223
6.849	7945.5516	6.765	8015.5750	7.072	9535.6105
6.849	7887.2322	6.765	14306.6495	7.072	22524.3482
6.849	8199.9094	6.933	8185.7741	7.072	58586.8712
7.059	9535.0762	6.933	22688.9454	7.465	35335.1478
7.059	8185.1655	7.101	9535.6037	7.465	15809.0680
7.059	8354.4914	7.522	35335.3095	7.465	69309.7739
7.059	22522.0677	7.522	15808.7887	7.465	53082.2865
7.410	35336.0385	7.522	70608.8099	7.746	23455.0250
7.410	15810.4656	8.280	9226.2525	7.746	35327.3648
7.761	23452.0452	8.280	55375.3907	7.746	11728.8668
7.761	8068.0905	9.066	36956.2786	7.746	47020.6403
7.761	35504.1459	9.066	73548.5846	7.746	71909.0137
7.761	45443.7264	9.066	52141.9920	7.970	8067.5023
7.761	16130.8698	9.066	11062.9388	7.970	23487.2050
8.182	9225.7889	9.487	26990.3415	7.970	40365.3554
8.182	14084.9929	9.487	28888.3466	7.970	14101.3433
8.954	36954.2363	9.487	11036.0700	8.279	9266.1939
9.234	11035.3987	9.487	54012.1624	8.279	55379.1607
9.234	28893.2566	9.740	28873.4874	8.279	11078.6996
9.234	27004.4500	9.740	35505.6531	8.279	25084.3238
9.234	9341.8412	9.740	14436.8425	9.037	36957.2974
9.445	26988.4091	9.740	53969.2263	9.037	11062.9592
9.445	8646.1864	10.048	35437.6977	9.037	55311.3595
9.445	28887.0614	10.048	17723.3344	9.037	72685.6127
9.627	28870.4538	10.329	14488.5244	9.037	85790.1943
9.627	26604.5112	10.329	39407.3275	9.486	26989.8947
9.627	14503.8610	10.329	74049.1046	9.486	28889.0767
10.245	14488.9465	10.778	51078.4048	9.486	11036.0096
11.003	11689.7246	11.143	11689.9848	9.486	13494.4520
11.395	15404.7922	11.143	23377.8202	9.486	54003.9830
11.732	15388.7539	11.143	35066.9763	9.486	86656.8166
11.732	25115.7602	11.143	58449.8416	9.682	28873.1930
11.732	8005.3246	11.339	17103.4424	9.682	14436.8922
12.294	11672.0705	11.339	19537.2535	9.682	53969.1988
12.294	16900.4579	11.339	62227.6339	9.682	35509.4117
12.294	7888.0364	11.339	39075.0985	10.384	14488.1071
12.294	33855.3352	11.480	15405.0269	10.384	39332.0692
12.644	22303.1665	11.844	15389.2738	10.384	72421.8782
12.644	25844.6175	11.844	25113.5337	11.338	1169.2380
12.644	10730.6452	12.378	11674.0462	11.338	35068.4686
13.037	22284.1857	12.378	16902.4851	11.535	17101.9494
13.037	10711.6176	12.686	22302.2763	11.535	8551.0914
13.037	30502.0206	12.686	10728.8374	11.535	50221.2243
		13.135	22285.3421	11.675	15405.2098
		13.135	10712.7254	12.012	15389.1888

Tabelle 107 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
		13.641	38128.2447	12.012	25113.6606
		13.641	22284.0068	12.012	8005.2334
				12.537	11673.8395
				12.537	16902.6480
				12.537	3385.5228
				12.789	22300.2741
				12.789	10728.6913
				12.789	66902.3201
				13.154	10712.8063
				13.154	30513.7450
				13.154	53614.4857
				14.979	77423.7193
				16.999	53983.7192

 Tabelle 108: Detektierte Massen in Fraktion #13 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
1.671	5035.4081	2.236	6842.1343	3.452	12519.3820
1.671	10070.7366	3.331	12519.5544	3.649	11185.4771
2.120	6840.4773	3.612	11185.6383	3.649	12702.5627
2.120	10263.4181	3.612	12701.8198	3.930	6348.5239
2.120	12541.3071	3.857	6348.3635	3.930	12697.4548
2.120	17104.6902	3.857	6042.6170	4.660	10154.2441
2.443	7130.3256	4.558	10154.3024	4.660	50777.5543
3.327	12520.5264	4.895	10137.9785	4.968	10138.1229
3.537	11185.8244	5.120	9755.1430	4.968	50697.5914
3.537	12702.2938	5.429	9739.1506	5.137	9755.0839
4.562	10154.9231	5.906	9191.3467	5.137	37394.9327
4.856	10138.4560	6.215	10387.3885	5.446	9739.1059
4.856	7242.7498	6.215	7665.2452	5.951	9191.3186
5.095	9754.6629	6.383	7491.0218	6.400	7491.0276
5.095	5572.6373	6.439	7562.1560	6.400	14948.0878
5.432	9738.5475	6.439	30186.3681	6.428	7562.1292
5.853	9190.7870	6.439	15090.9710	6.428	30195.3696
5.853	10947.4125	6.738	8015.5580	6.708	8015.5648
6.105	10385.8951	6.738	9930.5789	6.708	9930.5184
6.105	7664.9471	6.944	8185.7502	6.933	8185.7472
6.358	7561.8298	6.944	23241.9392	7.129	9535.5498
6.358	16072.6738	7.141	9535.6031	7.129	8185.6650
6.694	8015.1540	7.141	16737.4741	7.270	8198.6858
6.694	9930.3007	7.281	8198.8749	7.466	35334.3971
6.891	8185.9408	7.281	50219.7289	7.466	8369.1139
6.891	7012.9443	7.534	35334.3019	7.466	72133.4018
7.438	35318.3160	7.534	8369.0046	7.663	23470.8532
7.438	8368.9143	7.534	23472.1125	7.663	35320.0778

Tabelle 108 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
7.438	17667.7201	7.814	23455.2386	7.663	51987.7728
8.252	9225.6537	7.814	45465.2128	7.663	70641.4115
8.252	16866.5452	7.814	68758.4297	7.859	23454.2753
8.252	28927.4175	8.123	14084.4354	7.859	11726.6989
8.505	36787.5874	8.123	20064.5596	7.859	45442.6401
8.505	72053.9681	8.123	9242.5562	7.859	92356.1514
8.505	17753.1732	8.123	60184.2694	8.308	9226.2486
8.659	36772.4865	8.292	9226.1376	8.308	16865.8949
8.659	18385.7409	8.292	16866.2145	8.308	55369.4054
8.659	26533.6224	8.292	55379.9505	8.561	36772.9097
8.659	46350.2353	8.292	64603.5236	8.561	26534.9505
8.659	30726.1804	8.769	36773.1329	8.561	18386.1216
8.659	7070.8599	8.769	75289.5124	10.385	36771.3704
8.659	58012.4466	8.769	26535.0067	10.385	73543.6102
11.844	15388.5676	8.769	18385.6816	11.171	36771.7852
11.844	36774.0133	11.632	15405.3424	11.171	18385.8079
11.844	7694.1235	11.632	36771.9025	11.171	73546.2437
13.150	19424.7903	11.632	73571.4737	11.528	15405.2078
		11.632	47487.2435	11.528	36733.1730
		12.025	15389.4492	11.528	7701.3726
		12.025	36773.4965	11.528	73520.3302
		12.025	50014.4292	11.977	15389.1372
		12.025	73537.4071	11.977	36772.5728
		13.316	19424.7791	11.977	7694.8441
		13.316	58314.2149	13.352	19424.6729
				13.352	36771.3335
				13.352	9712.0788
				13.352	58319.4762
				13.352	73546.5611

Tabelle 109: Detektierte Massen in Fraktion #14 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
3.355	12517.4308	2.611	13682.8893	2.723	13683.0321
4.950	9755.4153	3.340	12519.2958	2.723	27395.9208
4.950	8436.8337	3.593	11185.3516	2.723	41056.6147
4.950	8518.9053	3.902	6348.5297	2.723	70131.2867
4.950	8373.1129	4.547	8565.0197	3.453	12519.3708
4.950	8202.4401	5.024	9755.2514	3.677	11185.0657
5.311	9739.4448	5.024	18106.4079	3.677	12701.4028
5.802	9922.5140	5.333	9739.1761	5.081	9755.2480
6.055	9750.5859	5.333	18047.6887	5.081	18106.0225
6.448	7562.0298	6.035	9922.3702	5.333	9739.2232
6.785	8015.9957	6.821	7491.0505	5.333	18047.0046

Tabelle 109 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
6.939	8186.1126	6.821	7562.2064	5.915	9922.2783
6.939	9930.3465	7.185	8015.6073	6.476	7491.0807
6.939	7013.8350	7.354	8185.7589	6.841	8015.6157
7.528	35320.3302	7.971	35321.3886	6.841	9739.0278
7.725	11365.2210	8.757	13737.7148	6.981	8185.7894
8.104	13737.4917	8.757	16866.2718	7.599	35317.4230
8.398	16865.7087	9.142	36773.6268	7.795	11366.0323
8.803	19590.6513	9.142	19590.1136	7.795	34110.9160
8.803	66485.9395	9.142	11498.4726	7.795	45540.1034
8.974	36773.3284	9.339	19573.4510	7.795	60082.6508
8.974	11497.5261	9.591	19756.4167	8.188	13737.5397
9.156	19573.3537	9.591	39280.4382	8.188	14084.8472
9.156	36959.3598	9.591	60514.8522	8.188	54942.0852
9.156	13883.9477	9.844	19615.9665	8.469	16865.9060
9.367	39287.6308	9.844	37083.9198	8.469	55370.1306
9.367	57454.2172	10.124	36982.8868	8.469	33730.0129
9.493	11681.3623	10.124	6432.4675	8.469	8433.6151
9.493	19756.9064	10.124	18491.5997	8.862	19589.2953
9.605	19614.8005	10.124	73963.0526	8.862	11497.3194
9.605	39139.9677	13.212	35149.7556	8.862	65200.0031
10.082	36984.1614	13.212	12778.0148	9.002	36773.9868
10.082	18493.2709	13.212	69087.7514	9.002	19674.8203
10.082	6431.9717	13.492	70293.5373	9.002	75277.3403
13.148	35146.5881			9.198	19573.5454
13.148	12778.9328			9.198	11497.4241
13.148	17665.2921			9.198	36958.1395
13.597	35088.8368			9.535	19756.4737
13.597	46268.9113			9.535	11680.7654
13.597	70189.1664			9.535	39292.8232
13.597	14292.1955			9.535	60510.8237
				9.816	19615.5016
				9.816	11497.5883
				9.816	39295.2355
				10.124	36983.3903
				10.124	18491.0032
				10.124	6432.5974
				11.219	19574.9416
				11.219	11497.1997
				11.219	39143.4031
				11.219	58716.8734
				12.482	16157.2884
				12.482	8078.1008
				12.482	36980.8010
				13.015	11832.9495
				13.015	23668.6758
				13.015	52572.7364
				13.015	77459.7231
				13.296	35091.3519
				13.296	12777.3318

Tabelle 59 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
				13.296	17665.9347
				13.296	70274.0150
				13.520	35148.6059
				13.520	70304.3699

Tabelle 110: Detektierte Massen in Fraktion #15 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
3.410	12519.1518	2.638	13682.6561	2.695	13683.6227
3.410	50070.3866	4.041	6348.3706	5.221	9755.3420
3.901	6348.3560	5.176	9755.5008	5.530	9739.1866
5.108	9755.5233	5.485	9739.2369	6.568	7490.8584
5.445	9739.0370	6.635	7491.0693	6.568	15693.1934
6.371	7491.0128	7.028	8015.6013	7.130	8185.9447
6.371	15693.0441	9.105	36831.1812	9.234	36831.5494
6.371	47082.1668	9.105	14699.2181	9.234	73507.4356
6.511	7562.0924	9.105	73499.1800	9.234	18410.4024
6.511	61463.7495	9.330	19573.7573	9.431	19573.3096
6.511	30182.5353	9.330	11497.5817	9.431	11497.3334
6.511	16076.2817	9.330	14515.4728	9.431	14515.9635
6.820	8015.7043	9.330	33124.7687	9.431	36829.3028
6.988	8185.8953	13.652	46084.9527	10.385	48967.9905
7.578	35315.0313	13.652	14289.7930	10.385	36983.9876
7.578	70664.4883	13.652	90918.5194	10.385	96416.7931
7.578	97717.3598			11.115	36496.4311
9.023	36831.2221			13.304	35151.6106
9.023	14698.9318			13.585	46103.9673
9.023	73529.5487			13.585	14305.5962
9.290	19573.5597			13.585	35146.8456
9.290	11497.0933			13.585	93673.1238
9.290	14515.2329			13.809	46088.4604
9.290	11036.0788			13.809	14290.6190
9.542	8645.5206			13.809	74742.6865
9.542	39234.7058			13.809	90879.6835
9.542	60524.0411			13.809	57161.9809
10.131	48959.8725			14.146	46096.3446
10.131	17651.0700				
10.131	72957.7063				
10.131	96261.7568				
13.463	46088.2220				
13.463	14290.1060				
13.463	68482.3000				
13.463	92250.1840				

Tabelle 111: Detektierte Massen in Fraktion #16 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
2.653	13682.9736	2.750	13683.1867	2.779	13683.1152
2.653	8823.9400	2.750	25844.8616	2.779	53035.0447
2.653	12133.3809	5.473	9739.0591	5.754	9739.4088
2.653	54731.6122	9.374	14515.4122	9.311	14698.4029
2.653	83822.9132	9.374	58203.3495	9.311	36774.3285
3.852	6348.5953	9.739	14556.7542	9.311	7349.6163
5.129	9755.7993	10.300	48829.1638	9.311	58217.6061
5.129	10496.4783	11.170	36675.9683	9.311	73555.7085
5.466	9739.2728	11.984	40238.1533	9.507	14515.3219
6.069	9683.1532	11.984	79085.6675	9.507	58209.5792
6.069	52539.9380	13.191	40988.2176	9.507	19573.8847
6.069	92853.5423	13.191	82155.6919	10.349	48824.7728
7.107	22523.5746	15.914	61535.3252	10.349	24391.8008
7.107	68145.2416	15.914	24283.0872	10.349	16273.2376
9.022	14698.3825	15.914	30078.1304	11.107	36678.0622
9.022	36770.6759			11.107	65968.9913
9.022	58210.9183			11.331	50559.4918
9.022	73559.1902			12.005	40238.6885
9.022	7349.2416			12.005	39340.0954
9.022	97556.4756			12.005	79280.4103
9.232	14515.2477			13.156	40987.6728
9.232	58213.6815			13.156	83327.8260
9.232	7257.2024			16.018	61531.0857
9.232	19572.3369			16.018	24283.3318
9.232	29095.6331				
9.232	51444.6583				
9.232	85263.0697				
9.541	14557.2278				
9.541	8645.6489				
10.159	48822.1066				
10.159	97254.8851				
10.159	81843.7374				
10.159	16272.8022				
10.159	24417.1389				
11.057	36680.6247				
11.057	72990.5479				
11.899	40236.9051				
11.899	39751.7126				
11.899	39338.6660				
11.899	38855.2937				
11.899	77721.5420				
11.899	79273.7272				
11.899	89222.1949				
11.899	93593.1095				
12.480	36777.8320				
12.480	56857.9117				
12.480	73929.4331				

Tabelle 111 (Fortsetzung)

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
12.480	88822.1895				
13.013	40989.2216				
13.013	60018.2216				
13.013	82185.2935				
13.013	75376.9403				
13.013	71817.7959				
13.013	20492.6819				
13.013	13664.5199				
15.665	61534.9679				
15.665	24283.3926				
15.665	19612.6231				
15.665	30077.1696				
15.665	41562.7909				
15.665	48567.4514				
15.665	81967.6106				
15.665	93694.8048				
15.665	76080.5987				

Tabelle 112: Detektierte Massen in Fraktion #17 der Chromatofokussierung von *Escherichia coli*

Messung 1		Messung 2		Messung 3	
Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da	Retentionszeit in min	Dekonvolutionsmasse in Da
5.460	9740.5999	9.207	36774.3490	7.747	22523.3217
9.164	36766.0246	9.207	73544.8508	9.178	35772.6162
9.164	14516.2177	9.207	66616.7032	9.178	73501.3715
15.563	61539.5867	15.522	61537.4697	9.178	19572.4814
				15.942	61534.3584

In den Fraktionen #18, #19 und #20 waren in keiner Injektion intakte Proteinmassen nachweisbar.

7.4 Tabellen zu Kapitel 3.2.3

Tabelle 113: in Fraktion 1 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.DQIIEAVAAMSVMDEVVELISAME EK.F	R5EC7	12288	4.60		56/20	
	RL7_ECO57	12156	4.60		56/20	
M.CTTGVLRRMSSR.N	ABE06052	18801	6.58		43/6	
	Q8FK49_ECOL6	18800	6.58		41/6	

Tabelle 114: in Fraktion 2 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.WFNESK.G K.GFGFITPADGSK.D K.DVVFVHFSAIQNGFK.T K.TLAEGQNVFEIQDGGQK.G K.GPAAVNVTAL- K.WFNESK.G	CSPC_ECO57	7267	6.81	209/88	206/88	234/88
	AE0727	7398	6.54	209/86	206/86	234/86
M.SYTLPSLPYAYDALEPHFDK.Q R.FGSGWAWLVK.G K.EFWNVVNWDEAAAR.F K.HHQTYVNNANALESLEPEFANL PVEELITK.L R.NNAGGHANHSFLFWK.G	DSECN	23083	6.45	152/21	307/43	125/16
	SODM_ECOLI	22952	6.44	152/21	307/43	125/16
	SODM_ECO57	22934	6.44	152/21	307/43	125/16
	B91233	23065	6.45	152/21	307/43	125/16
R.TEEVRPLQPRE K.MSTGLALDSEGKR.L K.VAAPESLAVLNFNPAR.N	G64897	38589	9.22	136/10		
K.KLNKPDQLQVK.L K.AVVVTSGTTSEVLLNKLNEEQK MNMR.I (Ox) R.AVAFMDDALLAGER.A	Q8CVC0_ECOL6	35899	8.59	133/15		
	E64800	33399	8.61	133/16		
	A85566	33328	8.61	133/16		
K.EAAIQVSNVAIFNAATGK.A K.KHQKVPALNQPGGIVEK.E	R5EC24	11309	10.21	77/17	70/34	
	RL24_ECO57	11178	10.21	77/17	70/34	
R.DGYADGWAQAGTAR.A R.ALLNSMVIGVTEGFTK.K	R5EC6	18892	9.71	74/7	74/9	
	RL6_ECO57	18761	9.71	74/7	74/9	
	CAA25720	18950	9.62	74/7		
K.YSYVDENGETK.T K.SLDDFLIK.Q	1HNR	5298	8.31	57/40	55/40	
	HNS_ECO57	15399	5.43	57/13	55/13	
	B85704	15530	5.43	57/13	55/13	

Tabelle 114 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
R.ASPSLLDGIVVEYGTPTPLR.Q	A34495	20626	6.43	119/11	117/11	
K.EASAGNFADLLAHS DGLIK.N	B99809	24335	7.72	67/8	73/8	
R.LVQQFADAGIR.K K.GRGPVATLVLR.E	FIEC2	97290	5.80	48/1	48/1	54/2
	CAA05535	97233	5.80	48/1	48/1	54/2
	ABE09044	97219	5.80	48/1	48/1	54/2
	CAC20126	97304	5.80	48/1	48/1	54/2
	CAC20130	97347	5.80	48/1	48/1	54/2
	D85980	97252	5.85	48/1	48/1	54/2
R.IDGVFGDTAVVTEWLK.D	G64824	26913	5.79	45/6	63/6	68/6
K.HPVTWPWGVTQK.G	RL2_ECO57	29711	10.93	45/4		
	R5EC2	29842	10.93	45/4		
R.SNNTPTWFPDSQNLAFTSDQ AGRPQVYK.V	ABE06229	46058	6.98	43/6		
	G90725	45927	6.98	43/6		
R.HHITADGYR.G	R5EC32	6442	11.03	39/17		46/17
	RL32_ECO57	6311	11.03	39/17		46/17
K.WFNESK.G K.GFGFITPEDGSK.D K.DVVFVHFSAIQTNGFK.T K.GPSAANVIAL.-	CSPE_ECO57	7328	8.04		72/63	
	ABE06127	10653	9.45		72/44	
	AAB40823	8626	9.16		72/54	
	B85562	7459	8.09		72/62	
K.VAAPESLAVLFNPAR.N	Q8CW30_ECOL6	38662	9.30		64/4	
	ABE07149	38591	9.10		64/4	
	G64897	38589	9.22		64/4	
	H90885	38645	9.30		64/4	
K.LDYELKPMDFSGIIPALQTK.N R.ADAVLHDTPNILYFIK.T K.ELKLDYELKPMDFSGIIPALQTK. N	JKECQ	27173	8.44		63/14	
	1GGGA	24266	5.37		63/16	
	1WDNA	24619	5.98		63/16	
R.IFTEDGVSIPVTVIEVANR.V K.RWNFR.T K.GAVPGATGSDLIVKPAVK.A	R5EC3	22230	9.91		60/9	67/11
	CAA23634	8519	9.77		60/25	

Tabelle 115: in Fraktion 3 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
R.DLFEGLLVSDLDGHPAGVAES WDNK.D K.WSDGTPVTAQDFVYSWQR.S K.LLVHPSTSPVK.A R.SPTYWNNAK.T K.TVINQVTYLPIASEVTDVNR.Y K.AQGDMPAYGYTPPYTDGAK.L K.LTQPEWFGWSQEK.R R.SVDPNTASPYASYLQYGHIAGI DEILEGK.K K.KPITDLGVKAIDDHTLEVTLSEP VPYFYK.L K.WTQPGNIVTNGAYTLK.D K.LLAEAGYTADKPLTINLLYNTSD LHK.K K.SPAFDSIMAETLK.V K.AIDDHTLEVTLSEPVYFYK.L K.TVINQVTYLPIASEVTDVNR.Y R.DLFEGLLVSDLDGHPAGVAES WDNK.D K.WSDGTPVTAQDFVYSWQR.S	Q8CW44_ECOL6	63560	6.00	377/20	562/40	491/31
	ABE06921	63548	6.00	377/20	562/40	491/31
	G90846	60938	5.95	377/21	562/42	491/33
	F85704	60985	5.95	377/21	562/42	491/33
R.DLFEGLLVSDLDGHPAGVAES WDNK.D K.WSDGTPVTAQDFVYSWQR.S K.LLVHPSTSPVK.A R.SPTYWNNAK.T K.TVINQVTYLPIASEVTDVNR.Y K.AQGNMPAYGYTPPYTDGAK.L K.LTQPEWFGWSQEK.R R.SVDPNTASPYASYLQYGHIAGI DEILEGK.K K.AIDDHTLEVTLSEPVYFYK.L K.TVINQVTYLPIASEVTDVNR.Y K.LLAEAGYTADKPLTINLLYNTSD LHK.K K.SPAFDSIMAETLK.V	AAA21302	60864	5.90	370/21		497/33
	F64871	60861	6.05	369/21	617/45	496/33
K.VLSESDFQVNLQDLR.A R.GIEGSSLDVPEIVHSGK.T K.SRDDLQAVMAMVR.G M.PSFDIVSEVDLQEAR.N R.GGDLGQPFQFK.N	Q2MC00_ECOLI	18333	5.96	175/29	332/45	274/30
	ABE05950	24609	8.12	175/21		
	B64772	19035	5.99	175/28		
	AAN79015	24680	8.12	175/21		
K.ADVVTYNQVTDVQILHDK.G	Q8CVU0_ECOL6	37589	8.73	83/5		
	ABE08218	37651	8.44	83/5		
	H91040	37605	7.78	83/5		
	JGECT	37591	7.78	82/5		
K.LVSSAGTGHFYTTTK.N	R5EC33	6368	10.25	81/27	83/27	96/27
	RL33_ECO57	6237	10.25	81/27	83/27	96/27
R.IDAAFQDEVAASEGFLK.Q R.VGVLQGTQETFGNEHWAPK. G	1HSLA	26140	5.45	80/7	92/7	138/15
	ABE08060	28480	5.47	80/6	92/6	
	B85872	28466	5.47	80/6	92/6	138/14
K.TIATENAPAAIGPYVQGVNNGN MIITSGQIPVNP.K.T K.DLNDFATVNATYEAFFTEHNAT FPAR.S	E86122	15159	5.82	53/43		67/43
K.GAYEMAYSQENALWLATSQS R.K K.TFDTPPTHNSLALSADGK.T R.LYTTNADGELITIDTADNK.I K.MSTGLALDSK.G (Ox)	Q8CW30_ECOL6	38662	9.30	79/11	74/10	61/14
	ABE07149	38591	9.10	79/11	74/10	61/14
	G64897	38589	9.22	79/11	74/10	77/15
	H90885	38645	9.30	79/11	74/10	61/14

Tabelle 115 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/Sequenzabdeckung Messung 1	Score/Sequenzabdeckung Messung 2	Score/Sequenzabdeckung Messung 3
K.YHVNFMGGDLGK.D K.YQLNPPQGMDSNMDVVFVQQY ADTVK.Y	1A23	21119	5.42	100/19		76/13
	1A2J	20990	5.23	100/19		76/13
	1A2LA	20791	5.23	100/19		76/13
	1AC1A	20966	5.10	100/19		76/13
	1ACVA	20940	5.10	100/19		76/13
	1BQ7A	20765	5.12	100/19		76/13
	1FVJA	21016	5.10	100/19		76/13
	ABE09859	23104	5.95	100/17		76/12
	A39292	23090	5.95	100/17		76/12
	AAC43519	23050	5.76	100/17		76/12
	AAC43520	23113	6.15	100/17		76/12
	AAC43521	23097	5.76	100/17		76/12
	AAC43522	23068	5.76	100/17		76/12
	AAC43523	23090	5.76	100/17		76/12
	AAC43524	23082	5.76	100/17		76/12
	AAC43525	23055	5.76	100/17		76/12
	AAC43526	23115	6.15	100/17		76/12
	AAC43527	23116	5.76	100/17		76/12
	AAC43528	23044	5.76	100/17		76/12
	AAC43529	23097	5.76	100/17		76/12
	AAC43530	23040	5.76	100/17		76/12
	AAC43531	23070	5.76	100/17		76/12
	AAC43532	23040	5.76	100/17		76/12
AAC43533	23042	5.76	100/17		76/12	
AAC43534	23109	6.15	100/17		76/12	
AAC43535	23066	5.76	100/17		76/12	
K.ADVVTYNQVTDVQILHDK.G	Q8CVU0_ECOL6	37589	8.73	83/5		
	ABE08218	37651	8.44	83/5		
	H91040	37605	7.78	83/5		
	JGECT	37591	7.78	82/5		
K.LVSSAGTGHFYTTTK.N	R5EC33	6368	10.25	81/27	83/27	96/27
	RL33_ECO57	6237	10.25	81/27	83/27	96/27
R.IDAAFQDEVAASEGFLK.Q R.VGVLQGGTTQETFGNEHWAPK. G	1HSLA	26140	5.45	80/7	92/7	138/15
	ABE08060	28480	5.47	80/6	92/6	
	B85872	28466	5.47	80/6	92/6	138/14
K.GAYEMAYSQQENALWLATSQS R.K K.TFDTPTHPNSLALSADGK.T R.LYTTNADGELITIDTADNK.I K.MSTGLALDSK.G (Ox)	Q8CW30_ECOL6	38662	9.30	79/11	74/10	61/14
	ABE07149	38591	9.10	79/11	74/10	61/14
	G64897	38589	9.22	79/11	74/10	77/15
	H90885	38645	9.30	79/11	74/10	61/14

Tabelle 115 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.TIATENAPAAIGPYVQGVDLGN MIITSGQIPVNP.K.T K.DLNDNFATVNATYEAFTEHNAT FPAR.S	1QU9A	13480	5.36	47/48		
	Q2M664_ECOLI	13603	5.36	47/47		
	YJGF_ECOL6	13472	5.36	47/48		
	ABE10252	16510	7.74	47/40		
	D91281	15161	5.82	47/43		
R.GIGDVLIAWENEALLAANELGK. D K.YLYSPEGQEI.AAK.N	BYEC	36637	6.62		54/6	
	Q8CVJ5_ECOL6	36650	7.77		54/6	
	ABE09913	36679	7.03		54/6	
R.HHITADGYR.G	R5EC32	6442	11.03			39/17
	RL32_ECO57	6311	11.03			39/17
	AAC43522	23068	5.76	100/17		76/12
	AAC43523	23090	5.76	100/17		76/12
	AAC43524	23082	5.76	100/17		76/12
	AAC43525	23055	5.76	100/17		76/12
	AAC43526	23115	6.15	100/17		76/12
	AAC43527	23116	5.76	100/17		76/12
	AAC43528	23044	5.76	100/17		76/12
	AAC43529	23097	5.76	100/17		76/12
	AAC43530	23040	5.76	100/17		76/12
	AAC43531	23070	5.76	100/17		76/12
	AAC43532	23040	5.76	100/17		76/12
	AAC43533	23042	5.76	100/17		76/12
	AAC43534	23109	6.15	100/17		76/12
AAC43535	23066	5.76	100/17		76/12	
K.TIATENAPAAIGPYVQGV DNGN MIITSGQIPVNP.K.T K.DLNDNFATVNATYEAFTEHNAT FPAR.S	E86122	15159	5.82	53/43		67/43

Tabelle 116: in Fraktion 4 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.IGTTEVIPGLAEK.W R.ELNADDVVFSDR.Q K.VDDNTVQFVLRPEAPFLADLA MDFASILSK.E K.LDLNPIGTGPFQLQQYQK.D R.QALTYAVNK.D K.NLIPPTMWGYNDVQDYTYDP E.K.A R.MAEMIQADWAK.V K.GYVVDPLGK.H K.HHFENVSIE.- K.VSGGSYEYFEGMGLPELISEVK. K K.AFDGYWGTPKQIDTLVFSITPDA SVR.Y K.SINLMEMPGLNVGYLSYNVQK. K	1DPE	57399	5.66	388/26		448/27
	1DPPA	57371	5.75	388/26		448/27
	Q8CVK7_ECOL6	60255	6.36	388/25		448/26
	A39194	60255	6.21	388/25		448/26
K.LLVHPSTSPVPK.A K.WTQPGNIVTNGAYTLK.D R.SPTYWNNAK.T R.SGEIDMTNNSMPIELFQK.L K.AQGNMPAYGYTPPYTDGAK.L K.DSAIVPVYYYVNAR.L	F64871	60861	6.05	253/13		235/14
-.MFAQEVTITAPNGLHTRPAA QFVK.E K.GFTSEITVTSNGK.S K.LQTLGLTQGTVVTSIAEGEDEQ K.A K.AVEHLVK.L	WQEBPH	9114	5.65	196/78		
R.GTLLVGLGTYPPFSFGDDGK .L K.VGVGLGNTYEEWLR.Q K.HLGVEASLKPTK.W K.WFGADVTK.-	ABE07594	31063	5.86	194/17		90/14
	E64955	29021	6.21	194/18		90/15
	C85809	29035	6.21	194/18		90/15
-.MFEQEVITITAPNGLHTRP AAQFVK.E K.GFTSEITVTSNGK.S K.LQTLGLTQGTVVTSIAEGEDEQ K.A K.AVEHLVK.L	1JELP	9115	5.34	193/78		65/35
	1OPD	9143	5.11	193/78		65/35
	WQEBPH	9114	5.65			65/35
K.LLVHPSTSPVPK.A K.WTQPGNIVTNGAYTLK.D R.SPTYWNNAK.T K.AQGDMPAYGYTPPYTDGAK.L K.DSAIVPVYYYVNAR.L	Q8CW44_ECOL6	63560	6.00	151/9		147/10
	ABE06921	63548	6.00	151/9		147/10
	G90846	60938	5.95	151/10		147/11
	F85704	60985	5.95	151/10		147/11
K.TIATENAPAAIGPYVQGV DNGN MIITSGQIPVNP.K.T K.TGEVPADVAAQAR.Q K.DLNDFATVNTATYEAFFTEHNAT FPAR.S	E86122	15159	5.82	59/52		90/52
K.LVSSAGTGHFYTTTK.N	R5EC33	6368	10.25			91/27
	RL33_ECO57	6237	10.25			91/27

Tabelle 116 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.TIATENAPAAIGPYVQGVDLGN MIITSGQIPVNP.K.T K.TGEVVPADVAAQAR.Q K.DLNDFATVNATYEAFFTEHNAT FPAR.S	1QU9A	13480	5.36			88/58
	Q2M664_ECOLI	13603	5.36			88/57
	YJGF_ECOL6	13472	5.36			88/57
	ABE10252	16510	7.74			88/48
	D91281	15161	5.82			88/52
K.GTVSTESGVLNQQPYGFNTR.F	OSMC_ECOLI	14948	5.56			72/14
	Q8FHG9_ECOL6	15121	5.57			72/13
	ABE07179	15107	5.57			72/13
	CAA40680	14459	5.34			72/14
	E64901	15079	5.57			72/13
	F90889	15109	5.57			72/13

Tabelle 117: in Fraktion 5 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
R.DLFEGLLVSDLDGHPAPGVAES WDNK.D K.WSDGTPVTAQDFVYSWQR.S K.LLVHPSTSPVPK.A K.WTQPGNIVTNGAYTLK.D K.AQGNMPAYGYTPPYTDGAK.L K.LTQPEWFGWSQEK.R K.DSAIVPYYYYNAR.L R.LVKPWVGGYTGKPLDNTYTR. N	AAA21302	60864	5.90	333/25		
	F64871	60861	6.05	332/25		448/32
R.LYTTNADGELITIDTADNK.I K.VAAPESLAVLFNPAR.N	Q8CW30_ECOL6	38662	9.30			126/9
	ABE07149	38591	9.10			126/9
	G64897	38589	9.22			126/9
	H90885	38645	9.30			126/9
R.DLFEGLLVSDLDGHPAPGVAES WDNK.D K.WSDGTPVTAQDFVYSWQR.S K.LLVHPSTSPVPK.A K.WTQPGNIVTNGAYTLK.D K.AQGDMPAYGYTPPYTDGAK.L K.LTQPEWFGWSQEK.R K.DSAIVPYYYYNAR.L R.LVKPWVGGYTGKPLDNTYTR. N R.NNGSEVQSLDPHKIEGVPEJNI SR.D R.SVDPNTASPYASYLQYGHIAI DEILEGK.K R.SPTYWNAK.T K.TVINQVTYLPIASEVTDVNR.Y R.HQGTDFVAR.A K.SPAFDSIMAETLK.V	ABE06921	63548	6.00	322/24		395/28
	G90846	60938	6.05	322/25		395/29
	F85704	60985	5.95	320/25		395/29
	Q8CW44_ECOL6	63560	6.00			395/28

Tabelle 117 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.AADMTGADIEAMTR.S	R5EC11	14866	9.64			45/9
	RL11_ECO57	14735	9.64			45/9
	CAA23621	14852	9.64			45/9
	AAC43081	14906	9.64			45/9
M.MKPNIHPEYR.T R.TVVFHDTSVDEYFK.I K.SHPFYTGK.L	ABE05815	10045	9.30	93/36		51/20
	H64755	9914	9.30	93/36		51/20
	E85604	9910	9.34			51/20

Tabelle 118: in Fraktion 6 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.DMTCQEFIDLNPK.A K.AMTPVAWWMLEHEETVYK.G K.GGDTVTLNETDLTQPK.V	Q2M7H1_ECOLI	12035	5.73	167/43		68/15
	S30269	12514	6.55	167/41		68/15
	E91177	12496	6.55	167/41		68/15
K.GAYEMAYSQQENALWLATSQS R.K R.LYTTNADGELITIDTADNK.I K.VAAPESLAVLFNPAR.N K.TFDTPHPNSLSADGK.T R.ELVADDATNTVYISIGIGK.E	H90885	38645	9.30	147/20		52/5
	Q8CW30_ECOL6	38662	9.30	146/20		52/5
	ABE07149	38591	9.10	146/20		52/5
	G64897	38589	9.22	146/20		52/5
K.DLVESAPAALK.E K.ALEEAGAEVEVK.-	1CTF	6928	5.10	110/33		51/33
	R5EC7	12288	4.60	110/19		51/19
	RL7_ECO57	12156	4.60	110/19		51/19
R.HNVAFIFICPPNADDDLLR.Q K.EYNAAPSLQGGFIPAPDQVK.E K.HPTIPIGLWMYANLVFNK.G	Q6JZ76_ECOLI	22978	5.15	82/18		89/26
K.KGAFVFPVTLGDPGIEQSLK.I K.VGVDSVLVADVPVEESAPFR.Q R.HNVAFIFICPPNADDDLLR.Q R.AALPLNHLVAK.L K.IIEQHINEPEK.M	Q6JZ40_ECOLI	25623	5.00			201/33
K.VGVDSVLVADVPVEESAPFR.Q R.HNVAFIFICPPNADDDLLR.Q	Q6JZ37_ECOLI	25676	5.03			187/33

Tabelle 118 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/Sequenzabdeckung Messung 1	Score/Sequenzabdeckung Messung 2	Score/Sequenzabdeckung Messung 3
K.VGVDSVLVADVPVEESAPFR.Q R.HNVAPIFICPPNADDDLRLR.Q K.EYNAAPPLQGFGISAPDQVK.A K.AAIDAGAAGAISGSAIVK.I R.AALPLNHLVAK.L K.IIEQHINEPEK.M	Q6JZ46_ECOLI	25494	4.86	262/32		198/33
	Q7WUY8_ECOLI	25763	5.02	262/31		
	Q7WUY9_ECOLI	25777	5.02	262/31		
	Q7WUZ1_ECOLI	25705	4.95	262/31		198/33
	Q7WUZ2_ECOLI	25749	5.14	262/31		198/33
	TSECA	28706	5.31	260/28		198/30
	Q6JZ36_ECOLI	25794	5.14	260/31		
	Q6JZ44_ECOLI	25806	5.03	260/31		198/33
	Q6JZ50_ECOLI	25753	4.94	260/31		
	Q6JZ51_ECOLI	25752	5.26	260/31		
	Q6JZ53_ECOLI	25781	5.03	260/31		
	Q6JZ55_ECOLI	24404	5.09	260/33		
	Q6JZ57_ECOLI	25756	5.03	260/31		
	Q6JZ70_ECOLI	25738	5.03	260/31		
	Q6JZ74_ECOLI	25753	4.95	260/31		
	Q6JZ79_ECOLI	25764	4.93	260/31		
	Q7WUY7_ECOLI	25783	5.03	260/31		
	Q7WUZ0_ECOLI	25753	5.03	260/31		
	Q7WUZ3_ECOLI	25722	4.95	260/31		198/33
	Q7WUZ4_ECOLI	25753	4.95	260/31		198/33
	Q8RIY3_SHIFL	25753	5.03	260/31		198/33
	Q8RQ14_ECOLI	25752	5.26	260/31		198/33
	Q8RQ21_SHIDY	25786	5.03	260/31		
	AAB60046	28708	5.31	260/28		
	AAB60052	28679	5.20	260/28		198/30
	AAA65158	28734	5.31	260/28		198/30
	AAA65170	28673	5.64	260/28		
	H90857	28707	5.64	260/28		
	AAB60056	28677	5.20	259/28		198/30
	Q6JZ41_ECOLI	25680	5.03			198/33
	Q6JZ42_ECOLI	25611	4.93			198/33
	Q6JZ51_ECOLI	25752	5.26			198/33
	Q6JZ53_ECOLI	25781	5.03			198/33
Q6JZ70_ECOLI	25738	5.03			198/33	
Q6JZ73_ECOLI	25679	4.95			198/33	
Q6JZ82_ECOLI	25785	5.26			198/33	
Q7WUZ7_ECOLI	25710	5.03			198/33	

Tabelle 119: in Fraktion 7 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.EGAFVPPFVTLGDPGIEQSLK.I K.VGVDSVLVADVPVEESAPFR.Q R.HNVAFIFICPPNADDDLLR.Q K.EYNAAPSLHGFGISAPDQVK.A K.AAIDAGAAGAISGSAIVK.I R.AALPLNHLVAK.L K.IIEQHINEPEK.M	Q6JZ37_ECOLI	25676	5.03	228/40		260/41
R.YSDEQVEQLLAELLNVLK.H	A85858	8283	5.50	83/25		
K.KHQKVPVFNQPGGIVEK.E K.EAAIQVSNVAIFNAATGK.A K.VIVEGINLVK.K	R5EC24	11309	10.21	81/34		
	RL24_ECO57	11178	10.21	81/34		
	Q6JZ70_ECOLI	25738	5.03	280/40		
	Q6JZ74_ECOLI	25753	4.95	280/40		
	Q6JZ79_ECOLI	25764	4.93	280/40		
	Q7WUY7_ECOLI	25783	5.03	280/40		
	Q7WUZ0_ECOLI	25753	5.03	280/40		302/41
	Q7WUZ3_ECOLI	25722	4.95	280/40		302/41
	Q7WUZ4_ECOLI	25753	4.95	280/40		302/41
	Q8RIY3_SHIFL	25753	5.03	280/40		302/41
	Q8RQ14_ECOLI	25752	5.26	280/40		
	Q8RQ21_SHIDY	25786	5.03	280/40		
	AAB60046	28708	5.31	280/36		
	AAB60052	28679	5.20	280/36		302/41
	AAA65158	28734	5.31	280/36		300/37
	AAA65170	28673	5.64	280/36		281/37
	H90857	28707	5.64	280/36		281/37
	AAB60056	28677	5.20	280/36		300/37
	Q6JZ35_ECOLI	25760	5.14			281/41
	K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K K.AGGGSATLSMGQAAAR.F	DEECM	32317	5.61		
Q5IMI7_SHIFL		21002	7.60			40/20
Q5IML9_SHIBO		21436	7.66			40/19
Q5IMM9_ECOLI		21250	7.88			40/19
Q5IMN5_SHIFL		21908	6.19			40/19
Q5IMN7_ECOLI		20341	6.81			40/20
Q5IMN8_ECOLI		21795	6.14			40/19
Q5IMN9_ECOLI		21752	6.93			40/19
Q5IMP1_ECOLI		21867	6.20			40/19
Q5IMP3_ECOLI		21754	6.15			40/19
Q5IMP4_ECOLI		20901	8.57			40/20
Q5IMS6_ECOLI		21466	7.88			40/19
Q5IMP6_ECOLI		21316	5.94			40/19

Tabelle 119 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
(fortgesetzt)	Q5IMS4_ECOLI	21665	6.93			40/19
	Q5IMS7_ECOLI	19797	6.81			40/21
	Q5JZN8_ECOLI	20731	7.85			40/20
	Q8G881_ECOLI	28023	6.22			40/15
	Q8GC64_ECOLI	28009	6.22			40/15
	Q9ETZ1_ECOLI	30099	6.19			40/14
	Q9ETZ7_ECOLI	30086	6.19			40/14
	Q9F6J1_ECOLI	30075	6.19			40/14
	Q9F6J3_ECOLI	30102	6.19			40/14
	Q9F6J4_ECOLI	30102	6.19			40/14
	Q9F6J5_ECOLI	30109	6.34			40/14
	Q9F6J6_ECOLI	30046	5.82			40/14
	Q9F6J7_ECOLI	30058	6.75			40/14
	Q9K2W1_ECOLI	28429	6.22			40/14
	Q9K327_ECOLI	29296	5.38			40/14
	Q9K329_ECOLI	29294	6.23			40/14
	Q9K339_ECOLI	29268	5.38			40/14
	Q9KH83_ECOLI	29354	5.23			40/14
	Q9L701_ECOLI	28463	6.22			40/14
	Q9L702_ECOLI	28399	6.95			40/14
	Q52R22_ECOLI	22287	6.84			40/19
	Q52R23_ECOLI	22159	6.84			40/19
	Q52R36_ECOLI	22175	6.84			40/19
	Q549P8_ECOLI	29891	5.38			40/14
	Q549P8_ECOLI	29891	5.38			40/12
	ABE09111	35036	6.03			40/14
	O30398_ECOLI	28431	6.22			40/14
	O30399_ECOLI	28445	6.22			40/14
	O30400_ECOLI	28415	6.22			40/14
	O34615_ECOLI	28442	6.22			40/14
	O54657_ECOLI	28445	6.22			40/14
	O85608_ECOLI	29871	5.56			40/14
	AAB87032	29880	5.38			40/14
	AAB87035	29878	5.38			40/14
	AAF97988	29917	5.38			40/14
	AAF97989	29864	5.38			40/14
	AAF98000	29907	5.38			40/14
	AAF98001	29905	5.38			40/14

Tabelle 119 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.EGAFVFPVTLGDPGIEQSLK.I K.VGVDSVLVADVPVEESAPFR.Q R.HNVAFIFICPPNADDDLLR.Q K.LKEYNAAPPLQGGFISAPDQVK.A K.EYNAAPPLQGGFISAPDQVK.A K.AAIDAGAAGAISGSAIVK.I R.AALPLNHLVAK.L K.IIEQHINEPEK.M	TSECA	28706	5.31	280/40		96/6
	Q6JZ36_ECOLI	25794	5.14	280/40		300/37
	Q6JZ44_ECOLI	25806	5.03	280/40		302/41
	Q6JZ50_ECOLI	25753	4.94	280/40		
	Q6JZ51_ECOLI	25752	5.26	280/40		302/41
	Q6JZ53_ECOLI	25781	5.03	280/40		302/41
	Q6JZ55_ECOLI	24404	5.09	280/40		
R.ELVADDATNTVYISGIGK.E K.VAAPESLAVLFPNPAR.N K.TFDPTTHPNSLALSADGK.T	Q8CW30_ECOL6	38662	9.30	67/14		
	ABE07149	38591	9.10	67/14		
	G64897	38589	9.22	67/14		
	H90885	38645	9.30	67/14		
K.LVSSAGTGHFYTTTK.N	R5EC33	6368	10.25	63/27		
	RL33_EC057	6237	10.25	63/27		
K.GGDTVTLNETDLTQIPK.V	Q2M7H1_ECOLI	12035	5.73	57/15		
	S30269	12514	6.55	57/15		
	E91177	12496	6.55	57/15		
-MNIPLHDR.V K.VGDIVFNDGYGVK.S	BVECGS	10381	5.15	56/23		
	CAA30738	10408	5.15	56/23		
R.VFQTHSPVDSISVK.R	R5EC19	13125	10.62			54/13
	RL19_EC057	12994	10.62			54/13
K.EGAFVFPVTLGDPGIEQSLK.I R.HNVAFIFICPPNADDDLLR.Q K.EYNAAPPLQGGFISAPDQVK.A	Q6JZ76_ECOLI	22978	5.15	142/27		35/18
K.GAVPGATGSDLIVKPAVK.A K.KMAGQMGNERTVQSLDVVR.V (Ox)	R5EC3	22230	9.91			50/8

Tabelle 120: in Fraktion 8 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.GTQAQFIMEK.Y K.YGIFQISTGDMR.A K.LVTDELVIALVK.E R.NGFLLDGFPR.T K.EAGINVDYVLEFDVPDELIVDR.I K.FNPPKVEGKDDVTGEELTTR.K K.VEGKDDVTGEELTTR.K R.LVEYHQMTAPLIGYYSK.E K.VDGTKPVAEVR.A R.IILLGAPGAGK.G R.LVEYHQMTAPLIGYYSK.E (Ox)	AAB40228	25684	6.14	426/49		243/31
	AAN79072	25739	6.46	426/49		243/31
	KIECA	23571	5.55	424/53		241/34
	KAD_EC06	23527	5.75	424/53		241/34
K.IAIVNMGSLFQQVAQK.T	DNEC17	17677	9.69	81/9		
	CAA53207	17761	9.58	81/9		

Tabelle 120 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
R.LYTTNADGELITIDTADNK.I K.TFDTPHPNSLALSADGK.T K.GAYEMAYSQQENALWLATSQS R.K	Q8CW30_ECOL6	38662	9.30	79/10		
	ABE07149	38591	9.10	79/10		
	G64897	38589	9.22	79/10		
	H90885	38645	9.30	79/10		
R.EIELDGVTPYPYVIDVSSK.S	ABE05815	10045	9.30	55/21		
	H64755	9914	9.30	55/21		
K.EAAIQVSNVAIFNAATGK.A K.VIVEGINLVK.K K.HQKVPALNQPGGIVEK.E	R5EC24	11309	10.21			79/17
	RL24_EC057	11178	10.21			79/17
K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I	DEECM	32317	5.61			61/10
	1CME	32387	6.21			61/10
	1EMD	32401	6.21			61/10
	Q8G881_ECOLI	28023	6.22			61/12
	Q8GC64_ECOLI	28009	6.22			61/12
	Q9ETZ1_ECOLI	30099	6.19			61/11
	Q9ETZ7_ECOLI	30086	6.19			61/11
	Q9F6J0_ECOLI	30116	6.19			61/11
	Q9F6J1_ECOLI	30075	6.19			61/11
	Q9F6J2_ECOLI	30071	6.19			61/11
	Q9F6J3_ECOLI	30102	6.19			61/11
	Q9F6J4_ECOLI	30102	6.19			61/11
	Q9F6J5_ECOLI	30109	6.34			61/11
	Q9F6J6_ECOLI	30046	5.82			61/11
	Q9K2L4_ECOLI	29295	5.57			61/11
	Q9K2W1_ECOLI	28429	6.22			61/12
	Q9K327_ECOLI	29296	5.38			61/11
	Q9K339_ECOLI	29268	5.38			61/11
	Q9KH77_ECOLI	29309	5.57			61/11
	Q9KH78_ECOLI	29309	5.57			61/11
	Q9KH79_ECOLI	29293	5.84			61/11
	Q9KH80_ECOLI	29354	5.58			61/11
	Q9KH81_ECOLI	29381	5.58			61/11
	Q9KH82_ECOLI	29322	5.38			61/11
	Q9KH83_ECOLI	29354	5.23			61/11
	Q9L701_ECOLI	28463	6.22			61/12
	Q9L702_ECOLI	28399	6.95			61/12
	Q9L703_ECOLI	28428	6.95			61/12
	Q68QU6_ECOLI	15868	8.93			61/21
	Q68QW0_ECOLI	15852	8.93			61/21
	Q549P8_ECOLI	29891	5.38			61/11
	ABE09111	35036	6.03			61/9
	AAA16107	32558	7.66			61/10
O30398_ECOLI	28431	6.22			61/12	
O30399_ECOLI	28445	6.22			61/12	
O30400_ECOLI	28415	6.22			61/12	
O34615_ECOLI	28442	6.22			61/12	

Tabelle 120 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
-MVTFHTNHGDIVIK.T K.TFDDKAPETVK.N R.EGFYNNITIFHR.V K.EPIKNEANGLK.N R.SGMHQDVPKEDVIESVTVSE.- R.VINGFMIQGGGFEPGMK.Q K.IKGVATGRSGMHQDVPK.E (Ox)	CSECB	18142	5.51	169/42		239/43
	AAA23453	18172	5.35	169/42		239/43
	F85552	18156	5.52	169/42		239/43
	ABE06055	18142	5.51			237/43

Tabelle 121: in Fraktion 9 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
R.EHEDTLAGIEATGVTR.N K.HLAHLVSEK.Y	E90859	9380	5.48	112/20		
R.VINGFMIQGGGFEPGMK.Q K.EPIKNEANGLK.N R.SGMHQDVPKEDVIESVTVSE.- K.TFDDKAPETVK.N	CSECB	18142	5.51	78/10		43/20
	2NUL	18013	5.69	78/10		
	ABE06055	18142	5.51	78/10		
	AAA23453	18172	5.35	78/10		43/20
	CAA41982	7791	6.81	78/25		
F85552	18156	5.52	78/10		43/20	
R.VDAAIEESVIAHMNELLIALSDD AELSR.E	B90885	8794	5.59	36/36		
K.EAAIQVSNVAIFNAATGK.A K.VIVEGINLVK.K	R5EC24	11309	10.21		75/17	107/26
	RL24_ECO57	11178	10.21		75/17	107/27
R.ALDAIIASVTESLK.E	DNECS1	9220	9.69			59/15
K.GAVPGATGSDLIVKPAVK.A R.IFTEDGVSIPTVIEVEANR.V	R5EC3	22230	9.91			39/8

Tabelle 122: in Fraktion 10 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.GFSGEDATPALEGADVLLISAG VAR.K K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.FFSQPLLLGK.N K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I	Q9K2L4_ECOLI	29295	5.57	113/18		144/24
	Q9L703_ECOLI	28428	6.95	113/18		144/24
	AAF98005	29890	5.84	113/17		144/23
	AAC43737	29975	6.24	113/17		144/23
	AAC43738	29975	5.84	113/17		144/23

Tabelle 122 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.FFSQPLLLGK.N K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I	DEECM	32317	5.61	223/16		163/21
	Q8G881_ECOLI	28023	6.22	223/16		163/25
	Q8GC64_ECOLI	28009	6.22	223/16		163/25
	Q9ETZ1_ECOLI	30099	6.19	223/17		163/21
	Q9ETZ7_ECOLI	30086	6.19	223/17		163/21
	Q9F6J1_ECOLI	30075	6.19	223/17		163/21
	Q9F6J3_ECOLI	30102	6.19	223/17		163/21
	Q9F6J4_ECOLI	30102	6.19	223/17		163/21
	Q9F6J5_ECOLI	30109	6.34	223/17		163/21
	Q9F6J6_ECOLI	30046	5.82	223/17		163/21
	Q9F6J7_ECOLI	30058	6.75	223/17		
	Q9K2W1_ECOLI	28429	6.22	223/18		163/24
	Q9K327_ECOLI	29296	5.38	223/18		163/24
	Q9K329_ECOLI	29294	6.23	223/18		
	Q9K339_ECOLI	29268	5.38	223/18		163/24
	Q9L702_ECOLI	28399	6.95	223/18		163/24
	Q549P8_ECOLI	29891	5.38	223/17		163/23
	ABE09111	35036	6.03	223/15		163/20
	O30398_ECOLI	28431	6.22	223/18		163/24
	O30399_ECOLI	28445	6.22	223/18		163/24
	O30400_ECOLI	28415	6.22	223/18		163/24
	O34615_ECOLI	28442	6.22	223/18		163/24
	O54657_ECOLI	28445	6.22	223/18		163/24
	O85608_ECOLI	29871	5.56	223/17	152/23	159/23
	AAB87032	29880	5.38	223/17		163/23
	AAB87035	29878	5.38	223/17		163/23
	AAF97988	29917	5.38	223/17		163/23
	AAF97989	29864	5.38	223/17		163/23
	AAF98000	29907	5.38	223/17		163/23
	AAF98001	29905	5.38	223/17		163/23
	AAF98001	29905	5.38	223/17		163/23
	Q9F6J0_ECOLI	30116	6.19			163/23
	Q9F6J2_ECOLI	30071	6.19			163/23
Q9KH80_ECOLI	29354	5.58			163/24	
AAB87034	29921	5.38			163/23	
AAC43730	29976	5.58			163/23	
AAC43733	29992	5.84			163/23	
AAC43734	29976	5.84			163/23	
AAC43744	29949	5.58			163/23	
AAC43745	29975	5.84			163/23	

Tabelle 122 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR,K K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.FFSQPLLLGK.N K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I	Q9KH77_ECOLI	29309	5.57	113/17		135/24
R.LQAFEGVVIAR.N R.VFQTHSPVVDSSISVK.R K.RLQAFEGVVIARNR.G	R5EC19	13125	10.62	69/23		
	RL19_ECO57	12994	10.62	69/23		
K.YIQFSDHIIAPR.K	Q8FGI5_ECOL6	24025	6.30	41/5		
	ABE07645	24833	6.41	41/5		
	A64962	24746	5.91	41/5		
	F85815	24676	6.11	41/5		
K.VIVEGINLVK.K K.EAAIQVSNVAIFNAATGK.A K.KHQKPVLPALNQPGGIVEK.E	R5EC24	11309	10.21		68/26	
	RL24_ECO57	11178	10.21		68/27	
K.GAVPGATGSDLIVKPAVK.A	R5EC3	22230	9.91	52/8		55/8
R.VIGAGQVYGLSAR.G R.GLAIDTALPSGEEFPR.F	ABE06654	58612	7.72		51/2	48/5
	S35417	57876	6.70		51/2	48/5
	F85666	57846	6.70		51/2	48/5
K.LVSSAGTGHFYTTTK.N	R5EC33	6368	10.25			49/27
	RL33_ECO57	6237	10.25			49/27
K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR,K K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.FFSQPLLLGK.N K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I	Q9K2L4_ECOLI	29295	5.57	113/18		144/24
	Q9L703_ECOLI	28428	6.95	113/18		144/24
	AAF98005	29890	5.84	113/17		144/23
	AAC43737	29975	6.24	113/17		144/23
	AAC43738	29975	5.84	113/17		144/23

Tabelle 123: in Fraktion 11 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.EAAIQVSNVAIFNAATGK.A K.KHQKPVLPALNQPGGIVEK.E	R5EC24	11309	10.21		50/17	
	RL24_ECO57	11178	10.21		50/17	
K.GAVPGATGSDLIVKPAVK.A	R5EC3	22230	9.91		46/8	
K.YIQFSDHIIAPR.K	Q8FGI5_ECOL6	24025	6.30		68/5	
	ABE07645	24833	6.41		68/5	
	A64962	24746	5.91		68/5	
	F85815	24676	6.11		68/5	

Tabelle 123 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/Sequenzabdeckung Messung 1	Score/Sequenzabdeckung Messung 2	Score/Sequenzabdeckung Messung 3
K.VAVLGAAGGIGQALALLK.T K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N R.KSIGTLSAFEQNALEGMLDTLK. K K.DIALGEEFVNK.- R.FGLSLVR.A R.KSIGTLSAFEQNALEGMLDTLK K.D K.SIGTLSAFEQNALEGMLDTLKK. D K.DIALGEEFVNK.- K.SIGTLSAFEQNALEGMLDTLK.K	DEECM	32317	5.61	700/62	533/40	597/48
K.VAVLGAAGGIGQALALLK.T K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N R.KSIGTLSAFEQNALEGMLDTLK. K K.DIALGEEFVNK.- R.FGLSLVR.A R.KSIGTLSAFEQNALEGMLDTLK K.D K.SIGTLSAFEQNALEGMLDTLKK. D K.DIALGEEFVNK.- K.SIGTLSAFEQNALEGMLDTLK.K	ABE09111	35036	6.03	700/58	533/38	597/45
K.VAVLGAAGGIGQALALLK.T K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N R.KSIGTLSAFEQNALEGMLDTLK. K K.DIALGEEFVNK.- R.FGLSLVR.A R.KSIGTLSAFEQNALEGMLDTLK K.D K.SIGTLSAFEQNALEGMLDTLKK. D K.SIGTLSAFEQNALEGMLDTLK.K	1EMD	32401	6.21	590/54	365/32	443/40
K.VAVLGAAGGIGQALALLK.T K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F OX R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N R.FGLSLVR.A	Q9F6J2_ECOLI	30071	6.19	560/55	273/31	335/40
K.VAVLGAAGGIGQALALLK.T K.TQLPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N R.FGLSLVR.A	CAA68326	32367	6.21		365/32	443/40
K.VAVLGAAGGIGQALALLK.T K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N R.FGLSLVR.A	Q9F6J7_ECOLI	30058	6.75	542/43	335/31	324/29
K.TQIPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N R.FGLSLVR.A	O85608_ECOLI	29871	5.56	533/49	387/43	388/41

Tabelle 123 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.TQIPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVLLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGGQGVVECAAYVEGGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N	Q9K2L4_ECOLI	29295	5.56	479/50		320/42
	Q9L703_ECOLI	28428	6.59	479/51		320/42
	AAF98005	29890	5.84	479/49		320/41
K.TQIPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVLLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.FFSQPLLLGK.N	Q9KH77_ECOLI	29309	5.57	476/42		322/34
K.AANGVFDDANVQNR.T K.YIQFSDHIIAPR.K	A64962	24746	5.91	66/6		
	F85815	24676	6.11	66/6		

Tabelle 124: in Fraktion 12 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.AANGVFDDANVQNR.T K.YIQFSDHIIAPR.K K.GYATDIEMIGIEDGIVEFHR.N	A64962	24746	5.91	137/12		59/9
	F85815	24676	6.11	137/12		59/9
	Q8FGI5_ECOL6	24025	6.30			59/9
K.GFSGEDATPALEGADVLLISAG VAR.K R.FFSQPLLLGK.N	Q9KH77_ECOLI	29309	5.57			54/12
K.GFSGEDATPALEGADVLLISAG VAR.K R.FFSQPLLLGK.N	Q9K2L4_ECOLI	29295	5.57			47/12
	Q9L703_ECOLI	28428	6.95			47/12
	AAC43737	29975	6.24			47/12
	AAF98005	29890	5.84			47/12
R.GFHEEPQVLHYDSR.E R.KDDTIPAIISHDE.-	DPECM	29312	5.64			38/5
	1MAT	29181	5.64			38/5
K.TGVSNTLENEFK.G K.SVANSQDIDLVDANAVAYNSS DVK.D	DNEC17	17677	9.69			35/22

Tabelle 123 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.TQIPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.ALQGEQGVVECAAYVEGDGQYA R.F R.FFSQPLLLGK.N	Q9K2L4_ECOLI	29295	5.56	479/50		320/42
	Q9L703_ECOLI	28428	6.59	479/51		320/42
	AAF98005	29890	5.84	479/49		320/41
K.TQIPSGSELSLYDIAPVTPGVAV DLSHIPTAVK.I K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.SDLFNVNAGIVK.N K.LFGVTTLDIIR.S K.RIQNAGTEVVEAK.A R.IQNAGTEVVEAK.A K.AGGGSATLSMGQAAAR.F R.FFSQPLLLGK.N	Q9KH77_ECOLI	29309	5.57	476/42		322/34
K.AANGVFDDANVQNR.T K.YIQFSDHIIAPR.K	A64962	24746	5.91	66/6		
	F85815	24676	6.11	66/6		

Tabelle 124 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.AGGGSATLSMGQAAAR.F K.DIALGEEFVNK.- K.GFSGEDATPALEGADVVLISAG VAR.K R.FFSQPLLLGK.N	DEECM	32317	5.61	39/8		57/11
	ABE09111	35036	6.03	39/8		57/11
	Q8G881_ECOLI	28023	6.22			57/12
	Q8GC64_ECOLI	28009	6.22			57/12
	Q9ETZ1_ECOLI	30099	6.19			57/11
	Q9ETZ7_ECOLI	30086	6.19			57/11
	Q9F6J0_ECOLI	30116	6.19			57/11
	Q9F6J1_ECOLI	30075	6.19			57/11
	Q9F6J2_ECOLI	30071	6.19			57/11
	Q9F6J3_ECOLI	30102	6.19			57/11
	Q9F6J4_ECOLI	30102	6.19			57/11
	Q9F6J5_ECOLI	30109	6.34			57/11
	Q9F6J6_ECOLI	30046	5.82			57/11
	Q9F6J7_ECOLI	30058	5.75			57/11
	Q9K2W1_ECOLI	28429	6.22			57/12
	Q9K327_ECOLI	29296	5.38			57/12
	Q9K329_ECOLI	29294	6.23			57/12
	Q9K339_ECOLI	29268	5.38			57/12
Q9KH80_ECOLI	29354	5.58			57/12	

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	Q9L702_ECOLI	28399	6.95			57/12
	Q549P8_ECOLI	29891	5.38			57/12
	O30398_ECOLI	28431	6.22			57/12
	O30399_ECOLI	28445	6.22			57/12
	O30400_ECOLI	28415	6.22			57/12
	O34615_ECOLI	28442	6.22			57/12
	AAC43730	29976	5.58			57/12
	AAC43733	29992	5.84			57/12
	AAC43734	29976	5.84			57/12
	AAC43744	29949	5.58			57/12
	AAC43745	29975	5.84			57/12
	O54657_ECOLI	28445	6.22			57/12
	O85608_ECOLI	29871	5.56			57/12
	AAB87032	29880	5.38			57/12
	AAB87034	29921	5.38			57/12
	AAB87035	29878	5.38			57/12
	AAF97988	29917	5.38			57/12
	AAF97989	29864	5.38			57/12
	AAF98000	29907	5.38			57/12
	AAF98001	29905	5.38			57/12

Tabelle 125: in Fraktion 13 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.GYATDIEMIGIEDGIVEFHR.N R.YLFECK.D K.YIQFSDHIIAPR.K	Q8FGI5_ECOL6	24025	6.30	139/18		68/5
	A64962	24746	5.91	139/17	75/6	68/5
	F85815	24676	6.11	139/17	75/6	68/5
	ABE07645	24833	6.41			68/5
K.GAVPGATGSDLIVKPAVK.A K.GAVPGATGSDLIVKPAVKA.-	R5EC3	22230	9.91		77/9	

Tabelle 126: in Fraktion 14 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
KAANGVFDDANVQNR.T K.GYATDIEMIGIEDGIVEFHR.N R.YLFECK.D R.YLFECKDPESK.A	A64962	24746	5.91	127/20	45/9	107/15
	F85815	24676	6.11	125/20	45/9	107/15

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	Q8FGI5_ECOL6	24025	6.30		45/9	
K.VDVTGTSK.G K.GAVPGATGSDLIVKPAVK.A	R5EC3	22230	9.91	52/12		
K.EAAIQVSNVAIFNAATGK.A	R5EC24	11309	10.21		68/17	
	RL24_ECO57	11178	10.21		68/17	

Tabelle 127: in Fraktion 15 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.AANGVFDDANVQNR.T K.GYATDIEMIGIEDGIVEFHR.N K.YIQFSDHIIAPR.K	A64962	24746	5.91	69/6	181/15	157/12
	F85815	24676	6.11	69/6	181/15	157/12
K.AFNEMQPIVDR.Q K.ANLTAQINK.L	R3EC20	9678	11.18	44/22		
	RS20_ECO57	9547	11.18	44/23		
	AAA24604	9763	11.39	44/22		
R.IEPIALFSDLDGSIDAR.E K.VVGGAAAGLIEEVAASK.I	Q8FJ35_ECOL6	41137	5.03			90/9
	ABE06565	41125	5.03			90/9
	H64843	41112	4.98			90/9
	H90786	41098	4.97			90/9

Tabelle 127 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
R.GLAQGTDVSVFSGFGLK.A	R5EC16	15271	11.22		41/11	

Tabelle 128: in Fraktion 16 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
R.LQNADLVVWVGPEMEAFMQKP VSK.L K.QVTIAQLEDVKPLLK.S K.SIHGDDDDHDHAEK.S K.SDEDDHHGDFNMHLWLSPEIA R.A K.LVELMPQSR.A K.QFGLTPLGHFTVNPEIQGAQR. L K.ATCVFAEPQFRPAVSVAR.G R.MGTLDPGNTIK.L K.GYFVFHDAYGYFEK.Q R.LQNADLVVWVGPEMEAFMQKP VSK.L (20x)	A64948	35862	5.80	222/42	296/41	403/48
	AAC74927	33756	5.61	222/44	296/44	403/50
K.EAALVHEALVAR.G R.GLETPLRPPVHEMDNETR.K K.MYVDEIFSGLDYANFPK.I	Q8CVZ4_ECOL6	38735	6.16		294/38	
	1A8RA	24634	6.88	172/21	105/13	90/13
	1A9CA	24668	6.93	172/21	105/13	90/13

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	GCH1_ECO57	24684	6.93	172/21	105/13	90/13
	E91009	24815	6.79	172/21	105/13	90/13
K.AANGVFDDANVQNR.T R.YLFECK.D K.YIQFSDHIIAPR.K K.GYATDIEMIGIEDGIVEFHR.N	A64962	24746	5.91	150/14	96/9	166/15
	F85815	24676	6.11	148/14	94/4	166/15
K.NPAADKVVNTINTTSVDTNHAE R.D K.TDLGPASQEVLDIISVEGVQQK.-	E64848	20900	5.57	95/23	36/12	
K.LNIDQNPGTAPK.Y R.GIPTLLLFK.N K.IIHLTDDSFDTDLV.K.A	1T7PB	11395	4.81	76/20	145/34	108/25
	1THO	11824	4.83	76/20	145/33	108/24
	1TXXA	11799	4.67	76/19	145/33	108/25
	2TIR	11669	4.47	76/19	145/33	108/25
	THIO_ECO57	11668	4.67	76/19	145/33	108/25
	ABE09756	15984	5.11	76/14	145/55	108/18
	AAA24696	11886	4.67	76/19	145/32	108/24
	S35497	11799	4.67	76/19	145/33	108/24
B91218	14026	5.25	76/16	145/28	108/21	
K.EAALVHEALVAR.G K.SLIAGHMTIEMQLNLDLADDSL METRHR.I (Ox)	S29895	24858	6.79		75/18	
K.IIHLTDDSFDTDLV.K.A	1SRX1	4548	4.14		66/36	50/36

Tabelle 129: in Fraktion 17 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
R.LQNADLVVWVGPEMEAFMQKP VSK.L K.QVTIAQLEDVKP LLMK.S K.SIHGDDDDHDHAEK.S K.SDEDHHHGDFNMHLWLSPEIA R.A K.LVELMPQSR.A K.LDANLKDFAQLASTETQVGNE LAPLK.G K.GYFVFHDAYGYFEK.Q K.QFGLTPLGHFTVNPEIQGAQR. L K.ATCVFAEPQFRPAVSVAR.G R.MGTLDP LGTNIK.L R.LQNADLVVWVGPEMEAFMQKP VSK.L K.DFEAQLASTETQVGNELAPLKG K.G K.QVTIAQLEDVKP LLMK.S (Ox) K.SDEDHHHGDFNMHLWLSPEIA R.A (Ox)	A64948	35862	5.80	285/54	455/53	219/35
R.LQNADLVVWVGPEMEAFMQKP VSK.L K.QVTIAQLEDVKP LLMK.S K.SIHGDDDDHDHAEK.S K.SDEDHHHGDFNMHLWLSPEIA R.A K.LVELMPQSR.A K.GYFVFHDAYGYFEK.Q K.QFGLTPLGHFTVNPEIQGAQR. L K.ATCVFAEPQFRPAVSVAR.G R.MGTLDP LGTNIK.L K.QVTIAQLEDVKP LLMK.S (Ox) K.SDEDHHHGDFNMHLWLSPEIA R.A (Ox)	AAC74927	33756	5.61	285/58	455/57	219/37
R.LQNADLVVWVGPEMEAFMQKP VSK.L K.QVTIAQLEDVKP LLMK.S K.SIHGDDDDHDHAEK.S K.SDEDHHHGDFNMHLWLSPEIA R.A K.LVELMPQSR.A K.GYFVFHDAYGYFEK.Q K.QFGLTPLGHFTVNPEIQGAQR. L K.ATCVFAEPQFRPAVSVAR.G R.MGTLDP LGTNIK.L K.QVTIAQLEDVKP LLMK.S (Ox) K.SDEDHHHGDFNMHLWLSPEIA R.A (Ox)	Q8CVZ4_ECOL6	38735	6.16	265/43		194/33

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

K.AANGVFDDANVQNR.T K.GYATDIEMIGIEDGIVEFHR.N K.YIQFSDHIIAPR.K K.TFAEIKDYHKG	A64962	24746	5.91	176/21	202/17	83/6
	F85815	24676	6.11	176/21	202/17	83/6
K.EAALVHEALVAR.G R.GLETPLRPPVHEMDNETR.K R.GLETPLRPPVHEMDNETRK.S K.MYVDEIFSGLDYANFPK.I	1A8RA	24634	6.88	191/21	68/15	39/8
	1A9CA	24668	6.93	191/21	68/15	39/8
	GCH1_ECO57	24684	6.93	191/21	68/15	39/8
	E91009	24815	6.79	191/21	68/15	39/8
K.MMTMLDPANAERY	Q2MAM1_ECOLI	19523	6.06	46/7		
	ABE08043	20225	5.86	46/7		
	AAN81289	22855	7.10	46/6		
	B91026	20213	5.86	46/7		

Tabelle 130: in Fraktion 18 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.AANGVFDDANVQNR.T R.YLFECKDPESK.A R.TLSDWDGWWQSVYPLLQSGK.L K.YIQFSDHIIAPR.K	A64962	24746	5.91	97/11	46/14	84/16
	F85815	24676	6.11	97/11	46/14	84/16
	Q8FGI5_ECOL6	24025	6.30		46/14	
	ABE07645	24833	6.41		46/14	
R.GLAQGTDVVSFGSFLK.A	R5EC16	15271	11.22	43/11		
K.IAAANVPAFVSGK.A	DNECS2	9529	9.57		55/14	
K.AFNEMQPIVDR.Q	R3EC20	9678	11.18		39/12	
	RS20_ECO57	9678	11.18		39/12	
	AAA24604	9678	11.18		39/12	

Tabelle 131: in Fraktion 19 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung	Score/ Sequenzabdeckung	Score/ Sequenzabdeckung

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

		[Da]		Messung 1	Messung 2	Messung 3
K.AANGVFDDANVQNR.T K.YIQFSDHIIAPR.K	A64962	24746	5.91	130/12	79/12	
	F85815	24676	6.11	130/12	79/12	
-MLYVIYAQDK.A R.LQLLHDEGR.L K.RLSVRPAHLAR.L R.LSVRPAHLAR.L	T45506	10595	5.19	58/19	38/21	
K.AAYSSGKPAIGVGAGNTPVVID ETADIKR.A R.ILINTPASQGGIGDLYNFK.L R.FATHGGYLLQGK.E K.NGALNAAIVGQPAYK.I	DEEC	96067	6.32	65/5	43/3	90/6
	Q8FHX2_ECOL6	96109	6.32	65/5	43/3	90/6
	ADHE_ECO57	95936	6.33	65/5	43/3	90/6
	ABE06918	96097	6.32	65/5	43/3	90/6
	D85704	96107	6.32	65/5	43/3	90/6
K.AFNEMQPIVDR.Q	R3EC20	9678	11.18	43/12	60/12	
	RS20_ECO57	9547	11.18	43/12	60/12	
	AAA24604	9763	11.39	43/12	60/12	
R.TSEDINDALNYR.T	FOLX_ECO57	13942	6.58	41/10		87/10
	C91027	14073	6.51	41/10		87/10

Tabelle 132: in Fraktion 20 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
R.HPLVMGNWK.L K.TQGAAAFEGAVIAYEPVWAIGT GK.S R.EAEGSHIMLGAQNVLDNLSGAF TGETSAAMLK.D K.DIGAQYIIIGHSER.R	ISECT	26955	5.64	86/12		104/18
	1TMHA	27070	5.49	86/12		104/18
	1TREB	26755	5.77	86/13		
	CAA25253	26954	5.77	86/13		
K.KLTPEAQEQIK.T K.TLLQYSPSSTNSQPWFIVAST EEGK.A K.GYTSLVWVPVGHHSVEDFNATL PK.S	CAJ15092	27919	6.52	78/23	52/14	37/13
	I67685	23890	5.80	78/28	52/14	37/16
	H90705	23844	5.80	78/28	52/14	37/16
	Q8FK33_ECOL6	23978	5.50	78/28	52/14	37/16
R.ILINTPASQGGIGDLYNFK.L K.AAYSSGKPAIGVGAGNTPVVID ETADIKR.A	DEEC	96067	6.32	64/2	46/3	49/2
	Q8FHX2_ECOL6	96109	6.32	64/2	46/3	49/2
	ADHE_ECO57	95936	6.33	64/2	46/3	49/2
	ABE06918	96097	6.32	64/2	46/3	49/2
	D85704	96107	6.32	64/2	46/3	49/2
K.IAAANVPAFVSGK.A	DNECS2	9529	9.57	39/14		39/14
K.DLVESAPAALK.E K.EGVSKDDAEALKK.A	1CTF	6928	5.10		66/52	

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

K.ALEEAGAEVEVK.-	R5EC7	12288	4.60		66/29	
	RL7_ECO57	12156	4.60		66/30	
K.AANGVFDDANVQNR.T	A64962	24746	5.91	36/6		64/6
	F85815	24676	6.11	36/6		64/6
R.HGYAFNELDLGK.R	YIFE_ECO57	12994	6.13		58/10	
	AAA67568	16315	10.05		58/8	
	C91216	13125	6.10		58/10	
K.AFNEMQPIVDR.Q	R3EC20	9678	11.18		55/12	
	RS20_ECO57	9547	11.18		55/12	
	AAA24604	9763	11.39		55/12	
-MLKNNITTHVITRR.M (Ox) K.VAVVVGAMSGPVAQYGDQFEFTG AEQAVADINAK.G	BLEC	41300	6.55		42/11	
R.GLAQGTDVSVFSGFGLK.A	R5EC16	15271	11.22			67/11
K.VANLGS�GDQVNVK.A K.AAYSSGKPAIGVAGNTPVVID ETADIKR.A	R5EC9	15759	6.17			50/9
	Q8FHX2_ECOL6	96109	6.32	64/2	46/3	49/2
	ADHE_ECO57	95936	6.33	64/2	46/3	49/2
	ABE06918	96097	6.32	64/2	46/3	49/2
	D85704	96107	6.32	64/2	46/3	49/2
K.IAAANVPFVSGK.A	DNECS2	9529	9.57	39/14		39/14

Tabelle 133: in Fraktion 21 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.VANLGS�GDQVNVK.A R.DIADAVTAAGVEVAK.S R.TTGEHEVSVFQVHSEVFAK.V R.NFLVPQGK.A	R5EC9	15759	6.17	200/31	191/36	92/26
R.EAEGSHIMLGAQNVNLDNL.SGAF TGETSAAMLK.D K.DIGAQYIIIGHSER.R K.TQGAAAFEGAVIYEPVWAIKT GK.S K.EQGLTPVLCIGETEAEENAGKT EEVCAR.Q R.HMVHELVSNLK.R (Ox) R.HMVHELVSNLK.E	ISECT	26955	5.64	163/27	215/25	87/25
	1TMHA	27070	5.49	163/27	215/25	87/25
K.VAVVVGAMSGPVAQYGDQFEFTG AEQAVADINAK.G K.ENIDFVYYGGYHPQMQLR.Q K.TQFMGPEGVANVLSNIAGESA EGLLVTKPK.N	BLEC	41300	6.55	115/21		60/8
	2LIV	36722	5.28	115/24		60/9
	Q2M7C3_ECOLI	39052	5.54	115/22		60/8
	ABE09398	41277	6.34	115/21	36/11	60/8
	AAA24075	39022	5.54	115/22		60/8
	E91167	41286	6.25	115/21		60/8
R.EAEGSHIMLGAQNVNLDNL.SGAF TGETSAAMLK.D K.DIGAQYIIIGHSER.R K.TQGAAAFEGAVIYEPVWAIKT GK.S	1TREB	26755	5.77	163/27	215/26	87/25

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

K.EQGLTPVLCIGETEAEAGKT EEVCAR.Q R.HMVHELVSNL.R.K (Ox) R.HMVHELVSNL.R.K.E	CAA25253	26954	5.77	163/27	215/25	87/25
K.EGVSKDDAEALKK.A K.ALEEAGAEVEVK.-	1CTF	6928	5.10	116/36		
	R5EC7	12288	4.60	116/20		
	RL7_ECO57	12156	4.60	116/20		
K.VINDNFGIIEGLMTTVHATTATQ K.T R.GASQNIIPSSSTGAAK.A R.VPTPNVSVWDLTV.R.L	1GAEO	35366	6.58	53/7	84/8	67/4
	DEECG3	35510	6.61	53/7	84/8	67/4
	G3P1_ECO57	35379	6.58	53/7	84/8	67/4
	Q6WAN9_ECOLI	23218	8.79	53/10	84/13	67/6
	Q6WAP3_ECOLI	29405	5.45	53/8	53/10	53/5
	Q9K2R9_ECOLI	23623	7.14	53/10	84/13	67/6
	Q9L704_ECOLI	23683	7.14	53/10	84/13	67/6
	ABE07451	35933	6.33	53/7	84/8	67/4
	AAA23838	33012	6.27	53/7	84/9	67/4
	AAA23844	32962	6.27	53/7	84/9	67/4
	AAA23846	32954	6.60	53/7	84/9	67/4
	AAA23847	33070	6.02	53/7	84/9	67/4
AAC43271	33507	6.27	53/7		67/4	

Tabelle 134: in Fraktion 22 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/Sequenzabdeckung Messung 1	Score/Sequenzabdeckung Messung 2	Score/Sequenzabdeckung Messung 3
R.VTAERDPANLK.W K.WDEVGVDDVVAEATGLFLTDETA R.K K.YAGQDIVSNASCTTNCLAPLAK. V K.VINDNFGIIEGLMTTVHATTATQ K.T R.GASQNIIPSSSTGAAK.A K.VLPELNGK.L K.GVLGYTEDDVVSTDFNGEVCTS VFDAAK.A K.AGIALNDNFVK.L K.LVSWYDNETGYSNK.V K.DNTPMFVK.G K.VINDNFGIIEGLMTTVHATTATQ K.T	ABE07451	35933	6.33	412/46	254/23	204/21
	AAC43271	33507	6.27	412/49	254/25	
	DEECG3	35510	6.61	410/46	252/24	204/21
	G3P1_ECO57	35379	6.58	410/46	252/24	204/21
K.HIAMHVAASKPEFIKPEDVSAEV VEK.E	EF ECS	30404	5.22		40/9	
	EFTS_ECO57	30273	5.22		40/9	
K.VAVVGAMSGPVAQYGDQFTG AEQAVADINAK.G R.GYQLILR.T R.TTGLDSDQGPTAAK.Y K.KGNANVVFFDGITAGEK.D K.KGNANVVFFDGITAGEKDFSTL VAR.L K.GNANVVFFDGITAGEK.D K.DFSTLVAR.L	BLEC	41300	6.55	746/51	683/52	704/47
	2LIV	36722	5.28	746/57	683/59	704/53

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

K.ENIDFVYGGYHPMEGQILR.Q K.TQFMGPEGVANVLSNIGESA ELLLVTKPK.N K.NYDQVPANKPIVDAIK.A K.QDPSGAFVWTTYAALQSLQAG LNQSDDPAEIAK.Y K.GFEFGVFDWHANGTATDAK.- K.YVIGHLCSSSTQPASDIYEDEGI LMITPAATAPELTAR.G K.GNANVVFFDGITAGEKDFSTLV AR.L K.ANSVDVTMGLTWDEK.G K.YILEK.V K.TQFMGPEGVANVLSNIGESA ELLLVTKPK.N (Ox) K.KQDPSGAFVWTTYAALQSLQA GLNQSDDPAEIAK.Y K.ANSVDVTMGLTWDEK.G (Ox)	Q2M7C3_ECOLI	39052	5.54	746/53	683/55	704/50
	ABE09398	41277	6.34	746/51	683/52	704/47
	AAA24075	39022	5.54	746/53	683/55	704/50
	E91167	41286	6.25	746/51	683/52	704/47

Tabelle 135: in Fraktion 23 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
R.SDIEIVAINDLLDADYMAFMLK.Y K.DGHLIVNGK.K R.VTAERDPANLKWDEVGVDVVA EATGLFLTDEETAR.K K.WDEVGVDVVAEATGLFLTDETA R.K K.DNTPMFVK.G K.YAGQDIVSNASCTTNCLAPLAK. V K.VLDAAVAGKITDVEVLK.A R.VAALEGDVLGSYQHGAR.I K.EHNAEVTGFIR.F	EFECS	30404	5.22	412/34	442/31	49/7
	EFTS_EC057	30273	5.22	412/34	442/31	49/7

Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke. (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.QILTAEAVEFLTELVTHTFPQR.N R.IQQQQDIDNGTLPDFISETASIR. D R.GAFAMGGMAAFIPSKDEEHNN QVLNK.V	D91245	60238	5.39	80/13		
	SYECMA	60236	5.39	79/13		
K.VAVVGAMSGPVAQYGDQEFETG AEQAVADINAK.G K.ENIDFVYGGYHPMEGQILR.Q K.TQFMGPEGVANVLSNIGESA ELLLVTKPK.N K.NYDQVPANKPIVDAIK.A K.GFEFGVFDWHANGTATDAK.-	BLEC	41300	6.55	222/30	88/16	
	2LIV	36722	5.28	222/34	88/18	
	Q2M7C3_ECOLI	39052	5.54	222/32	88/17	
	ABE09398	41277	6.34	222/30	88/16	122/20
	AAA24075	39022	5.54	222/32	88/17	
	E91167	41286	6.25	222/30	88/16	
-.MQQLQNIETAFER.R R.EAVNQVIALDLSGALR.V R.ETGEIHYGR.V K.FADYDEAR.F	XNECSD	29873	5.56	175/14	92/8	109/12
	ABE05690	29872	5.76	175/14	85/8	96/12
	AAN78695	29829	5.56	175/14		
	H85500	29859	5.55		92/8	
K.YSDNGSTLSAVNPFVSLPLHG GR.R R.GIPVFNAPFSNTR.S K.EISLMKPGSLLINASR.G	DEECPG	44148	5.92	58/5	113/12	93/9
	1PSDA	43519	5.83	58/5	113/13	93/9

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	SERA_ECO57	44017	5.93	58/5	113/12	93/9
K.AVGWAAALQYVQPGTIVGVGTG STAAHFIDALGTMK.G	CAA47309	24247	5.54	46/15		
	A98102	22846	5.20	46/15		
	ABE08748	25585	5.38	44/14		
R.SDIEIVAINDLLDADY MAYMLK.Y K.DGHLIVNGK.K R.VTAERDPANLKWDEVGVDDVA EATGLFLTDETA.R.K K.WDEVGVDDVAEATGLFLTDETA R.K K.DNTPMFVK.G K.YAGQDIVSNASCTTNCLAPLAK. V K.VINDNFGIIEGLMTTVHATTATQ K.T K.VINDNFGIIEGLMTTVHATTATQ K.T (OX) R.GASONIIPSSSTGAAK.A K.VLPELNGK.L R.VPTPNVSVVDLTVR.L K.GVLGYTEDDVVSTDFNGEVCTS VFDAK.A K.AGIALNDNFVK.L K.VLDLIAHISK.- K.YDSTHGRFDGTVEVK.D K.DGHLIVNGK.K.I R.VTAERDPANLKW K.KVVMTPGSK.D K.KVVMTPGSKDNTPMFVK.G K.VVMTPGSKDNTPMFVK.G K.TVDGSPSHKDW.R.G R.SDIEIVAINDLLDADY MAYMLK.Y (2Ox) R.FDGTVEVK.D K.LTGMAFR.V K.AATYEQIK.A K.LVSWYDNETGYSNK.V	ABE07451	35933	6.33	753/61	638/58	560/50
	1GAEO	35366	6.58	751/61	638/59	
	DEECG3	35510	6.61	751/61	638/59	559/51
	G3P1_ECO57	35379	6.58	751/61	638/59	559/51
	R.EIEEGLINQILDV.R.E	RNECO	10230	4.87		61/16
-SKIFDFVKPGVITGDDVQK.V K.VKAPVIVQFSNGGASFIAGK.G R.FTIAASFGNVHGVYKPGNVVLT PTILR.D	1B57A	37792	5.74			71/19
	ADEC2A	39123	5.52			71/18
	ALF_ECO57	38992	5.52			71/18

Tabelle 136: in Fraktion 24 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theo- retische Masse [Da]	theo- retischer pI-Wert	Score/ Sequenz- abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz- abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz- abdeckung Messung 3
M.TEQATTDELAFTRPYGEQEK. Q K.QILTAEAVEFLTELVTHTFPQR.N R.IQQQDIDNGTLPDFISETASIR. D K.VFMADFEDSLAPDWNK.V R.GAFAMGGMAAFIPSKDEEHNN QVLNK.V R.RVEITGPVER.K R.QAVTMDKPFNLNAYS.R.L	SYECMA	60236	5.39	193/20	89/8	36/4
	Q8FB63_ECOL6	60953	5.52		89/8	36/4
	ABE09981	61018	5.45		89/8	36/4
	D91245	60238	5.39			36/4
R.VTAERDPANLKW K.VINDNFGIIEGLMTTVHATTATQ K.T K.LTGMAFR.V K.VLDLIAHISK.- K.VINDNFGIIEGLMTTVHATTATQ K.T (OX) R.GASONIIPSSSTGAAK.A	1GAEO	35366	6.58	127/15	145/13	153/18
	DEECG3	35510	6.61	127/15	145/13	153/18
	G3P1_ECO57	35379	6.58	127/15	145/13	153/18
	ABE07451	35933	6.33	127/15	145/13	153/17
-MRSKYMAVTK.L R.HGESQWNKENR.F R.RGFAVTPPELTK.D K.DDERYPGHDP.R.Y R.VIPYWNETILPR.M	ABE06238	29204	6.27	113/21		

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

R.GNPTVEAEVHLEGGFVGMAAA PSGASTGSR.E K.AVAAVNGPIAALIGK.D K.IMIDLDTGNTENK.S K.FGANAILAVSLANAK.A K.GMPLYEHIAELNGTPGK.Y R.MGSEVFHHLAK.V K.GMNTAVGDEGGYAPNLGSNAE ALAVIAEAVK.A K.GMNTAVGDEGGYAPNLGSNAE ALAVIAEAVK.A (Ox) K.AFTSEEFTHFLEELTK.Q K.QYPVISEDGLDESDWDGFAYQ TK.V K.IQLVGGDDLFTVNTK.I K.ILKEGIEK.G K.GIANSILIK.F K.DAGYTAVISHR.S R.SGETEDATIADLAVGTAAGQIK. T K.YNQLIR.I R.GNPTVEAEVHLEGGFVGMAAA PSGASTGSR.E (Ox) K.IMIDLDTGNTENK.S (Ox) K.GMPLYEHIAELNGTPGK.Y (Ox) K.FNQIGSLTETLAAIK.M K.YVLAGEGNK.A	NOEC	45626	5.32	649/55	787/51	715/49
	ENO_ECO57	45495	5.32	649/55	787/51	715/49
	H85928	45574	5.32	649/55	787/51	715/49
R.FGGQILDVTDIENYISVPK.T R.KPSFLITNPGSNQGR.F	AAC73707	56142	5.47	95/3		
	Q8FK08_ECOL6	57395	5.55	95/3		
	A85560	57366	5.48	94/3		
K.AANANVFFDGITAGEK.D K.TQFMGPEGVGNASLSNIAGDAA EGMLVTMPK.R (Ox) K.GDFGVFQWHADGSSTAAK.-	BLECL	39354	5.49	77/18		
	Q8CVL8_ECOL6	41600	5.85	77/17		
	ABE09394	41601	5.58	77/17		
	AAA83883	39282	5.37	77/18		
R.IILIHADHEQNASTSTVR.T	A86013	39336	5.49	77/18		
	YKEC	47984	6.21	62/4		
	AAA23892	48032	6.21	62/4		
	H85572	47934	6.15	62/4		
	A99722	47951	6.15	62/4		

Tabelle 136 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
-MNIRPLHDR.V K.SAGGIVLTGSAAAK.S	BVECGS	10381	5.15		63/23	
	CAA30738	10408	5.15		63/23	
R.RGFAVTPPELTK.D R.VIPYWNETILPR.M R.VIAAHGNSLR.A R.YYLGNADEIAAK.A K.ELPLTESLALTIDR.V	GPMA_ECO57	28408	5.86		162/18	133/10
	ABE06238	29204	6.27		162/18	133/10
	H85577	28539	5.85		162/18	133/10
K.YAEGYPGKR.Y K.LYNIVPYGIDATGHIDYADLEK.Q	XYECS	45288	6.03		48/7	
	1DFOA	45157	6.03		48/7	
	ABE08330	45575	6.13		48/7	
	A91056	45316	6.03		48/7	
K.ENNFALPAVNCVGTDSINAVLE TAAK.V R.FTIAASFNGVHVYKPGNVVLT PTILR.D K.KHNLPHNSLNFVFGGSGSTA QEIK.D	1B57A	37792	5.74			133/22
	ADEC2A	39123	5.52			133/21
	Q8FE53_ECOL6	42672	5.92			133/20
	ALF_ECO57	38992	5.52			133/21

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	ABE08756	42684	5.92			133/20
	G85948	42357	6.02			133/20
R.AIDKPFLLLPIEDVFSISGR.G	EFFECT	43286	5.30			44/4
	EFFECTA	43256	5.30			44/4
	1DG1G	42150	5.22			44/4
	1EFCA	42251	5.22			44/4
	1EFUA2	36430	4.98			44/5
	EFTU_ECO57	43155	5.30			44/4
	ABE09270	44852	5.25			44/4
	AAN82549	44822	5.25			44/4
	D86089	43189	5.24			44/4
EF ECS	30404	5.22			44/4	

Tabelle 137: in Fraktion 25 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
R.HGESQWNKENR.F R.HYGALQGLNK.A R.GFAVTPPELTK.D K.DDERYPGHDPR.Y K.ELPLTESLALTIDR.V R.VIIAAHGNSLR.A R.YYLGNADEIAAK.A	GPMA_ECO57	28408	5.86	205/22		193/17
	H85577	28539	5.85	205/22	360/40	193/17
	ABE06238	29204	6.27	203/22		191/17

Tabelle 137 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
-.SQTVHFQGNPVTVANSIPQ AGSK.A K.DLSDVTLGGFAGK.R K.VLNIFPSIDTGVCAASV.R -.SQTVHFQGNPVTVANSIP QAGSK.A	TPX_ECO57	17693	4.75	159/32	158/21	133/21
	B85752	17824	4.75	159/32	158/21	133/21
	AAC43517	17884	4.75		158/21	133/21
R.GNPTVEAEVHLEGGFVGMAAA PSGASTGSR.E K.IMIDL DGTENK.S K.GMPLYEHIAELNGTPGK.Y R.MGSEVFHHLAK.V K.GMNTAVGDEGGYAPNLGSNAE ALAVIAEAVK.A K.AFTSEEFTHFLEELTK.Q K.FNQIGSLTETLAAIK.M K.DAGYTAIVISHR.S K.YNQLIR.I K.FGANAILAVSLANAK.A K.IQLVGGDDL FVTNTK.I K.GMNTAVGDEGGYAPNLGSNAE ALAVIAEAVK.A (Ox)	NOEC	45626	5.32	439/34	465/33	424/35
	ENO_ECO57	45495	5.32	439/34	465/33	424/35
	H85928	45574	5.32	439/34	465/33	424/35
R.REEESAAAAEVEER.T R.EEESAAAAEVEER.T	HNS_ECO57	15399	5.43	144/10		44/9
	CAA47740	15274	5.24	144/10		44/9

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	B85704	15530	5.43	144/10		44/9
K.TVINFDNIIAAGSRPIQLPFIPHE DPR.I K.VIPSIAYTEPEVAWVGLTEK.E K.GISYETATFPWAASGR.A	DEECLP	50657	5.79	97/13		
	DLDH_ECO57	50526	5.79	97/13		
	ABE05639	53096	6.01	97/12		
	CAA24742	50788	5.79	97/13		
	E974128	50369	5.71	97/13		
R.AFDQIDNAPEEK.A R.TTDVGTGTEIPEGVEMVMPGDN IK.M K.NMITGAAQMDGAILVVAATDGP MPQTR.E K.GYRPOFYFR.T R.TKPHVNVGTIGHVDHGK.T K.TTLTAAITTVLAK.T R.AIDKPFLLPIEDVFSISGR.G	EFFECT	43286	5.30	92/9	78/12	140/12
	EFFECTA	43256	5.30	92/9	78/12	140/12
	1DG1G	42150	5.22	92/9	78/12	
	1EFCA	42251	5.22	92/9	78/12	140/12
	EFTU_ECO57	43155	5.30	92/9	78/12	140/12
	ABE09270	44852	5.25	92/8	78/11	140/11
	AAN82549	44822	5.25	92/8	78/11	140/11
K.ISELSEQIDTLR.D	D86089	43189	5.24	92/9		140/12
	R3EC13	13091	10.78			52/11
	RS13_ECO57	12960	10.78			52/11
K.TVYSTENPDLLVLEFR.N	ABE08263	27350	5.16			50/6
	C36146	26978	5.07			50/6

Tabelle 138: in Fraktion 26 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
-.SQTVHFQGNPVTVANSIP QAGSK.A K.DLSDVTLGGQFAGK.R R.NAEFLQAYGVAIADGPLK.G	TPX_ECO57	17693	4.75	303/32	240/32	164/26
	AAC43517	17884	4.75	303/32	240/32	164/26
	B85752	17824	4.75	303/32	240/32	164/26
R.HGESQWNKENR.F R.HYGALQGLNK.A R.GFAVTPPELTK.D R.YYLGNADEIAAK.A K.DDERYPGHDPY.Y K.ELPLTESLALTIDR.V	GPMA_ECO57	28408	5.86	230/22		267/32
	H85577	28539	5.85	230/22	349/40	267/32
	ABE06238	29204	6.27	229/21		266/31
K.LYQPQDATTNPSLILNAAQIPEY R.K K.LYQPQDATTNPSLILNAAQIPEY RK.L R.LSYDTEASIAK.A R.KLSYTGVEVK.A R.ITESEFLWQHNDQPMVAVDK.L K.LYNDAGISNDR.I	TALB_ECOL6	35052	5.10	147/20	243/20	172/14
	TALB_ECO57	35066	5.10	147/20	243/20	172/14
	ABE05519	37447	5.29	147/18	243/19	172/13
	S40535	35197	5.11	147/20	243/19	172/14
	1UCWA	35049	5.03	147/20	243/20	172/14
R.GNPTVEAEVHLEGGFVGMAAA PSGASTGSR.E R.SGETEDATIADLAVGTAAGQIK. T K.IMIDLQGTENK.S	NOEC	45626	5.32	130/12	465/33	
	ENO_ECO57	45495	5.32	130/12	465/33	

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

K.FGANAILAVSLANAK.A K.GMPLYEHIAELNGTPGK.Y K.GMNTAVGDEGGYAPNLGSNAE ALAVIAEAVK.A K.IQLVGGDLFVNTTK.I K.FNQIGSLTETLAAIK.M	CAA57795	46417	5.56	130/12		
	H85928	45574	5.32	130/12	465/33	
-MQQLQNIETAFER.R	XNECSD	29873	5.56	61/5	39/5	
	ABE05690	29872	5.76	61/5	39/5	
	AAA23667	30020	5.57	61/5	39/5	
	AAN78695	29829	5.56	61/5	39/5	
	CAA79888	1876	5.91	61/93	39/93	
	H85500	29859	5.55	61/5		
R.REEESAAAAEVEER.T R.EMLIADGIDPNELLNSLAAVK.S R.EMLIADGIDPNELLNSLAAVK.S (Ox)	HNS_ECO57	15399	5.43	135/25	176/25	128/25
	CAA47740	15274	5.24	135/25	176/25	128/25
	B85704	15530	5.43	135/25	176/25	128/25
K.VKAPVIVQFSNGGASFIAGK.G K.IFDVFKPGVITGDDVQK.V	1B57A	37792	5.74	83/5		
	1DOSA1	11156	6.93	83/18		
	1ZEN1	18766	5.87	83/11		
	ADEC2A	39123	5.52	83/5		
	Q8FE53_ECOL6	42672	5.92	83/5		
	ALF_ECO57	38992	5.52	83/5		
	ABE08756	42684	5.92	83/5		
K.DKPEDAVLDVQGIATVTPAIVQA CTQDK.Q K.VKGEWDK.I	G85948	42357	6.02	83/5		
	1BG8A	8348	4.59	59/46	66/46	55/36
	1DJ8A	8718	4.98	59/44	66/44	55/35
	Q8CVL2_ECOL6	11823	5.39	59/31	66/31	55/25
	S30268	11850	5.06	59/31	66/31	55/25

Tabelle 138 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.GVNLPGVSIAPALAEK.D R.KYFPDAILALTTNEK.T R.LNFSHGDYAEHGQR.I K.AHGGENIHISK.I R.GDLGVEIPVEEIVFAQK.M	Q8FH56_ECOL6	58651	6.66	40/6	86/7	110/6
	ABE07344	58665	6.66	40/6	86/7	110/6
	AAA24392	50276	5.77	40/7	86/9	110/7
	D64925	50697	5.77	40/7	86/9	110/7
	1PKYA1	37313	5.22		86/12	
K.NIANPIAQLSLALLLR.Y	LEU3_ECO57	39359	5.14			64/4
	LEU3_ECOL6	39375	5.14			64/4
	LEU3_ECOLI	39361	5.14			64/4
	BAA04537	39492	5.14			64/4
	ABE05590	39607	5.14			64/4
	A64729	39623	5.14			64/4
	AAN78586	39637	5.14			64/4
E85489	39621	5.14			64/4	
R.THAPVDFDTAVASTITSHDAGYI NK.Q	PFLB_ECOLI	85172	5.69			46/3
	1CM5A	85108	5.69			46/3

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	S01788	85303	5.69			46/3
	H85615	85296	5.69			46/3
R.LLAEHNLDASAIK.G	XUECSD	43984	5.58			44/3
	1BAL	5497	6.07			44/25
	1BBL	3992	8.59			44/35
	ODO2_ECO57	43853	5.57			44/3
	Q8FJT8_ECOL6	44014	5.58			44/3
	ABE06215	44010	5.58			44/3

Tabelle 139: in Fraktion 27 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.IFDVFKPGVITGDDVQK.V K.VKAPVIVQFSNGGASFIAGK.G R.FTIAASFGNVHGVIKPGNVVLT PTILR.D	1B57A	37792	5.74	148/18	59/7	
	ADEC2A	39123	5.52	148/17	59/7	
	Q8FE53_ECOL6	42672	5.92	148/16	59/6	
	ALF_ECO57	38992	5.52	148/17	59/7	
	ABE08756	42684	5.92	148/16	59/6	
	G85948	42357	6.02	148/16	59/7	

Tabelle 139 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.HIISINDLSR.D R.DDLNLVLATAAK.L R.LDPSEYANVKA K.TPHAWYFQQAGNGIFAR.Q	DTECC	34406	6.12	129/15		
	1ACMA	34190	6.00	129/15		
	1D09A	34275	6.13	129/15		
	1NBEA	34275	6.13	129/15		
	3CSUC	33692	5.87	129/15		
	9ATCA	34259	6.13	129/15		
	PYRB_ECO57	34275	6.13	129/15		
	AAA24476	34407	5.99	129/15		
	G86122	34446	6.12	129/15		
	AAA97142	34465	6.25	129/15		
K.AAISQASDVAALDNVR.V R.KAELESAALNAR.L R.ELPPEERPAAGAVINEAK.E	ABE07383	37308	6.02	112/8	99/13	
	SYECFA	36809	5.79	110/8	99/13	
	E90931	36779	5.79	110/8	99/13	
K.TVYSTENPDLLVLEFR.N K.LAEAGIPTQMER.L R.LGIEEGIELNPPLFDLFLK.N	ABE08263	27350	5.16	62/11	93/14	
	C36146	26978	5.07	62/11	93/14	

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

-MNLHEYQAK.Q R.LVITYQTDANGQPVNQILVEAAT DIAK.E K.VAEETPHLIHK.V K.KLADSLNIIAAK.G -MNLHEYQAK.Q (Ox) R.DLALIEINPLVITKQGDILICLDGK. L K.GLTDAAQVVAAVEGK.-	SYECSB	41367	5.37	83/15	103/8	101/15
	1CQIB	41052	5.36	83/15	103/8	
R.AFDQIDNAPEEK.A K.NMITGAAQMDGAILVVAATDGP MPQTR.E K.ILELAGFLDSYIPEPER.A	EFFECT	43286	5.30	60/14	36/3	
	EFACTA	43256	5.30	60/14	36/3	
	1DG1G	42150	5.22	60/14	36/3	
	1EFCA	42251	5.22	60/14	36/3	
	EFTU_ECO57	43155	5.30	60/14	36/3	
	ABE09270	44852	5.25	60/14	36/3	
	AAN82549	44822	5.25	60/13	36/3	
K.AWHSSSETIAK.I K.WKEGEATLAPSLDLVGKI.- K.LGVDVYAVSTDTHTFK.A R.ATFVVDPPQGIQAEIVTAEGIGR. D K.EGEATLAPSLDLVGKI.- R.NFDNMRDEGLADR.A (Ox)	AHPC_ECO57	20617	5.03	53/15	206/30	157/28
	D90709	20748	5.03	53/15	206/30	157/28
K.IENTFLSEVDELALYAPQATV NR.I	2ATCB	16986	5.38		42/16	
R.DIDGHDAASIKR.A K.AGTHDSHGAPLGDAEIALTR.E K.AINEDAAGNYIHVGR.E	XJECTK	72156	5.43	57/7		
	CAA48166	72219	5.43	57/7		
	Q2M9Q8_ECOLI	72166	5.43	57/7		
	Q8FE38_ECOL6	73326	5.58	57/7		
	ABE08771	73280	5.58	57/7		
	E85950	72162	5.48	57/7		
	B91105	72180	5.43	57/7		

Tabelle 139 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
R.REESAAAAEVEER.T R.EMLIADGIDPNELLNSLAAVK.S R.EMLIADGIDPNELLNSLAAVK.S (Ox)	HNS_ECO57	15399	5.43	44/25	43/15	
	CAA47740	15274	5.24	44/25	43/15	
	B85704	15530	5.43	44/25	43/15	
K.IENTFLSEQVDQLALYAPQATV NR.I	DTECR	17110	6.89	43/16		36/16
	1ACMB	16199	7.00	43/17		36/17
	1RAID	16270	7.00	43/17		36/17
	9ATCB	16070	7.00	43/17		36/17
	PYRI_ECO57	16979	6.84	43/16		36/16
K.GIQPGHIHKPGK.V K.EHVTKPVVGYIAGVTAPK.G R.MGHAGAIAGGKTAEKFAAL EAAGVK.T (Ox)	SYECSA	29759	6.32	38/20		
	1CQIA	29386	6.09	38/20		
	SUCD_ECO57	29627	6.31	38/20		
	2SCUA	29360	5.99	38/20		
K.YLLQFQSNPANPEIHEK.T	SYECAC	34468	5.83		64/5	61/5
	Q8FFB8_ECOL6	34865	5.83		64/5	61/5

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	CYSK_ECO57	34337	5.83		64/5	61/5
	CAA02056	34496	5.64		64/5	61/5
K.NIETFHTAQK.L R.QALNASRLIVTK.D R.MTVQELSKEGFSALASTIETLAA AER.L	DEECHT	46082	5.06		59/11	
	HISX_ECOLI	45951	5.06		59/11	
	CAA36882	46054	5.06		59/11	
	CAA27610	46051	5.19		41/11	
	CAA31812	46081	5.19		41/11	
.SKNYHIAVLPGDGIGPEVMTQAL K.V (Ox) K.LFSNLRPAK.L R.GAAAVSTDEMGDIAR.Y (Ox)	LEU3_ECO57	39359	5.14			144/13
	LEU3_ECOL6	39375	5.14			144/13
	LEU3_ECOLI	39361	5.14			144/13
	BAA04537	39492	5.14			144/13
K.HILIAVDLSPESK.V	USPA_ECO57	15925	5.12			86/9
	CAA47884	15971	4.98			86/9
	G91174	16056	5.11			86/9
K.DDERYPGHDP.R.Y R.VIIAAHGNSLR.A	GPMA_ECO57	28408	5.86			51/8
	ABE06238	29204	6.27			51/8
	H85577	28539	5.85			51/8
K.LYNDAGISNDR.I	1UCWA	35049	5.03			46/3
	TALB_ECOL6	35052	5.10			46/3
	TALB_ECO57	35066	5.10			46/3
	ABE05519	37447	5.29			46/3
	S40535	35197	5.11			46/3
R.AGMAVGLAGLFIEAHPDPEHAK .C (Ox)	SYECOL	30813	6.32			44/7
	CAA29067	30779	6.32			44/7
	AAN80139	30843	6.32			44/7
	E85701	30841	6.32			44/7

Tabelle 140: in Fraktion 28 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/Sequenzabdeckung Messung 1	Score/Sequenzabdeckung Messung 2	Score/Sequenzabdeckung Messung 3
R.QLINTVHVDMLIVPLRDEEE- K.AVSMARPYNAK.V K.AVSMARPYNAK.V (Ox)	USPA_ECO57	15925	5.12	113/23	69/21	66/16
	G91174	16056	5.11	113/22	69/21	66/16
	CAA47884	15971	4.98			66/16
R.REEESAAAAEVEER.T R.EMLIADGIDPNELLNSLAAVK.S	HNS_ECO57	15399	5.43	74/25	36/10	
	CAA47740	15274	5.24	74/25	36/10	
	B85704	15530	5.43	74/25	36/10	
K.NGEFIEITEK.D R.WSVFFFPADFTFVCPTELGDV ADHYEELQK.L K.LGVDVYAVSTDTHTFK.A K.AWHSSSETIAK.I K.YAMIGDPTGALTR.N R.NFDNMREDEGLADR.A (Ox) R.ATFVVDPPGIIQAIIEVTAEGIGR. D	AHPC_ECO57	20617	5.03	662/82	577/66	464/56

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

K.AAQYVASHPGEVCPAK.W K.WKEGEATLAPSLDLVGK.I K.WKEGEATLAPSLDLVGK.I- K.EGEATLAPSLDLVGK.I K.EGEATLAPSLDLVGK.I- K.IKYAMIGDPTGALTR.N K.YAMIGDPTGALTR.N (Ox) K.LGVDVYAVSTDFTHK.A R.ATFVVDPPQGIQAEIVTAEGIGR. D	D90709	20748	5.03	662/81	577/66	464/56
R.LNNLHVAMVGDLY R.VDEIATDVDKTPHAWYFQQAG NGIFAR.Q K.TPHAWYFQQAGNGIFAR.Q	2ATCA	33523	7.34	68/13		
R.ILILHADHEQNASTSTVR.T R.HTMIHEQITR.L (Ox)	YKEC	47984	6.21	55/4	69/6	71/6
	AAA23892	48032	6.21	55/4	69/6	71/6
	H85572	47934	6.15	55/4	69/6	71/6
	A99722	47951	6.15	55/4	69/6	71/6
R.EIEEGLINQILDVR.E	RNECO	10230	4.87	61/16	83/16	
K.VLHPLPR.V K.TPHAWYFQQAGNGIFAR.Q R.DDLNLVLATAAK.L R.LGASVVGFSDSANTSLGK.K R.LATEFSGNVPVLNAGDGSNOH PTQTLDDLFTIQETQGR.L R.LDNLHVAMVGDLY (Ox)	DTECC	34406	6.12		39/7	110/28
	1ACMA	34190	6.00		39/7	110/28
	1D09A	34275	6.13		39/7	
	1NBEA	34275	6.13		39/7	110/28
	2ATCA	33523	7.37		39/7	
	3CSUA	31832	6.12		39/8	
	3CSUB	31819	5.98		39/8	
	3CSUC	33692	5.87		39/7	
	9ATCA	34259	6.13		39/7	110/28
	PYRB_ECO57	34275	6.13		39/7	110/28
	AAA24476	34407	5.99		39/7	98/28
	G86122	34446	6.12		39/7	110/28
	AAA97142	34465	6.25		39/7	110/28
AAA24474	34390	6.11		39/7	110/28	

Tabelle 140 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 3
K.NIANPIAQLSLALLLR.Y	LEU3_ECO57	39359	5.14			94/4
	LEU3_ECOL6	39375	5.14			94/4
	LEU3_ECOLI	39361	5.14			94/4
	BAA04537	39492	5.14			94/4
	ABE05590	39607	5.14			94/4
	A64729	39623	5.14			94/4
	AAN78586	39637	5.14			94/4
	E85489	39621	5.14			94/4
R.TVNDILDNVKA K.EGFSALASTIETLAAAER.L	DEECHT	46082	5.06			62/2
	HISX_ECOLI	45951	5.06			62/2
	HISX_ECOL6	46080	5.06			62/2

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	ABE07761	46526	5.06			62/2
	CAA27610	46051	5.19			62/2
	CAA31812	46081	5.19			62/2
	CAA36882	46054	5.06			62/2
K.TPGHPEVGYTAGVETTTGPLG QGIANAVGMAIAEK.T R.TEEQLANIAR.G	XJECTK	72156	5.43			36/6
	Q2M9Q8_ECOLI	72166	5.43			36/6
	Q8FE38_ECOL6	73326	5.58			36/6
	ABE08771	73280	5.58			36/6
	E85950	72162	5.48			36/6
	B91105	72180	5.43			36/6
K.IFEDNSLTIGHTPLVR.L R.GVLKPGVELVEPTSGNTGIALA YVAAAR.G K.LTLTMPETMSIER.R K.YLLLQQFSNPANPEIHEK.T K.TTGPEIWEDTDGQVDVFIAGVG TGGTLTGVS.R.Y K.GKTDLISVAVEPTDSPVIAQALA GEEIKPGPHK.I	SYECAC	34468	5.83	38/17	113/20	125/20
	Q8FFB8_ECOL6	34865	5.83	38/17	113/20	125/20
	CYSK_ECO57	34337	5.83	38/17	113/20	125/20
	CAA02056	34496	5.64	38/17		125/20

Tabelle 141: in Fraktion 29 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
R.DDLNLVLATAAK.L K.LKANPQPELLK.H R.LNHLHVAMVGD.LK.Y K.TPHAWYFQQAGNGIFAR.Q R.LGASVVGFSDSANTSLGK.K R.TVHSLTQALAK.F	2ATCA	33523	7.37	152/20		125/13

Tabelle 141 (Fortsetzung)

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
K.AWHSSSETIAK.I K.EGEATLAPSLDLVGKI.- K.LGVDVYAVSTDTHFTHK.A K.AAQYVASHPGEVCPAK.W	AHPC_ECO57	20617	5.03	46/14	73/15	37/17
	D90709	20748	5.03	46/14	73/14	37/17
K.FSATFDDQMLVDYSK.N K.HFAALSTNAK.A K.KVNPETTLFLVASK.T R.I.LPELKDDKEISSHDSSTNGLIN R.Y K.EISSHDSSTNGLINR.Y	NUEC	61491	5.85	110/4	93/6	67/6
	G6PI_ECOL6	61505	5.93	110/4	93/6	67/6
	ABE10001	61749	5.93	110/4	93/6	67/6
	CAA33268	61477	5.85	110/4	93/6	67/6
K.HIISINDLSR.D R.DDLNLVLATAAK.L K.LKANPQPELLK.H R.LNHLHVAMVGD.LK.Y R.LDPSEYANVK.A K.TPHAWYFQQAGNGIFAR.Q R.LGASVVGFSDSANTSLGK.K	DTECC	34406	6.12	225/23		133/12
	1ACMA	34190	6.00	225/23		133/12
	1D09A	34275	6.13	225/23		133/12
	1NBEA	34275	6.13	225/23		133/12
	3CSUC	33692	5.87	255/24		

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

	9ATCA	34259	6.13	225/23		133/12
	PYRB_ECO57	34275	6.13	225/23		133/12
	AAA24476	34407	5.99	255/23	105/24	133/12
	G86122	34446	6.12	225/23		133/12
	AAA97142	34465	6.25	225/23		133/12
	AAA24474	34390	6.11			133/12
R.AFSQFLNLANTAEOQYHSISPK.G K.DIADYEHNLQMR.R R.HTEALGELTR.Y K.RRPTGGVESLR.A	QYEC	99000	5.52	93/6	95/4	
	Q3YV20_SHISS	99014	5.52	93/6	95/4	
	ABE09959	99027	5.52	93/6	95/6	
	B86087	99042	5.52	93/6	95/4	
	E91239	99044	5.52	93/6	95/4	
R.FMDDHGFLDIETPMLTK.A R.YGSDKPDLR.N	SYECD	65872	5.47	58/4		
	1C0AA	65315	5.47	58/4		
	ABE07546	65828	5.54	58/4		
	D85799	65703	5.47	58/4		
	H90950	65773	5.47	58/4		
K.HILIAVDLSPESK.V K.AVSMARPYNAK.V	USPA_ECO57	15925	5.12	55/9		
	CAA47884	15971	4.98	55/9		
	G91174	16056	5.11	55/9		
R.INIIDTPGHVDFTEIEVER.S R.GQYGHVVIDMYPLEPGSNPK.G K.GGVIPGEYIPAVDKGIQELK.A	EFECG	77532	5.24	54/5		
	EFG_ECO57	77401	5.24	54/5		

Tabelle 142: in Fraktion 30 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein					
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenzabdeckung Messung 1	Score/ Sequenzabdeckung Messung 2	Score/ Sequenzabdeckung Messung 3
-ANYFNTLNL.R.Q R.DEFADGASYLQGG.K K.VGTYEELIPQADLVINLTPDK.Q K.DGAALGYSHGFNIVEVGEQIRK. D K.DITVVMVAPK.C R.GFGVPTLIAVHPENDPK.G R.GFGVPTLIAVHPENDPKGEGMA IAK.A K.HMDDIISGEFSSGMMADWAND DKK.L R.SHAIEQVGKK.L R.GYMTDMKR.I R.DSGLDISYALR.K K.VGTYEELIPQADLVINLTPDKQH SDVVR.T K.AIPEGAVDNGQLR.D	ILVC_ECOLI	53903	5.20	330/29	219/12	153/16
	ISECKR	54034	5.20	330/29	219/12	153/16
	AAA24029	54033	5.32	330/29	219/12	153/16
	ILVC_ECOL6	53903	5.20		219/12	
	ILVC_ECO57	53898	5.20		219/12	
	ABE09751	59545	5.33		219/11	
	AAN83128	59559	5.33		219/11	
R.INIIDTPGHVDFTEIEVER.S K.IATDPFVGNLTFRR.V R.VYSGVNSGDTVLNSVK.A R.EFNVEANVGKQVAYR.E K.VEVETPEENTGDVIGDLSR.R R.LGANPVPLQLAIGAEEHFTGVV DLVK.M R.HASDDEPFSAFAK.I R.AGDIAAIGLK.D R.MEFPEPVISIAVEPK.T (Ox)	EFECG	77532	5.24	299/11	183/9	257/14
	EFG_ECO57	77401	5.24	299/11	183/9	257/14

Charakterisierung von Proteinen in biologischen Proben

K.IFEDNSLTIGHTPLVR.L K.VIGITNEEAISTAR.R	SYECAC	34468	5.83	45/9		
	Q8FFB8_ECOL6	34865	5.83	45/9		
	CYSK_ECO57	34337	5.83	45/9		
	CAA02056	34496	5.64	45/9		
R.VATEFSETAPATLK.S	TVECG	41093	5.08	41/3		
	PGK_ECOL6	40962	5.08	41/3		
	PGK_ECO57	40974	5.08	41/3		
	ABE08757	43271	5.23	41/3		
	E91103	41105	5.08	41/3		
-SQTVHFQGNPVTVANS IPQAGSK.A	TPX_ECO57	17693	4.75	37/13		
	AAC43517	17884	4.75	37/13		
	B85752	17824	4.75	37/13		
K.HIISINDLSR.D K.LKANPQPELLK.H	AAA24479	5989	7.93			67/38
	DTECC	34406	6.12			65/6
	1ACMA	34190	6.00			65/6
	1D09A	34275	6.13			65/6
	1NBEA	34275	6.13			65/6
	3CSUA	31832	6.12			65/7
	3CSUB	31819	5.98			65/7
	3CSUC	33692	5.87			65/6
	9ATCA	34259	6.13			65/6
	PYRB_ECO57	34275	6.13			65/6
	AAA24474	34390	6.11			65/6
	AAA24476	34407	5.99			65/6
	G86122	34446	6.12			65/6
	AAA97142	34465	6.25			65/6

7.5 Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 4

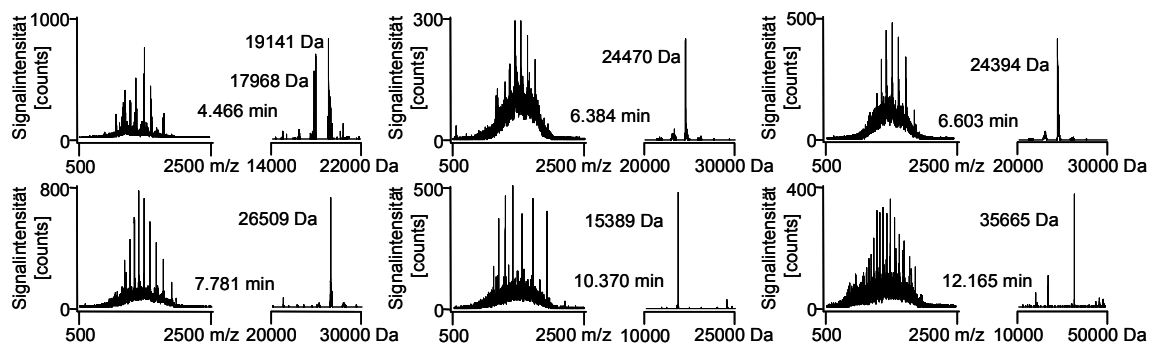


Abbildung 115: Spektren der MS-Analyse von Fraktion F1 sortiert nach Retentionszeit

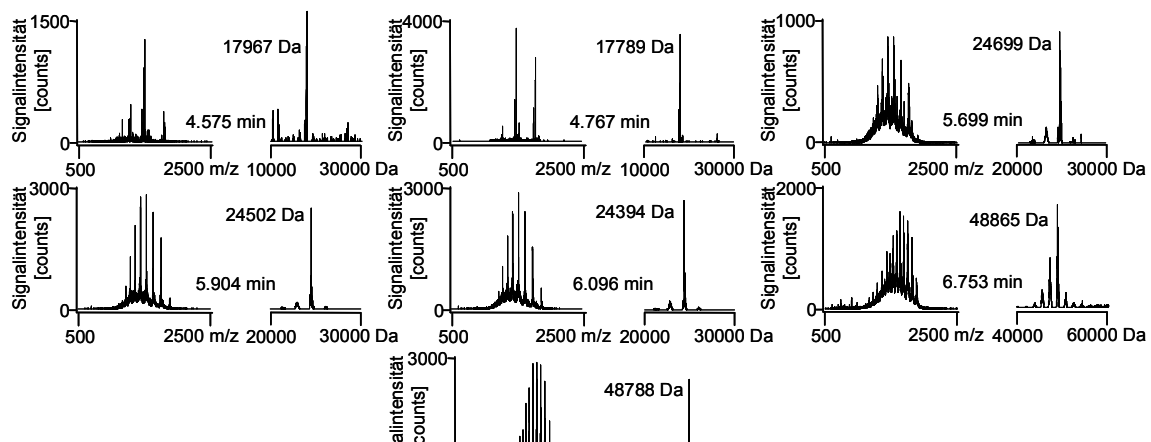


Abbildung 116: Spektren der MS-Analyse von Fraktion F4 sortiert nach Retentionszeit

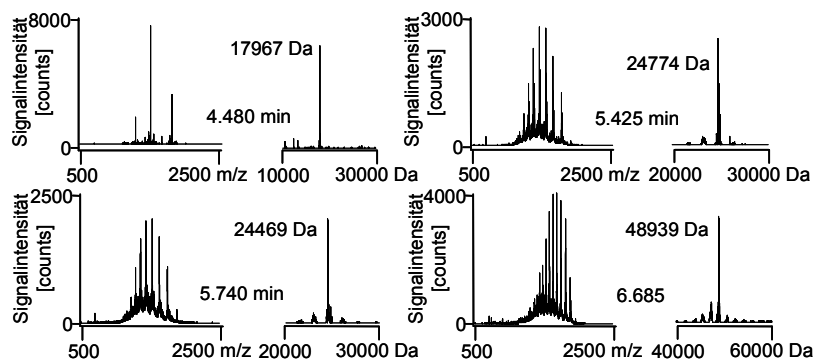


Abbildung 117: Spektren der MS-Analyse von Fraktion F5 sortiert nach Retentionszeit

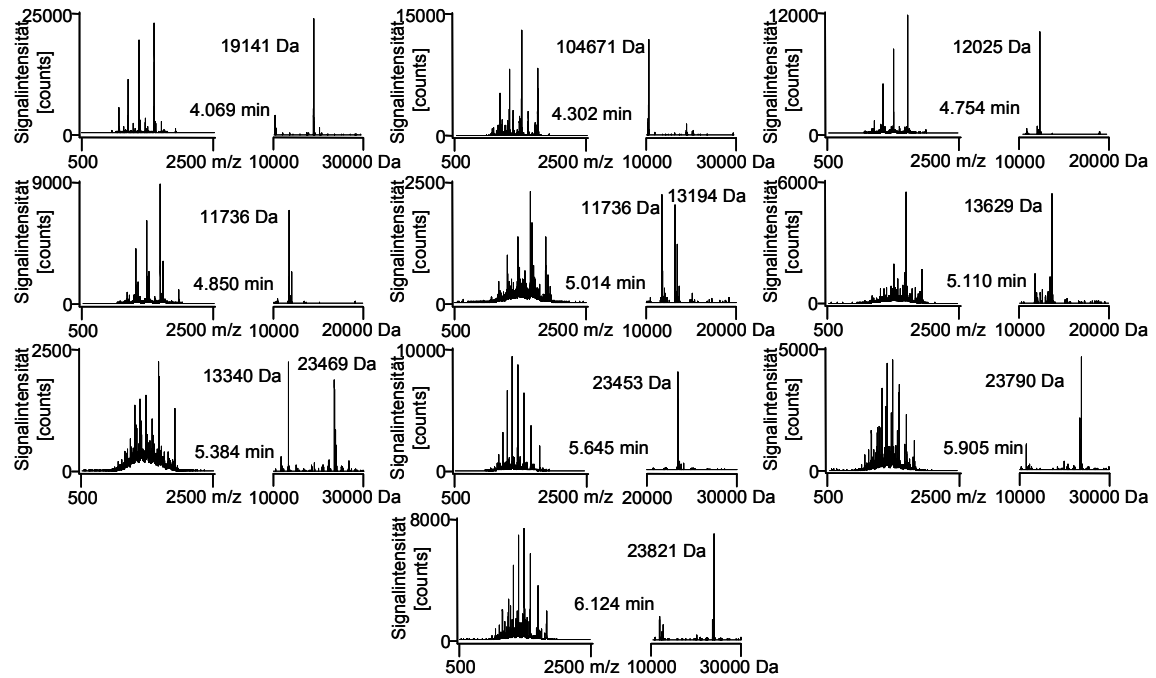


Abbildung 118: Spektren der MS-Analyse von Fraktion F9 sortiert nach Retentionszeit

Tabelle 143: Proteinsequenzen zur Identifizierung von Bromelain

Translation of 91-85	An8CAA08860
AVPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFAAIATVESIYKI KKGILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKGVA SAAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITGYARVPRNNESSMM YAVSKQPITVAVDANANFQYYKSGVFNGPCGTSLNHAVTAI GYGQDSNGKKYWIVKNSWGARWGEAGYIRMARDVSSSS GICGIAIDPLYPTLESANVEAIKMOVSESRSSVCGR	AVPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFAAIATVESIYKI KKGILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKGVA SVAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITGYARVPRNNESSMM YAVSKQPITVAVDANANSQYYNSGVFNGPCGTSLNHAVTA IGYGQDSNGKKYWIVKNSWGARWGEAGYIRMARDVSSSS GICGIAIDSLYPTLESANVEAIKMOVSESRSSV
BromAn11	BromAn11aktAV
MAWKVQVVFLFLFLCVMWASPSAASADEPSDPMMKRFEE WMVEYGRVYKDNDEKMRRFQIFKNNVNIHETFNRSRNS YTLGINQFTDMTNNNEFVAQYTGGLSRPLNIEREPVVSFDDVD ISAVPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFAAIATVESIY KIKKILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKG VASGAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITGYARVPRNNESS MMYAVSKQPITVAVDANANFQYYKSGVFNGPCGTSLNHA VTAIGYGQDSNGKKYWIVKNSWGARWGEAGYIRMARDVS SSSGICGIAIDSLYPTLESANVEAIKMOVSESRSSVCGRVD	AVPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFAAIATVESIYKI KKGILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKGVA SVAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITGYARVPRNNESSMM YAVSKQPITVAVDANANFQYYKSGVFNGPCGTSLNHAVTAI GYGQDSNGKKYWIVKNSWGARWGEAGYIRMARDVSSSS GICGIAIDSLYPTLESANVEAIKMOVSESRSSVCGRVD
BromAn11aktV	BAA22544
VPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFAAIATVESIYKIK KGILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKGVA GAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITGYARVPRNNESSMMY AVSKQPITVAVDANANFQYYKSGVFNGPCGTSLNHAVTAI GYGQDSNGKKYWIVKNSWGARWGEAGYIRMARDVSSSS GICGIAIDSLYPTLESANVEAIKMOVSESRSSVCGRVD	AVPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFAAIATVESIYKI KKGILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFRAFEFIISNKGVA SGAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITGYARVPRNNESSMM YAVSKQPITVAVDANANFQYYKSGVFNGPCGTSLNHAVTAI GYGQDSNGKKYWIVKNSWGARWGEAGYIRMARDVSSSS GICGIAIDSLYPTLESANVEAIKMOVSESRSSV
AAB70820	AnanAkt
MRPTRSAVSATALLLVALALAAATAARHSYTTTTTRVPA PAERADEEVRMYEAWKSKHGRGGSSNDDCMAPGDDE QEEEDRRLRLEVFRDNLRYIDAHNAEADAGLHTFRLGLTPF ADLTLEEYRGRVLGFRARRRRGARYGSGYSVRRGGDLDP AIDWRQLGAVTEVKDQCCGGCWFSAVAIEGVNAIATG NLVSLSEQEIIDCAQDSGCDGGQMENAFRFVIGNGGIDTE ADYFPFIDGTGCDASKEKNEKVATIDGLVEASNNETALQE AVAIQPVSAIDASGRAFHYSYSSGIFNGPCGTSLDHGVTA VGYGSESGKDYWIVKNSWSASWGEAGYIRMRRNVPRPTG KCGIAMDASYPVKDTYHPGTGTATARAAMDVIKMLVA	VPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFASIASIATVESIYKIK RGNLVSLSEQQVLDCAVSYGCKGGWINKAYSFIISNKGVA SAAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITRYTYVQRNNERNMM YAVSNQPIAAALDASGNFQHYKRGVFTGPCGTRLNHAIVII GYGQDSNGKKYWIVKNSWGAGWEGGYIRLARDVSSSF GLCGIAMDPLYPTLQSGPSVEVI
AnanPrec	Ananain precursorCAA05487
MTSKVQLVFLFLFLCVMWASPSAASCDEPSDPMMKQFEE WMAEYGRVYKDNDEKMLRFQIFKNNVNIHETFNRRNGNS YTLGINQFTDMTNNNEFVAQYTGSLPLNIKREPVSFDDVDI SSVPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFASIASIATVESIY KIKRGNLVSLSEQQVLDCAVSYGCKGGWINKAYSFIISNKG VASAAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITRYTYVQRNNERN MMYAVSNQPIAAALDASGNFQHYKRGVFTGPCGTRLNHA VIIGYGQDSNGKKYWIVKNSWGAGWEGGYIRLARDVSSSF FGLCGIAMDPLYPTLQSGPSVEVI	VPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFASIASIATVESIYKIK RGNLVSLSEQQVLDCAVSYGCKGGWINKAYSFIISNKGVA SAAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITRYTYVQRNNERNMM YAVSNQPIAAALDASGNFQHYKRGVFTGPCGTRLNHAIVII GYGQDSNGKKYWIVKNSWGAGWEGGYIRLARDVSSSF GLCGIAMDPLYPTLQSGPSVEVI
BromAn1	BromAn1akt
MTSKVQLVFLFLFLCVMWASPSAASCDEPSDPMMKQFEE WMAEYGRVYKDNDEKMLRFQIFKNNVNIHETFNRRNGNS YTLGINQFTDMTNNNEFVAQYTGSLPLNIKREPVSFDDVDI SSVPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFASIASIATVESIY KIKRGNLVSLSEQQVLDCAVSYGCKGGWINKAYSFIISNKG VASAAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITRYTYVQRNNERN MMYAVSNQPIAAALDASGNFQHYKRGVFTGPCGTRLNHA VIIGYGQDSNGKKYWIVKNSWGAGWEGGYIRLARDVSSSF FGLCGIAMDPLYPTLQSGPSVEVI	VPQSIDWRDYGAVTSVKNNQPCGACWAFASIASIATVESIYKIK RGNLVSLSEQQVLDCAVSYGCKGGWINKAYSFIISNKGVA SAAIYPYKAAKGTCKTNGVPNSAYITRYTYVQRNNERNMM YAVSNQPIAAALDASGNFQHYKRGVFTGPCGTRLNHAIVII GYGQDSNGKKYWIVKNSWGAGWEGGYIRLARDVSSSF GLCGIAMDPLYPTLQSGPSVEVI
An11CAA08861	
AVPQSIDWRNYGAVTSVKNHIPCGSCWAFAAIATVESIYKIKRGLYLISLSEQQVLDCAVSYGCDGGWVINKAYDFIISNKGV ASAIYPYKASQGGQTCRINGVPNSAYITGYTRVQSNERNMMYAVSNQPIAAASIEASGDFQHYKRGVFTGPCGTSLNHAITII GYGQDSNGKKYWIVKNSWGASWGERGYIRMARDVSSSSGLCGIAIRPLYPTLQSGANVEAIKMOVSESRSSV	

Tabelle 144: in Fraktion F4 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein				
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2
K.NQNPCGACWAFAAIATVESIYK.I K.NQNPCGACWAFAAIATVESIYKI KK.G K.GGWEFR.A R.AFEFIISNK.G K.YWIVK.N K.GGWEFRAFEFIISNKGVASAAIYP YKAAK.G	Translation of 91-85	25452	9.03	145/18	145/23
K.NQNPCGACWAFAAIATVESIYK.I K.NQNPCGACWAFAAIATVESIYKI KK.G K.GGWEFR.A R.AFEFIISNK.G K.YWIVK.N K.GVASVAIYPYKAAKGTK.T	An8CAA08860	25178	8.99	145/19	145/19
K.NQNPCGACWAFAAIATVESIYK.I K.NQNPCGACWAFAAIATVESIYKI KK.G K.GGWEFR.A R.AFEFIISNK.G K.YWIVK.N	BromAn11	40066	7.97	145/12	
	BromAn11aktAV	25741	9.03	145/18	
	BromAn11aktV	25670	9.03	145/18	
K.DYWIVK.N	AAB70820	42598	5.05	9/1	21/1

Tabelle 145: in Fraktion F5 identifizierte Proteine, detektierte Peptide, theoretische Proteinmassen und pI-Werte, Mascot-Score und Sequenzabdeckung je Injektion

gemessenes Peptid	nachgewiesenes Protein				
	Index	theoretische Masse [Da]	theoretischer pI-Wert	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 1	Score/ Sequenz-abdeckung Messung 2
K.YWIVK.N R.AFEFIISNK.G	Translation of 91-85	25452	9.03	17/2	34/5
	An8CAA08860	25178	8.99	16/2	35/5
	BromAn11	40066	7.97	16/1	34/3
	BromAn11aktAV	25741	9.03	16/2	34/5
	BromAn11aktV	25670	9.03	16/2	34/5
	BAA22544	25210	9.08	16/2	16/2
K.DYWIVK.N	AAB70820	42598	5.05	25/1	

7.6 Tabellen zu Kapitel 5.2.2

 Tabelle 146: Messwerte der externen Kalibriergeraden für α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin B und A mittels TOF-MS

α-Lactalbumin	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/ μ L	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
2.00	3339	3178	3489
3.00	21851	14320	16942
4.00	35217	27389	14959
6.00	43133	54833	39606
8.00	58064	62929	50930
Achsenabschnitt a	-10938.927		
Steigung b	8902.36		
Regressionskoeffizient R	0.9535		
Bestimmtheitsmaß R ²	0.9091		
Reststandardabweichung sy	6513.77		
β-Lactoglobulin B			
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/ μ L	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
2.00	16828	18825	19699
3.00	39759	48563	55156
4.00	68048	85662	65011
6.00	122913	122812	119992
8.00	170667	172166	162643
Achsenabschnitt a	-28152.47		
Steigung b	24797.55		
Regressionskoeffizient R	0.9943		
Bestimmtheitsmaß R ²	0.9887		
Reststandardabweichung sy	6133.44		
β-Lactoglobulin A			
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/ μ L	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
2.00	17028	23156	23296
3.00	65234	61051	59834
4.00	63978	77392	82008
6.00	116249	125559	142252
8.00	156758	139568	132052
Achsenabschnitt a	-6656.10		
Steigung b	20076.19		
Regressionskoeffizient R	0.9576		
Bestimmtheitsmaß R ²	0.9170		
Reststandardabweichung sy	13974.92		

Tabelle 147: Flächen der Molkeproteine in den untersuchten Proben mittels TOF-MS

α-Lactalbumin	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Molkeprobe 1	24923	21517	27844
Molkeprobe 2	15678	17614	16271
β-Lactoglobulin B			
β-Lactoglobulin B	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Molkeprobe 1	29372	23524	27813
Molkeprobe 2	107912	118822	95468
β-Lactoglobulin A			
β-Lactoglobulin A	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Molkeprobe 1	45990	42703	44284
Molkeprobe 2	112979	112931	109275

7.7 Tabellen zu Kapitel 5.3.2

 Tabelle 148: Messwerte der externen Kalibriergeraden für α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin B und A mittels IT-MS

α-Lactalbumin	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Konzentration in ng/ μ L			
1.00	287533	162763	241688
2.00	761091	339120	636685
4.00	2036259	1559094	1499420
6.00	3558520	3843484	3751755
8.00	4356891	6081937	6535746
Achsenabschnitt a	-932223.55		
Steigung b	787862.53		
Regressionskoeffizient R	0.9653		
Bestimmtheitsmaß R ²	0.9317		
Reststandardabweichung sy	586708.38		
β-Lactoglobulin B			
β-Lactoglobulin B	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Konzentration in ng/ μ L			
1.00	606529	346391	335144
2.00	1818306	846182	1428598
4.00	3030405	2301413	2150570
6.00	3562113	3312645	3381549
8.00	4230147	4244949	4296803
Achsenabschnitt a	157414.15		
Steigung b	532230.66		
Regressionskoeffizient R	0.9744		
Bestimmtheitsmaß R ²	0.9494		
Reststandardabweichung sy	338170.22		

Tabelle 148 (Fortsetzung)

β-Lactoglobulin A	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/μL	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
1.00	706321	394435	392630
2.00	2004790	951359	1591535
4.00	3360622	2613007	2525625
6.00	4080034	4426731	4091255
8.00	5265673	5150499	5279535
Achsenabschnitt a	45507.53		
Steigung b	669070.45		
Regressionskoeffizient R	0.9833		
Bestimmtheitsmaß R ²	0.9669		
Reststandardabweichung sy	340738.96		

Tabelle 149: Flächen der Molkeproteine in den untersuchten Proben mittels IT-MS

α-Lactalbumin	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Molkeprobe 1	1212855	1235646	1233697
Molkeprobe 2	633749	616230	545282
β-Lactoglobulin B	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Molkeprobe 1	464097	453162	470197
Molkeprobe 2	2460712	2964559	2520223
β-Lactoglobulin A	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s	Fläche in counts*s
Molkeprobe 1	1178833	1195153	1130711
Molkeprobe 2	3863459	4430060	3771540

7.8 Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.2

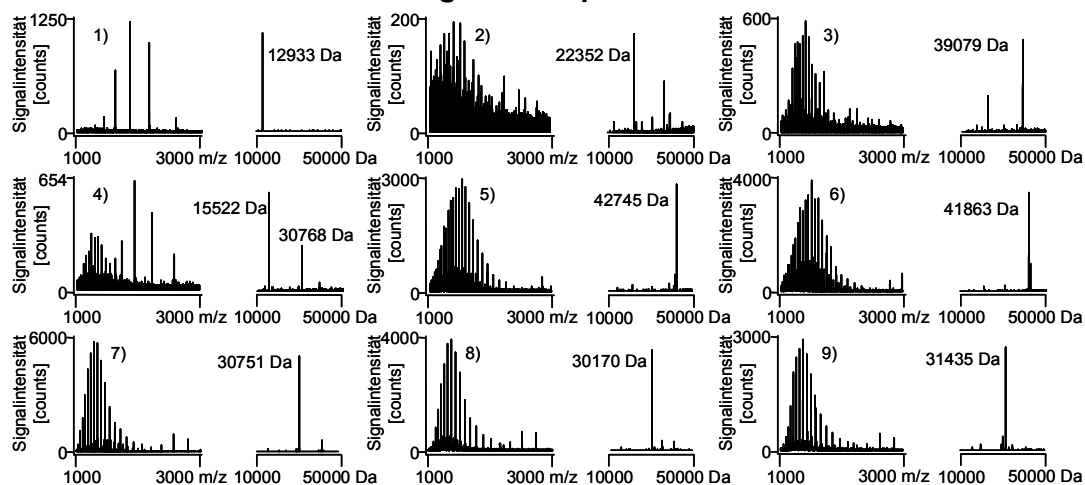


Abbildung 119: Summen- und Dekonvolutionsspektren der annotierten Peaks 1-9 aus der Gliadinmessung mittels TOF-MS in Abbildung 105

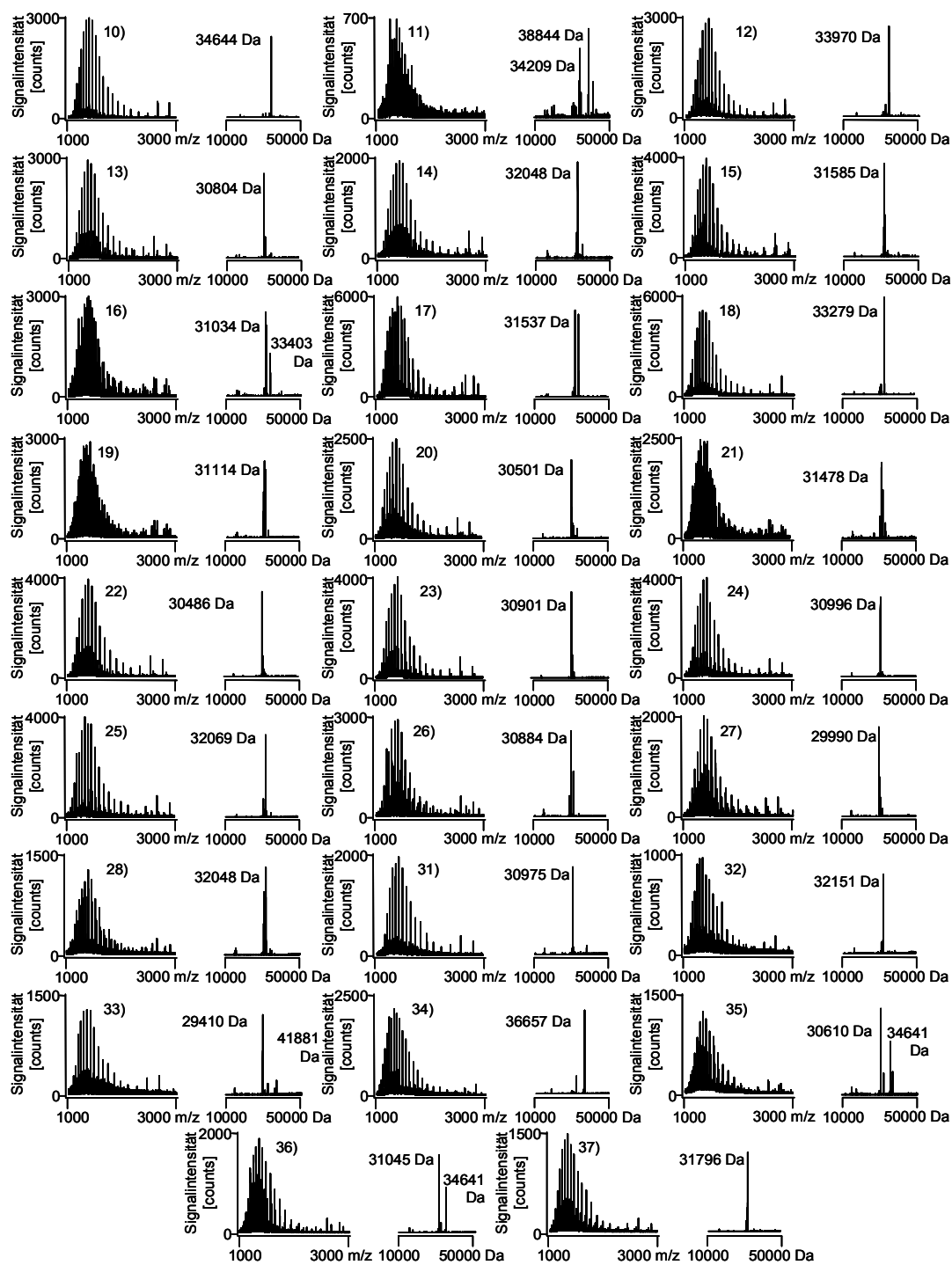


Abbildung 120: Summen- und Dekonvolutionspektren der annotierten Peaks 10-37 (ausgenommen Peaks 29 und 30) aus der Gliadinmessung mittels TOF-MS in Abbildung 105

Tabelle 150: Konzentrationen und Peakflächen der Kalibrierstandards beider γ -Gliadine mittels TOF-MS-Methode

γ-Gliadin 1	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/ μ L	Peakfläche in counts*sec	Peakfläche in counts*sec	Peakfläche in counts*sec
1.0	97540	61413	73247
1.9	141244	104686	105545
5.7	226648	244033	177119
3.8	336323	324673	352713
7.6	429837	424432	413613
9.5	536171	497213	528732
11.9	657524	670780	613697
Achsenabschnitt a		27652.33	
Steigung b		51787.80	
Regressionskoeffizient R		0.9814	
Bestimmtheitsmaß R ²		0.9631	
Reststandardabweichung s _y		39677.20	
γ-Gliadin 2	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/ μ L	Peakfläche in counts*sec	Peakfläche in counts*sec	Peakfläche in counts*sec
1.1	103838	73607	89548
2.2	129100	84436	91501
6.6	191663	172159	167591
4.4	258478	211127	265422
8.8	343837	324822	349382
11.0	447162	436340	420589
13.7	527773	569259	509326
Achsenabschnitt a		28467.26	
Steigung b		36045.40	
Regressionskoeffizient R		0.9800	
Bestimmtheitsmaß R ²		0.9604	
Reststandardabweichung s _y		33028.08	

Tabelle 151: Peakflächen der γ -Gliadine aus den drei Probenmessungen mittels TOF-MS-Methode

Protein	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s
γ-Gliadin 1	125359	144725	157312
γ-Gliadin 2	127429	121927	135801

7.9 Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.3

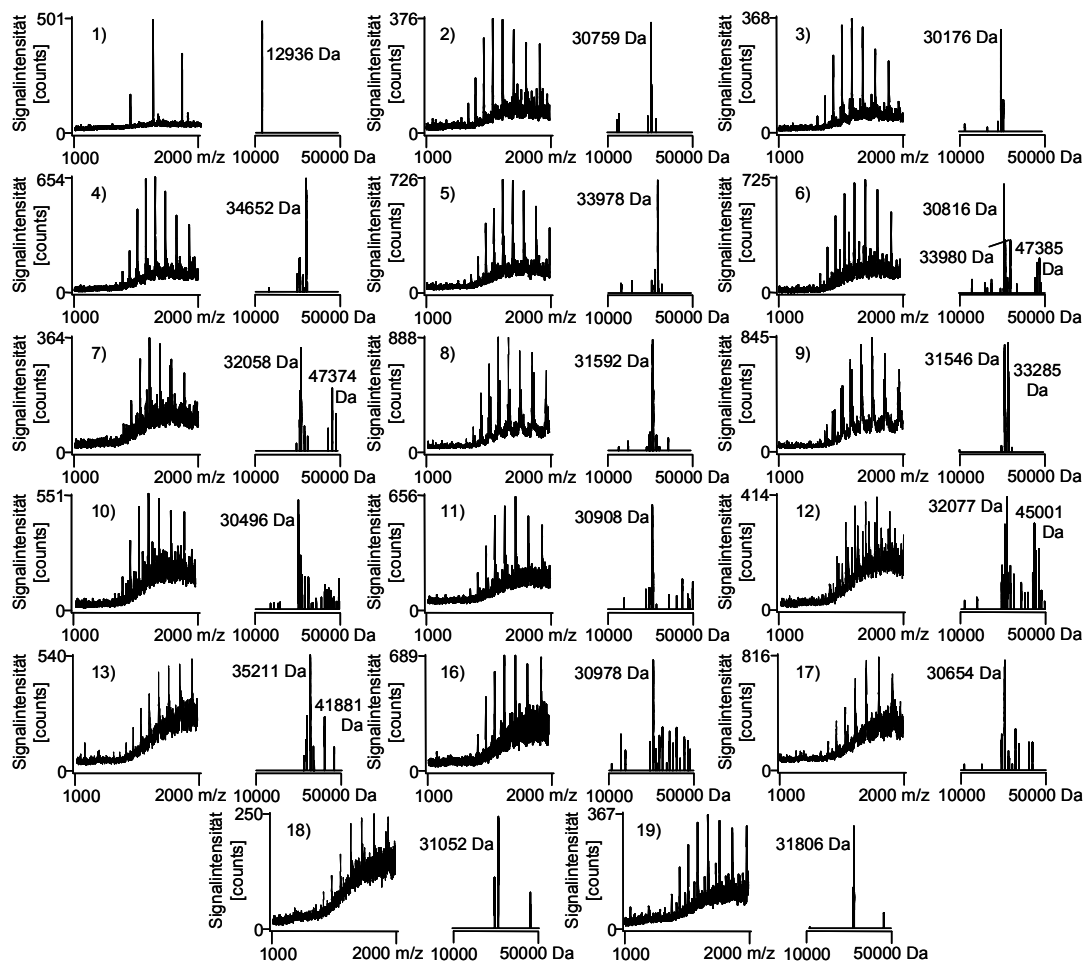


Abbildung 121: Summen- und Dekonvolutionsspektren der annotierten Peaks 1-19 (ausgenommen 14 und 15) aus der Gliadinmessung mittels IT-MS in Abbildung 109

Tabelle 152: Konzentrationen und Peakflächen der Kalibrierstandards beider γ -Gliadine mittels IT-MS

γ -Gliadin 1	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/ μ L	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s
1.0	1425040	935934	862999
1.9	1024439	1111671	1236545
5.7	1871190	1476353	1633404
7.6	2302092	2522878	2083965
9.5	2756443	2223448	2941174
11.9	2655495	2733951	3460297

Tabelle 152 (Fortsetzung)

Achsenabschnitt a		812861.41	
Steigung b		182760.37	
Regressionskoeffizient R		0.9380	
Bestimmtheitsmaß R ²		0.8799	
Reststandardabweichung s _y		280144.97	
γ-Gliadin 2			
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Konzentration in ng/μL	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s
1.1	1018764	579751	688879
2.2	716944	683801	979558
6.6	1268782	956177	953742
8.8	1409638	1591885	1145288
11.0	1696056	1378303	1841689
13.7	1539723	1606083	1875581
Achsenabschnitt a		636287.05	
Steigung b		80459.95	
Regressionskoeffizient R		0.8936	
Bestimmtheitsmaß R ²		0.7984	
Reststandardabweichung s _y		193516.93	

Tabelle 153: Peakflächen der α-Gliadine aus den drei Probenmessungen mittels IT-MS

Protein	Messung 1	Messung 2	Messung 3
	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s	Peakfläche in counts*s
γ-Gliadin 1	1849833	1848214	1510434
γ-Gliadin 2	1212855	1086888	1000687

8 Referenzen

- 1 Qian, W. J.; Jacobs, J. M.; Camp, D. G. 2nd; Monroe, M. E.; Moore, R. J.; Gritsenko, M. A.; Calvano, S. E.; Lowry, S. F.; Xiao, W.; Moldawer, L. L.; Davis, R. W.; Tompkins, R. G.; Smith, R. D. *Proteomics* **2005**, 5, 572-84.
- 2 Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J. *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. ed.; Georg Thieme Verlag Stuttgart: New York, 1994.
- 3 Tirumalai, R. S.; Chan, K. C.; Prieto, D. A.; Issaq, H. J.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D. *Mol Cell Proteomics* **2003**, 2, 1096-103.
- 4 Giddings, J. C. *J. Chromatogr. A* **1995**, 703, 3-15.
- 5 Brandis, H.; Otte, H. J. *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*, 5. ed.; Gustav Fischer Verlag : Stuttgart, 1984.
- 6 Balows, A. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed.; Am. Soc. for Microbiol.: Washington, 1991.
- 7 Matte, A.; Jia, Z.; Sunita, S.; Sivaraman, J.; Cygler, M. *J. Struct. Funct. Genomics* **2007**, 8, 45-55.
- 8 Rowan, A. D.; Buttle, D. J. *Methods Enzymol.* **1994**, 244, 555-68.
- 9 Rowan, A. D.; Buttle, D. J.; Barrett, A. J. *Biochem. J.* **1990**, 266, 869-75.
- 10 Munzig, E.; Eckert, K.; Harrach, T.; Graf, H.; Maurer, H. R. *FEBS Lett.* **1994**, 351, 215-8.
- 11 Harrach, T.; Eckert, K.; Schulze-Forster, K.; Nuck, R.; Grunow, D.; Maurer, H. R. *J. Protein Chem.* **1995**, 14, 41-52.
- 12 Rowan, A. D.; Buttle, D. J.; Barrett, A. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, 267, 262-70.

- 13 Harrach, T.; Eckert, K.; Maurer, H. R.; Machleidt, I.; Machleidt, W.; Nuck, R. *J. Protein Chem.* **1998**, *17*, 351-61.
- 14 Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6th ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, 2008.
- 15 Turula, V. E.; Bishop, R. T.; Ricker, R. D.; de Haset, J. A. *J. Chromatogr. A* **1997**, *763*, 91-103.
- 16 Léonil, J.; Molle, D.; Gaucheron, F.; Arpino, P.; Guénot, P.; Maubois, J. L. *Lait* **1995**, *75*, 193-210.
- 17 Huber, C. G.; Premstaller, A. *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 161-73.
- 18 Czerwenka, C.; Maier, I.; Potocnik, N.; Pittner, F.; Lindner, W. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5165-72.
- 19 Sachs, L.; Hedderich, J. *Angewandte Statistik*, 12th ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, 2006.
- 20 Wieser, H.; Antes, S.; Seilmeier, W. *Cereal Chem.* **1998**, *75*, 644-50.
- 21 Dairman, T. *Diabetes Self Manag.* **2005**, *22*, 101, 103.
- 22 Case, S. *Gastroenterology* **2005**, *128*, 128-34.
- 23 Helms, S. *Altern. Med. Rev.* **2005**, *10*, 172-92.
- 24 Costantini, S.; Rossi, M.; Colonna, G.; Facchiano, A. M. *J. Mol. Graph. Model.* **2005**, *23*, 419-31.
- 25 Sollid, L. M. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 647-55.
- 26 Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G. M.; Sollid, L. M.; Khosla, C. *Science* **2002**, *297*, 2275-9.

- 27 Sanchez, D.; Tuckova, L.; Burkhard, M.; Plicka, J.; Mothes, T.; Hoffmanova, I.; Tlaskalova-Hogenova, H. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2627-32.
- 28 Hekkens, W. T. *Panminerva Med.* **1991**, *33*, 61-4.