

**Massenspektrometrische Untersuchung
von Membranproteinen durch den Einsatz
weniger spezifischer Proteasen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Benjamin Rietschel
aus Offenbach am Main

Frankfurt (2010)
(D30)

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Herr Prof. Dr. Michael Karas
Herr Prof. Dr. Hermann Schägger

Datum der Disputation: 20. Juli. 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	9
Danksagung.....	11
1. Einleitung.....	15
1.1 Membranproteine	15
1.1.1 Funktion, Aufbau und Struktur	15
1.1.2 Bacteriorhodopsin aus Purpurmembranen als Modellsystem	20
1.1.3 Das Membranproteom von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	23
1.1.4 Analytik von Membranproteinen	26
1.2 Aufreinigung und Solubilisierung	29
1.2.1 Isolierung und Anreicherung	29
1.2.2 Solubilisierung in wässrigen Lösungen	31
1.2.3 Solubilisierung in organischen Lösungen.....	34
1.3 Trennstrategien	36
1.3.1 Methoden zur Proteintrennung	36
1.3.2 Methoden zur Peptidtrennung	40
1.4 Proteolyse	43
1.4.1 Proteasen.....	43
1.4.2 Serinproteasen	44
1.4.3 Aspartatproteasen	53
1.4.4 Cystein- und Metalloproteasen.....	55
1.4.5 Chemische Spaltreagenzien	56
1.4.6 Die optimale Protease zur Hydrolyse von Membranproteinen.....	57
1.5 Massenspektrometrie.....	61
1.5.1 Instrumentation für Biomolekül-Massenspektrometrie	61
1.5.2 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation.....	63
1.5.3 Das MALDI-TOF-Flugzeitmassenspektrometer.....	65
1.5.4 Elektrospray-Ionisation	69
1.5.4 Das ESI-LIT-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer	70
1.5.5 Fragmentierungsverhalten von Peptiden.....	73
1.5.6 Datenbanksuchen	76

2.	Zielsetzung	81
3.	Material und Methoden.....	85
3.1	Verwendete Materialien	85
3.1.1	Biologische Materialien	85
3.1.2	Proteolytische Enzyme	86
3.1.3	Protein- und Peptidstandards	87
3.1.4	Andere Chemikalien.....	87
3.2	Proteolyseprotokolle	88
3.2.1	Elastase-Verdau von löslichen Proteinen	88
3.2.2	Elastase-Verdau von cytosolischen Proteomen	88
3.2.3	Elastase-Verdau von Membranproteomen	89
3.2.4	Verdau mit anderen Serinproteasen.....	89
3.2.5	Pepsin-Verdau von Membranproteomen	90
3.2.6	Elastase-Vorverdau zum Entfernen löslicher Proteinanteile	90
3.2.7	Verdau mit Elastase im Polyacrylamidgel	91
3.3	Massenspektrometrie.....	92
3.3.1	MALDI-TOF-MS im positiven Reflektormodus	92
3.3.2	MALDI-TOF-MS im negativen Reflektormodus	93
3.3.3	MALDI-Orbitrap-MS im positiven Reflektormodus	93
3.3.4	MALDI-TOF/TOF-MS/MS	94
3.3.5	Datenbanken.....	94
3.3.6	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>	95
3.3.7	Suche von MS/MS-Spektren	95
3.4	Nano-HPLC-MS/MS-Methoden	96
3.4.1	Nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF auf der Agilent <i>HP 1100</i>	96
3.4.2	Nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF auf der Proxeon <i>EASY-nLC</i>	98
3.4.3	nLC-ESI-LIT-Orbitrap	99
3.4.4	MudPIT	101
3.4.5	<i>Off-gel</i> IEF/nLC-MALDI-TOF/TOF.....	102
3.4.6	Kombination von MALDI-Orbitrap-MS und MALDI-TOF/TOF-MS/MS.....	103
3.5	Weitere Methoden.....	105
3.5.1	Tris-Tricin-SDS-PAGE.....	105
3.5.2	Berechnung physikochemischer Eigenschaften.....	105
3.5.3	3D-Strukturmodelle.....	106
4.	Ergebnisse	109
4.1	Aufbau des Ergebnisteils	109
4.2	Proteolyse von Membranproteinen mittels Elastase	111
4.2.1	Proteolyse durch Elastase unter Zusatz von Methanol	111
4.2.2	Einfluss der Methanolkonzentration auf die Proteolyse	115
4.2.3	Einfluss der Methanolkonzentration bei einer komplexeren Probe	117

4.2.4	Proteolyse in verschiedenen Lösungsmittelsystemen	119
4.2.5	Einfluss der Proteolysezeit	122
4.2.6	Verdau von BR in einem Polyacrylamidgel	123
4.2.7	Messung des BR-Elastase-Verdau im negativen Reflektormodus	125
4.2.8	Elastase für den Verdau von Nicht-Membranproteinen.....	127
4.3	LC/MS-Analyse elastatisch verdauter Membranproteome	129
4.3.1	1D-nLC-MS/MS	129
4.3.2	Vergleich zwischen Trypsin und Elastase am Beispiel PM	131
4.3.3	Membranproteomanalyse mittels nLC-MALDI- und nLC-ESI-MS/MS	135
4.3.4	Physikochemischer Vergleich von MALDI-TOF/TOF und ESI-Orbitrap	140
4.3.5	Reproduzierbarkeit der nLC-Versuche	145
4.3.6	Spezifitätsanalyse pankreatischer Elastase	147
4.3.7	1D-nLC-MS/MS mit verkürztem Gradienten	149
4.3.8	Vergleich der tryptischen und elastatischen Spezifität.....	151
4.4	Off-Gel IEF/nLC elastatisch verdauter Membranproteome.....	152
4.4.1	Off-Gel IEF mit Membranproteom-Proben	152
4.4.2	Vergleich zwischen 1D-nLC und 2D-Off gel IEF/nLC	155
4.4.3	Kurzer Vergleich mit MudPIT	159
4.5	Datenbanksuchen mit weniger spezifischen Datensätzen.....	161
4.5.1	Einfluss der elastatischen Spezifität auf PMF- und MS/MS-Suchen	161
4.5.2	Einfluss der Suchgenauigkeit auf PMF- und MS/MS-Suchen.....	163
4.5.3	Berechnete Auswirkung einer verbesserten Massengenauigkeit	165
4.5.4	Proben transfer von MALDI-Orbitrap zu MALDI-TOF/TOF	166
4.5.5	Kombinierte Suche von Orbitrap-MS und TOF/TOF-MS/MS-Daten.....	169
4.6	MS/MS-Fragmentierungsstatistik elastatischer Peptide	171
4.6.1	Allgemeine Statistik der entstehenden Fragment-Ionen.....	171
4.6.2	Bruchstatistik in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz	173
4.6.3	Gerichtete Fragmentierung im Bezug auf bestimmte Aminosäuren.....	176
4.7	Andere weniger spezifische Proteasen	180
4.7.1	PMF-Analyse mit Chymotrypsin, Glu-C, Proteinase K und Pepsin	180
4.7.2	Vergleich mit dem Pepsin-Referenzprotokoll.....	184
4.7.3	Peptische nLC-MALDI-MS/MS-Analyse von PM.....	186
4.7.4	Spezifitätsanalyse von Pepsin.....	189
5.	Diskussion	193
5.1	Elastase im Membranproteomics-Einsatz	193
5.1.1	Charakterisierung und Spezifitätsanalyse	193
5.1.2	Verdau von Membranproteinen	196
5.1.3	Die Vorfraktionierung mittels Off-Gel IEF.....	201
5.1.4	Vergleich der Instrumentenplattformen.....	205
5.1.5	Datenbanksuchen	208
5.1.6	Kombination von Orbitrap-MS und TOF/TOF-MS/MS-Daten.....	212

5.2	Andere Proteasen	214
5.2.1	Glu-C, Chymotrypsin und Proteinase K.....	214
5.2.2	Pepsin.....	216
5.3	Fazit und Ausblick	218
6.	Zusammenfassung	225
7.	Abkürzungsverzeichnis	229
8.	Literaturverzeichnis	237
9.	Anhang	255
9.1	Proteintabellen	255
9.2	Peptidtabellen	280
9.3	Proteolyseprotokolle	303
9.4	Publikationsverzeichnis	307
9.4.1	Artikel in Fachzeitschriften.....	307
9.4.2	Vorträge.....	307
9.4.3	Posterpräsentationen.....	308
9.5	Lebenslauf	309
9.6	Eidesstattliche Versicherung	311

Abbildungsverzeichnis

1-1	Darstellung verschiedener Typen an Membranproteinen	16
1-2	Vorhersage von Transmembranhelices am Beispiel von Bacteriorhodopsin.....	18
1-3	Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Bacteriorhodopsins	21
1-4	Biosynthese von L-Lysin in <i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730	24
1-5	Allgemeiner Ablauf von <i>bottom up</i> Membranproteomics-Experimenten	27
1-6	Position von Methanol- und Ethanolmolekülen im Membranquerschnitt.....	35
1-7	Die katalytische Triade der Serinproteasen.....	45
1-8	Nomenklatur der Seitenketten und enzymatischen Bindestellen an der Spaltstelle	46
1-9	3D-Strukturmodelle von Trypsin	48
1-10	3D-Strukturmodelle weiterer Serinproteasen.....	49
1-11	Strukturvergleich von Chymotrypsin und Elastase.....	51
1-12	Aktives Zentrum der Aspartatprotease Pepsin	54
1-13	Einschränkungen bestehender Protokolle zur Proteolyse von Membranproteinen.....	60
1-14	Schematische Darstellung des 4800 TOF/TOF Analyzers	68
1-15	Schematische Darstellung des LTQ-Orbitrap-Massenspektrometers	72
1-16	Fragmentbildung und Nomenklatur am Beispiel eines Tripeptids	73
1-17	Statistik von <i>low-energy</i> CID-Bindungsbrüchen in einem ESI-QIT-Instrument.....	75
1-18	Entstehende Peptidkomplexität bei spezifischen und nichtspezifischen Verdau	77
3-1	Übersicht über die beim MALDI- <i>Spotting</i> verwendeten nano-HPLC-Gradienten.....	97
3-2	Ablauf zur Erzeugung eines Datensatzes aus Orbitrap und TOF/TOF-Daten.....	104
4-1	Übersicht der vorgestellten Ergebnisse.....	110
4-2	MS-Spektren tryptisch und elastatisch verdauter Purpurchmembranen	112
4-3	PMF-Sequenzabdeckung von Bacteriorhodopsin mit Trypsin und Elastase	114
4-4	Einfluss der Methanol-Konzentration auf den Bacteriorhodopsin-Verdau mit Elastase	115
4-5	Einfluss des Methanol-Konzentration auf den Purpurchmembran-Verdau mit Elastase	118
4-6	Elastase-Verdau von PM in verschiedenen Lösungsmittelsystemen.....	119
4-7	Spektren der Elastase-Verdau von PM in <i>n</i> -Butanol und Acetonitril	121
4-8	Zeitlicher Verlauf eines Elastase-Verdau von Bacteriorhodopsin	122
4-9	„In Gel“-Verdau von Bacteriorhodopsin mit Elastase.....	124
4-10	Elastase-Verdau von BR bei Detektion im negativen MALDI-TOF-Reflektormodus	125
4-11	Verdau von Rinderserumalbumin mit Elastase.	128
4-12	Schnittmengen identifizierter PM-Proteine bei Analyse mit Trypsin und Elastase.....	131
4-13	Sequenzabdeckung von BR im nLC-MS/MS-Vergleich zwischen Trypsin und Elastase	133

4-14	Darstellung des zeitlichen Verlaufs eines elastatischen CGM-Verdaus im Gel.....	136
4-15	Schnittmengen identifizierter PM- und CGM-Proteine bei Analyse mit ESI und MALDI.....	138
4-16	Sequenzabdeckung von Bacteriorhodopsin mit nLC-ESI-Orbitrap-MS/MS.....	139
4-17	GRAVY und pI-Verteilung elastatischer Purpurmbran und <i>C. glutamicum</i> -Peptide.	141
4-18	Physikochemische Statistik der elastatischen nLC-MS/MS-Experimente.....	143
4-19	Vorhergesagtes Sekundärstruktur-Modell der <i>C. glutamicum</i> Cytochrom c-Oxidase I.....	144
4-20	Chromatogramme der nLC-Auftrennung.....	145
4-21	Statistik der elastatischen Spezifität basierend auf 6.577 ausgewerteten Peptiden.....	148
4-22	Vergleich der tryptischen und elastatischen Spezifität.....	151
4-23	Darstellung der <i>Off-Gel</i> IEF-Fraktionierungs-Ergebnisse.....	153
4-24	Vergleich der Ergebnisse von 1D-nLC und 2D- <i>off-gel</i> IEF/nLC.....	156
4-25	BR-Sequenzabdeckung bei 2D- <i>off-gel</i> IEF/nLC-MALDI-MS/MS-Analyse.....	157
4-26	Darstellung der MudPIT-Fraktionierung.....	160
4-27	Elastasespezifität bei PMF- und MS/MS-Datenbanksuchen.....	162
4-28	Suchgenauigkeit bei unspezifischen PMF- und MS/MS-Datenbanksuchen.....	164
4-29	Darstellung des Ergebniszuwachses durch bessere Suchgenauigkeit.....	165
4-30	Wiederfindung von <i>Precursor</i> -Massen nach Rücklösen und Umspotten.....	166
4-31	Beeinflussung der Spektren durch das Umspotten der Probe.....	167
4-32	Tendenz des Auftretens amino- und carboxyterminaler Brüche.....	173
4-33	Bruchstatistik des MS/MS-Datensatzes.....	175
4-34	Gerichtete Fragmentierung nach einer definierten Aminosäure I.....	177
4-35	Gerichtete Fragmentierung nach einer definierten Aminosäure II.....	179
4-36	Spektren von Purpurmbran-Verdaus mit alternativen Proteasen.....	183
4-37	Spektren von peptischen Purpurmbran-Verdaus.....	185
4-38	Sequenzabdeckung von BR bei peptischer nLC-MALDI-MS/MS-Analyse.....	188
4-39	Peptische Spezifität basierend auf 509 ausgewerteten Peptiden.....	189
5-1	Physikochemische Eigenschaften der Aminosäuren.....	194
5-2	Häufigkeit des Auftretens von Schnitten in einem Leucincluster.....	195
5-3	Anteil der BR-Peptide beim Verdau von Purpurmbranen mit Trypsin und Elastase.....	198
5-4	Anteil der TM-Peptide beim Verdau von Purpurmbranen mit Trypsin und Elastase.....	199
5-5	Ladung von Peptiden in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	201
5-6	Orthogonalität der verwendeten 2D-Trennmethode MudPIT und OGE/C18-nLC.....	204
5-7	Klassifizierung der Transmembranpeptide.....	207
5-8	Auswirkung des Spezifitätsmaßes auf die entstehende Peptidpopulation.....	208
5-9	Kombination der Daten zweier MALDI-Geräte.....	213

Tabellenverzeichnis

1-1	Übersicht gängiger Massenspektrometer	62
3-1	Verwendete biologische Proben	85
3-2	Verwendete proteolytische Enzyme	86
3-3	Verwendete Datenbanken.....	94
3-4	Auf der Agilent <i>HP 1100</i> ausgeführte nLC-Experimente (135 min-Gradient).....	96
3-5	Auf der Proxeon <i>EASY-nLC</i> ausgeführte nLC-Experimente (80 min-Gradient)	99
3-6	Auf der Thermo <i>Accela</i> nLC ausgeführte nLC-Experimente (150 min-Gradient)	99
3-7	MudPIT-Experimente auf der Thermo <i>Accela</i> nLC (100 bzw. 180 min-Gradient)	101
3-8	Auf der Agilent <i>HP 1100</i> ausgeführte nLC-Experimente (72 min-Gradient).....	102
3-9	Auf der Proxeon <i>EASY-nLC</i> ausgeführte nLC-Experimente (80 min-Gradient)	103
3-10	Verwendete 3D-Strukturdaten	106
4-1	Daten und Parameter zum PMF-Vergleich zwischen Trypsin und Elastase.....	113
4-2	Zusammenfassung der 1D-nLC-MS/MS-Daten.....	130
4-3	Zusammenfassung sämtlicher Proxeon <i>EASY-nLC</i> -MALDI-MS/MS Daten	149
4-4	Vergleich von 1D-nLC und 2D-OGE/nLC	155
4-5	Vergleich von MudPIT und OGE/nLC.....	159
4-6	Vergleich von reinen TOF/TOF und den erzeugten Hybrid-Daten.....	170
4-7	Übersicht über die entstehenden Fragment-Ionen	172
4-8	PMF-Daten und Parameter zum PM-Verdau mit alternativen Proteasen	181
4-9	Vergleich von peptischen und elastatischen PM-Verdau per nLC-MALDI-MS/MS	186
5-1	Bewertung der einzelnen Proteasen für den <i>Proteomics</i> -Einsatz.....	219
9-1A	nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpurmembranen, Trypsin, 30 ppm	255
9-1B	nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpurmembranen, Elastase, 30 ppm	256
9-1C	nLC-MALDI-TOF/TOF, <i>Corynebacterium</i> DM1698-Membranen, Elastase, 30 ppm	257
9-1D	nLC-ESI-LIT-Orbitrap, Purpurmembranen, Elastase, 5 ppm.....	260
9-1E	nLC-ESI-LIT-Orbitrap, <i>Corynebacterium</i> DM1698-Membranen, Elastase, 5 ppm.....	262
9-2A	nLC-MALDI-TOF/TOF, <i>Corynebacterium</i> DM1730-Membranen, Elastase, 30 ppm	269
9-2B	nLC-MALDI-TOF/TOF, <i>Corynebacterium</i> DM1730-Membranen, Trypsin, 30 ppm	270
9-3A	nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpurmembranen, Elastase, 30 ppm	272
9-3B	nLC-MALDI-TOF/TOF, <i>Corynebacterium</i> DM1730-Membranen, Elastase, 30 ppm	272
9-3C	OGE/nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpurmembranen, Elastase, 30 ppm.....	273
9-3D	OGE/nLC-MALDI-TOF/TOF, <i>Corynebacterium</i> DM1730-Membranen, Elastase, 30 ppm.....	274
9-4A	nLC-MALDI-TOF/TOF bzw. -Orbitrap, Purpurmembranen, Elastase, 50 bzw. 5 ppm	275

9-4B	nLC-MALDI-TOF/TOF bzw. -Orbitrap, <i>C.g.</i> DM1730-Cytosol, Elastase, 50 bzw. 5 ppm	276
9-5	nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpurchromatogramme, Pepsin, 30 ppm	279
9-6A	MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Trypsin, 30 ppm	280
9-6B	MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 10 ppm	280
9-7A	MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 20 ppm, 60% <i>n</i> -Butanol.....	281
9-7B	MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 20 ppm, 60% Acetonitril	282
9-8	MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 10 ppm, "in-Gel"-Verdau	282
9-9	MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, manuell, negativer Reflektormodus.....	283
9-10	MALDI-TOF-PMF, BSA, Elastase, 20 ppm	284
9-11A	nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Trypsin, 30 ppm	285
9-11B	nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 30 ppm.....	285
9-11C	nLC-ESI-LIT-Orbitrap, Bacteriorhodopsin, Elastase, 5 ppm	287
9-12	nLC-MALDI-TOF/TOF, Cytochrom c-Oxidase I, Elastase, 30 ppm.....	292
9-13A	nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 30 ppm.....	293
9-13B	OGE/nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 30 ppm	294
9-14A	MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Chymotrypsin, 5 ppm	296
9-14B	MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Proteinase K, 5 ppm	296
9-14C	MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Pepsin, 5 ppm.....	297
9-14D	MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 5 ppm.....	297
9-15	nLC-MALDI-TOF/TOF, Pepsin-Verdau von Bacteriorhodopsin, 30 ppm.....	298
9-16	nLC-MALDI-TOF/TOF, Elastase-Autoproteolyse, 30 ppm.....	299
9-17	Protokoll zum Verdau von Membranproteomen mit Elastase/Trypsin in Methanol	303
9-18	Protokoll zum Verdau von Membranproteomen mit Pepsin	304
9-19	Protokoll zum Verdau mit Elastase in einem Polyacrylamidgel.....	305

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Karas in der Zeit vom März 2006 bis Januar 2010 angefertigt.

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Michael Karas für die Möglichkeit, an diesem überaus interessanten und vielseitigen Thema zu arbeiten und die erarbeiteten Resultate auf nationalen als auch internationalen Tagungen präsentieren zu dürfen. Hervorragende Arbeitsbedingungen und die gewährte experimentelle Freiheit zeichnen seinen Arbeitskreis aus, dessen überaus harmonische Atmosphäre nicht zuletzt seinem guten Führungsstil zu verdanken sind.

Herrn Prof. Dr. Hermann Schägger für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

PD Dr. Ansgar Poetsch und seiner Arbeitsgruppe für die hervorragende Zusammenarbeit während des Elastase-Projekts.

Frau Dr. Ute Bahr für die Hilfsbereitschaft bei instrumentellen und wissenschaftlichen Fragen und der vorzüglichen und entspannten Semesterleitung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“.

Meinen Praktikumskollegen Tabiwang Arrey, Tobias Beckhaus, Adriane Lechtken und Anne Arnold für die gute und stets unterhaltsame Zusammenarbeit.

Dr. Björn Meyer für die umfassende Einführung in die Thematik und seine fachliche Unterstützung.

Allen meinen Kollegen der Arbeitsgruppe namentlich Dr. Marianne André, Anne Arnold, Tabiwang Arrey, Dominic Bäumlisberger, Tobias Beckhaus, Sandra Bornemann, Dr. Sabrina Baltruschat, Walter Eckhard, Jeremy Hack, Dr. Sandra Hack, Dr. Martin Hampel, Daniel Hierl, Dr. Tri Hoang, Dr. Corina Hunger, Thorsten Jaskolla, Stavroula Markoutsas, Benjamin Müller, Andreas Münch, Dimitrios Papatirou, Markus Persike, Marion Rohmer, Dr. Thomas Russ, Malte Schürken, Dr. Eric Schulz, Dorota Urbanek und Dr. Markus Weidlich. Alle haben zu dem angenehmen Arbeitsklima maßgeblich mit beigetragen.

Insbesondere Tabiwang Arrey, Dominic Bäumlisberger, Tobias Beckhaus, Sandra Bornemann und Marion Rohmer für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und fachliche Kompetenz im Laufe meiner Promotion.

Meiner Familie für die Unterstützung, Aufmerksamkeit, ihre Geduld und dass sie während meiner gesamten Promotion immer hinter mir gestanden haben.

Besonders herzlich möchte ich Sandra danken, die mir während den entscheidenden Phasen meiner Promotion sowohl privat als auch fachlich immer mit gutem Rat beiseite gestanden hat.

Kapitel 1

EINLEITUNG



1. Einleitung

1.1 Membranproteine

1.1.1 Funktion, Aufbau und Struktur

Biologische Membranen dienen innerhalb einer Zelle als Trennschicht zwischen verschiedenen Kompartimenten und sind für die Abgrenzung der Zelle nach außen verantwortlich. Während in vielen Organismen eine aufgelagerte Zellwand physische Stabilität verleiht, ist die Cytoplasmamembran die eigentlich funktionale Struktur. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die eine große Anzahl verschiedener Lipide und Membranproteine in einem Massenverhältnis zwischen 4 und 0,2 enthält. Beispielsweise weisen die isolatorischen Myelinmembranen der Neuronen einen sehr hohen Lipidanteil von 80% auf, während sich in den der Energiegewinnung dienenden Purpirmembranen der Halobakterien fünfmal mehr Proteine als Lipide befinden (Corcelli *et al.*, 2002). Neben ihrer passiven Funktion als Barriere sind biologische Membranen durch ihre Proteinbestandteile aktiv an vielen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt. Die Membranproteine vermitteln den Transport von Ionen, Metaboliten und anderen Molekülen und dienen somit der Zellhomöostase, Energiegewinnung und dem interzellulären Informationsfluss (Ott *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004). Durch ihre Beteiligung an zahlreichen wichtigen Prozessen und die erleichterte Zugänglichkeit durch die Lokalisation in der Membran sind diese Proteine als potentielle Zielstrukturen für Arzneistoffe prädestiniert. So ist es kein Zufall, dass ungefähr zwei Drittel aller Zielproteine von Arzneistoffen in der Membran enthalten sind, u.a. die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Cytochrom P450 und zahlreiche Transportproteine (Hopkins *et al.*, 2002; Russ *et al.*, 2005).

Um Interaktionen mit der Lipiddoppelschicht eingehen zu können, müssen die hydrophilen Anteile des Proteingerüsts von den hydrophoben Bereichen der Lipide abgeschirmt werden. Im Laufe der Evolution haben sich zwei Klassen von Membranproteinen entwickelt, welche auf den einzig beiden energetisch günstigen Sekundärstrukturen von längeren Peptidketten basieren. Die erste Gruppe, die β -Barrel-Proteine, werden von nur ca. 2-3% der Gene gram-negativer Bakterien codiert (Wimley, 2003). Sie besitzen

zahlreiche amphiphile β -Faltblattstrukturen, in denen sich die Peptidstränge antiparallel zueinander anordnen und eine die Lipidschicht durchdringende fassförmige Gesamtstruktur ausbilden (Abb. 1-1). Die an der Sekundärstrukturbildung beteiligten Peptidketten enthalten meistens abwechselnd polare und unpolare Aminosäuren, so dass sich alle hydrophoben Seitenketten zu den Lipiden hin orientieren können und die in die andere Richtung weisenden hydrophilen Aminosäurereste eine polare innere Pore ausbilden. Alle β -Barrels lassen sich durch zwei Parameter charakterisieren, durch die Anzahl der beteiligten Peptidstränge und die Scherungszahl (Murzin *et al.*, 1994a; Murzin *et al.*, 1994b). Diese beschreibt den Grad der Versetzung der einzelnen Stränge zueinander. Da die hydrophoben Bereiche nicht durch eine zusammenhängende Peptidsequenz entstehen, unterscheiden sich die β -Barrel-Transmembranproteine physikochemisch nicht von löslichen Proteinen. Deshalb sind aus analytischer Sicht keine speziellen Maßnahmen für die Untersuchung solcher Proteine zu treffen, lediglich ihre Aufreinigung in intakter Form kann problematisch sein (Scorza *et al.*, 2008; Rabilloud, 2009).

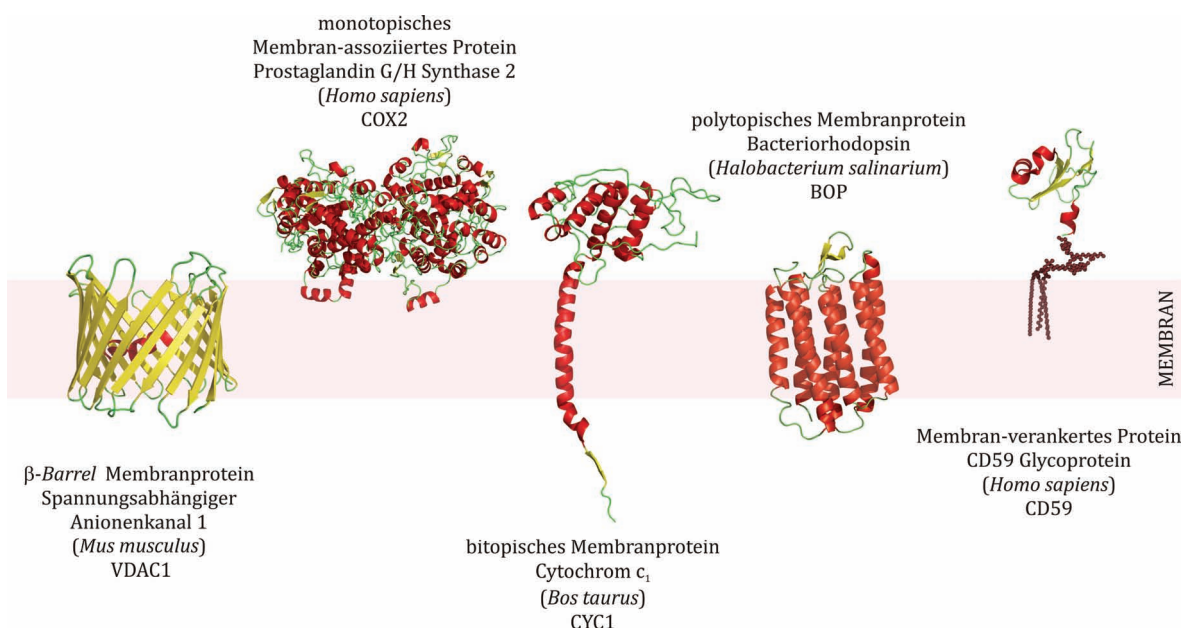


Abb. 1-1: Darstellung verschiedener Typen an Membranproteinen.

Die häufigsten Varianten von Membranproteinen werden anhand von ausgewählten Beispielen dargestellt. Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen verschiedene Sekundärstrukturen, β -Faltblätter sind gelb, α -Helices rot und Bereiche ohne definierte Struktur grün dargestellt.

Die mengenmäßig und funktionell bedeutendere Gruppe an Membranproteinen stellen die α -helikalen Proteine dar. Über 20% aller offenen Leserahmen zahlreicher Genome codieren für Membranproteine, deren membrangängigen Bereiche aus einer oder mehreren α -Helices bestehen (Wallin und von Heijne, 1998; Eichacker *et al.*, 2004). Je nach Anzahl und Topologie der helikalen Domänen werden verschiedene Typen unterschieden. Die monotopischen bzw. membranverankerten Proteine sind keine echten Transmembranproteine, da sie lediglich durch einen in die Lipidschicht eingelagerten Lipid- oder Proteinanker mit dieser verbunden sind (Abb. 1-1). Durchdringt das Protein vollständig die Membran, wird von bitopischen oder *single-pass*-Transmembranproteinen gesprochen. Sie besitzen auf beiden Seiten der Membran mehr oder weniger ausgedehnte globuläre Domänen. Viele Oberflächenantigene, Rezeptoren und Adhäsionsfaktoren sind bitopische Transmembranproteine (Hurwitz *et al.*, 2006). Zur letzten Gruppe an Membranproteinen gehören Proteine mit mehreren membrandurchspannenden Helices, die als Bündel senkrecht zur Membranebene angeordnet sind (Bowie, 1997). Diese polytopischen *multi-pass*-Transmembranproteine können Poren zum Ionen- und Molekültransport ausbilden und übernehmen deshalb oft Funktionen als Transportproteine. Bitopische und polytopische Membranproteine werden allgemein als integrale Membranproteine bezeichnet. Die Primärsequenzen der α -helikalen Abschnitte enthalten überwiegend hydrophobe Aminosäuren, da fast jede Aminosäure-Seitenkette in direktem Kontakt zur Lipiddoppelschicht steht. Lediglich bei Interaktionen mit anderen sich in der Membran befindenden Proteinen oder zur Ausbildung hydrophiler Poren können größere Mengen polarer oder geladener Aminosäuren in der Helix vorhanden sein.

Für die Abschätzung der Hydrophobizität einzelner Sequenzabschnitte wird häufig der *GRAVY-Score* genutzt, der einen repräsentativen Hydrophobizitäts-Mittelwert der Aminosäure-Zusammensetzung darstellt (Kyte und Doolittle, 1982). Spezielle Algorithmen nutzen diese Informationen, um in den Proteinsequenzen eventuell vorhandene α -helikale Bereiche zu finden. Sie erkennen durch die Erzeugung sogenannter *Hydrophathie-Plots* (*Kyte-Doolittle-Plots*), ob Sequenzabschnitte mit ausreichender Hydrophobizität vorliegen, deren Mindestlänge zum Überbrücken einer Lipidschicht ausreichen würde (Abb. 1-2). Die gängigsten Algorithmen *TMHMM2*, *SOSUI*, *HMMTOP2* und *Phobius* erzielen durchweg gute Resultate bei der Unterscheidung zwischen löslichen und membrangängigen Proteinen und werden deshalb oft zum Vergleich der Effektivität analytischer Methoden herangezogen (Hirokawa *et al.*, 1998; Krogh *et al.*, 2001; Tusnady und Simon, 2001; Kall *et al.*, 2004).

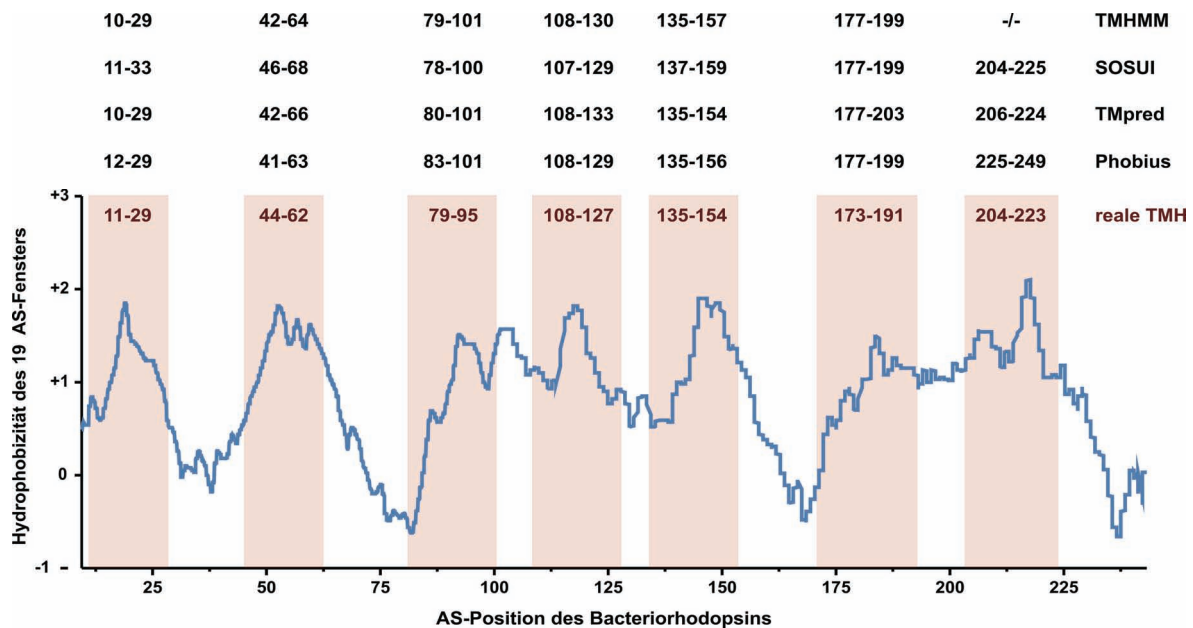


Abb. 1-2: Vorhersage von Transmembranhelices am Beispiel von Bacteriorhodopsin.

Kyte-Doolittle-Hydrophathie-Plot des α -helikalen *multi-pass*-Membranproteins Bacteriorhodopsin. Es wird jeweils die durchschnittliche Hydrophathie eines 19 Aminosäuren umfassenden Fensters wiedergegeben. Positive GRAVY-Werte kennzeichnen hydrophobe und somit potentielle Helixbereiche. Die real im Beispielprotein vorkommenden Transmembranhelices sind mitsamt ihrer Aminosäure-Intervalle rot dargestellt. Zusätzlich sind die Aminosäure-Positionen der Transmembranhelices angegeben, welche von vier gängigen Algorithmen zur Auffindung solcher Bereiche vorhergesagt werden.

Die α -helikalen *multi-pass*-Transmembranproteine sind im Vergleich zu anderen Proteinen ungewöhnlich stabil. Obwohl die unpolaren Aminosäuren dominieren, sind die innerhalb der Membran liegenden den anderen Proteinbestandteilen zugewandten Seiten deutlich polarer als in löslichen Proteinen (Rees *et al.*, 1989). Dadurch ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten für Wasserstoffbrücken-Bindungen, die den Proteinkern stabilisieren (Adamian und Liang, 2002). Zusätzlich fallen in den hydrophoben Bereichen der Lipiddoppelschicht die Wasserstoffbrücken sehr stark aus, da die Stärke von elektrostatischen Bindungen nicht wie in wässrigen Lösungen durch die hohe Dielektrizität des Wassers herabgesetzt wird (White und Wimley, 1999; Chamberlain *et al.*, 2003). Einige Membranproteine sind so stabil, dass selbst in Anwesenheit starker Detergenzien keine vollständige Entfaltung erfolgt. So konnte mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass Bacteriorhodopsin selbst in Anwesenheit des sehr starken Detergenzes Natrium-

Dodecylsulfat (SDS) nicht vollständig denaturiert vorliegt. Es ist immer noch ein α -helikaler Anteil vorhanden, der ungefähr vier der insgesamt sieben Transmembranhelices entspricht (Riley *et al.*, 1997).

Neben den eigentlichen integralen Membranproteinen sind noch zahlreiche weitere Proteine über nichtkovalente Interaktionen mit der Membran assoziiert. Da sie sich relativ einfach durch Behandlung mit alkalischen Lösungen oder Hochsalzpuffern entfernen lassen und sich ansonsten nicht von löslichen Proteinen unterscheiden, stellen sie keine besondere Herausforderung für die Proteinanalytik dar (Pedersen *et al.*, 2003; Schluesener *et al.*, 2005).

1.1.2 Bacteriorhodopsin aus Purpurmembranen als Modellsystem

Um die erstmalige Anwendung einer neu entwickelten analytischen Methode zu evaluieren, ist es sinnvoll, ein einfaches Modellsystem zu verwenden. Das Membranprotein Bacteriorhodopsin wird in vielen Fällen als Modellprotein für α -helikale integrale Transmembranproteine herangezogen, da es sich relativ einfach und kostengünstig in größeren Mengen herstellen lässt und zudem auch kommerziell erhältlich ist. Bei Bacteriorhodopsin (BR) handelt es sich um eine lichtabhängige H^+ -ATPase, die ihrem Wirtsorganismus, dem extrem halophilen Euryarchaeon *Halobacterium salinarium*, ermöglicht, bei hoher Lichtintensität unter Sauerstoffmangel zu wachsen. Das Apoprotein besteht aus 248 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von ca. 27 kDa. Ein hoher Anteil von circa 80% der Aminosäuresequenz bildet sieben Transmembranhelices aus, die restlichen 20% liegen als externe Schleifen vor (Abb. 1-3A). Im Inneren des Proteins befindet sich das Chromophor Retinal als prosthetische Gruppe, welches kovalent als Schiff'sche Base an Lysin 216 gebunden vorliegt und dem Holoprotein seine purpurne Farbe verleiht. Über einen Photozyklus, der eine Isomerisierung des Retinals und eine damit verbundene De- und Reprotonierung der Schiff'schen Base beinhaltet, kann über die Aspartatreste 85 und 96 ein Protonentransport durch die Membran erfolgen, der vom Archaeon zur Energiegewinnung eingesetzt wird.

Das Protein kommt ausschließlich in den sogenannten Purpurmembranen (PM) vor, die gesonderte Bereiche der archaealen Membran mit definierter pseudokristalliner Struktur darstellen. Sie bestehen aus 75% Bacteriorhodopsin und 25% Dihydrophytyl-Isoprenoidlipiden, die in zweidimensionalen hexagonalen Zellen organisiert sind. Jede Zelleinheit enthält ein Bacteriorhodopsin-Trimer (Abb. 1-3B), 28 Lipid- und 8.410 Wassermoleküle (Tajkhorshid *et al.*, 2000; Baudry *et al.*, 2001).

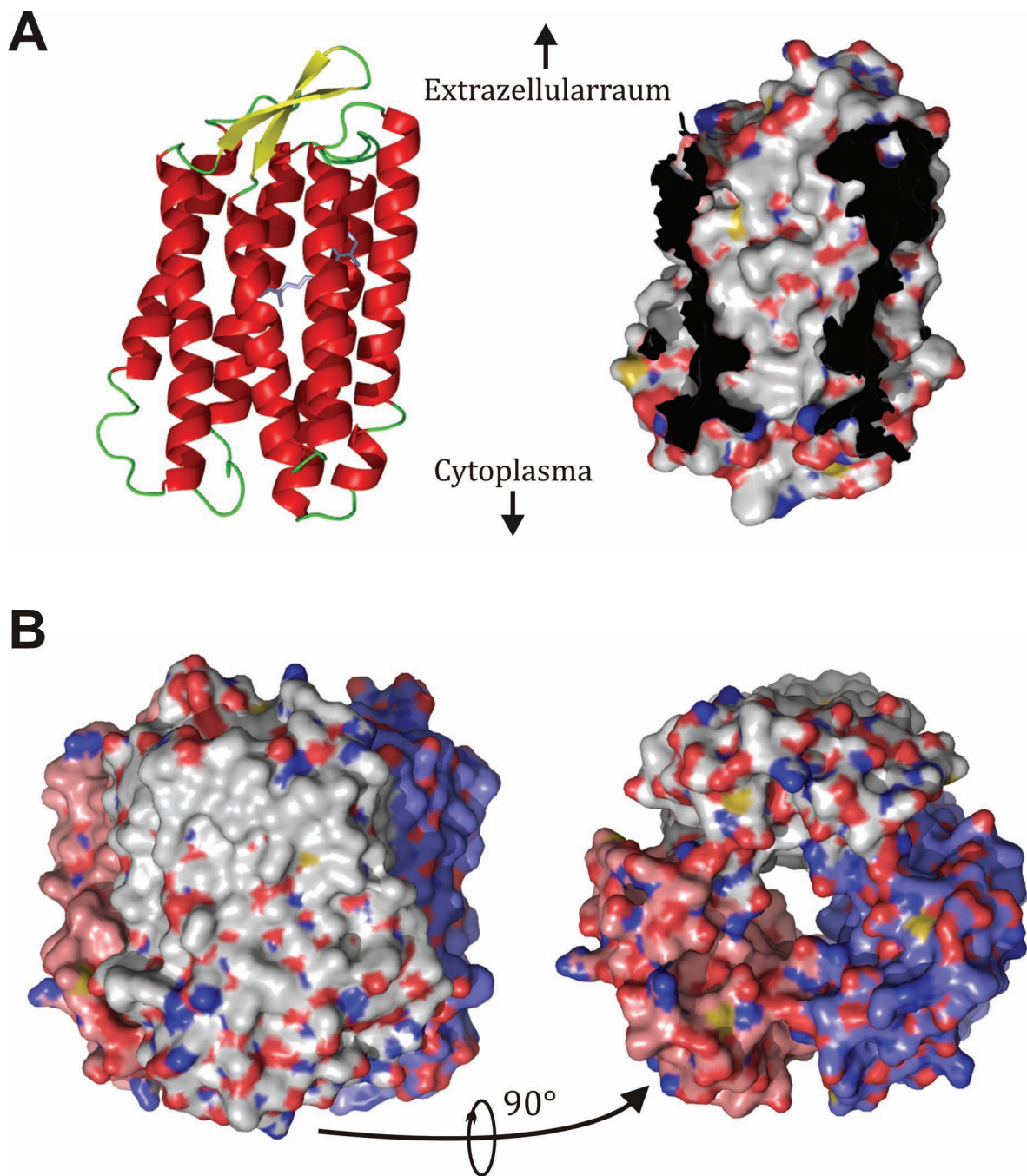


Abb. 1-3: Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Bacteriorhodopsins.

(A) Monomere Form des Bacteriorhodopsins im Sekundärstrukturmodell (links; helikale Bereiche rot, Faltblätter gelb und Schleifen grün, Retinal violett dargestellt) und als raumfüllendes Modell (rechts), in dem die Kontaktzonen zu anderen Bacteriorhodopsin-Molekülen im Trimer schwarz dargestellt sind. (B) Darstellung des Bacteriorhodopsin-Trimers von der Seite (links) und vom Cytoplasma aus (rechts). Die drei Monomere sind unterschiedlich eingefärbt (rosa, hellblau, weiß). In den raumfüllenden Modellen sind Stickstoffatome dunkelblau, Sauerstoffatome rot, Schwefelatome gelb und Kohlenstoff- und Wasserstoffatome weiß eingefärbt. (3D-Strukturmodelle siehe Tab. 3-10).

Da sich Purpurmembranen von den anderen Membranbereichen in ihrer Dichte unterscheiden, können sie getrennt isoliert werden. Entsprechende Proben enthalten dann im Wesentlichen Bacteriorhodopsin als Proteinkomponente, allerdings sind Kontaminationen mit einigen anderen Membranproteinen nahezu unvermeidbar. Neben anderen Proteinen lässt sich häufig das einzige Zellwandprotein von *H. salinarium*, das 87 kDa schwere *S-Layer Cell Surface Glycoprotein* (CSG), in Purpurmembran-Präparationen nachweisen (Lechner und Sumper, 1987; Blonder *et al.*, 2006a). Neben einer kleinen membranverankernden Region besitzt es eine ausgeprägte, sehr hydrophile extrazelluläre Struktur, die den analytischen Methoden allgemein sehr gut zugänglich ist. Durch diese spezielle Proteinverteilung eignen sich Purpurmembranen hervorragend für die Methodenentwicklung, da neben der Möglichkeit zur detaillierten Analyse des überabundanten Bacteriorhodopsins auch eine komplexere Probe mit einem hohen dynamischen Bereich durch die weiteren Proteinkontaminationen simuliert wird.

1.1.3 Das Membranproteom von *Corynebacterium glutamicum*

Den nächsten Schritt nach der initialen Evaluierung einer Methode stellt ihr Transfer auf ein komplexeres Membranproteom dar. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Membranproteom von zwei Stämmen des aeroben, gram-positiven Bodenbakteriums *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita *et al.*, 1959; Abe *et al.*, 1967) verwendet. Das keulenförmige („coryneforme“) und nicht humanpathogene Bakterium wird in der klinischen Forschung als Modell für die verwandten Pathogene *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* angesehen und biotechnologisch zur Synthese von Vitaminen, Nukleotiden und nahezu aller biogenen Aminosäuren eingesetzt (Pascual *et al.*, 1995; Leuchtenberger, 1996; Hermann, 2003; Leuchtenberger *et al.*, 2005). Dieses Einsatzgebiet reicht bis zur namensgebenden Entdeckung des Keims als natürlichen Glutamat-Produzenten zurück (Kinoshita *et al.*, 1959), welches in großem Maßstab von der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker eingesetzt wird. Neben der Synthese von L-Glutamat besitzt auch die Herstellung des überwiegend als Futtermittelzusatz verwendeten L-Lysins eine große biotechnologische Bedeutung. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden zuerst kostenintensive auxotrophe Stämme und spezielle „Leaky Strains“ verwendet (Shio und KJ, 1969; Hilliger und Hertel, 1997), mit Fortschreiten der Molekularbiologie aber auch selektierte Zufallsmutanten (Stemmer 1994; Chen und Arnold, 1993), die größere Mengen der gewünschten Stoffe herstellen. Einer der in dieser Arbeit verwendeten Stämme, DM1698, stammt aus einer solchen Zufallsmutagenese, welche von der Degussa AG durchgeführt wurde. Da auf diese Weise aber genetisch nicht charakterisierte Stämme erzeugt werden, bildet die gezielte Deletion und Überexpression von Genen der entsprechenden Biosynthesewege die aktuell angewandte Strategie. (Ohnishi *et al.*, 2002; Koffas *et al.*, 2003). Durch gezielte Mutation der Stoffwechsellzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf*), Homoserin-Dehydrogenase (*hom*), Aspartat-Kinase (*lysC*) und Pyruvat-Decarboxylase (*pyc*) konnte der andere in dieser Dissertation behandelte Produktionsstamm DM1730 erzeugt werden. In diesem wird die negative Rückkopplung der Produkte L-Lysin und L-Threonin verhindert und der Syntheseweg zur Bildung von L-Lysin kanalisiert (Abb. 1-4). Mit diesem Stamm können Lysin-Konzentrationen von bis zu 80 g/l im Nährmedium erreicht werden.

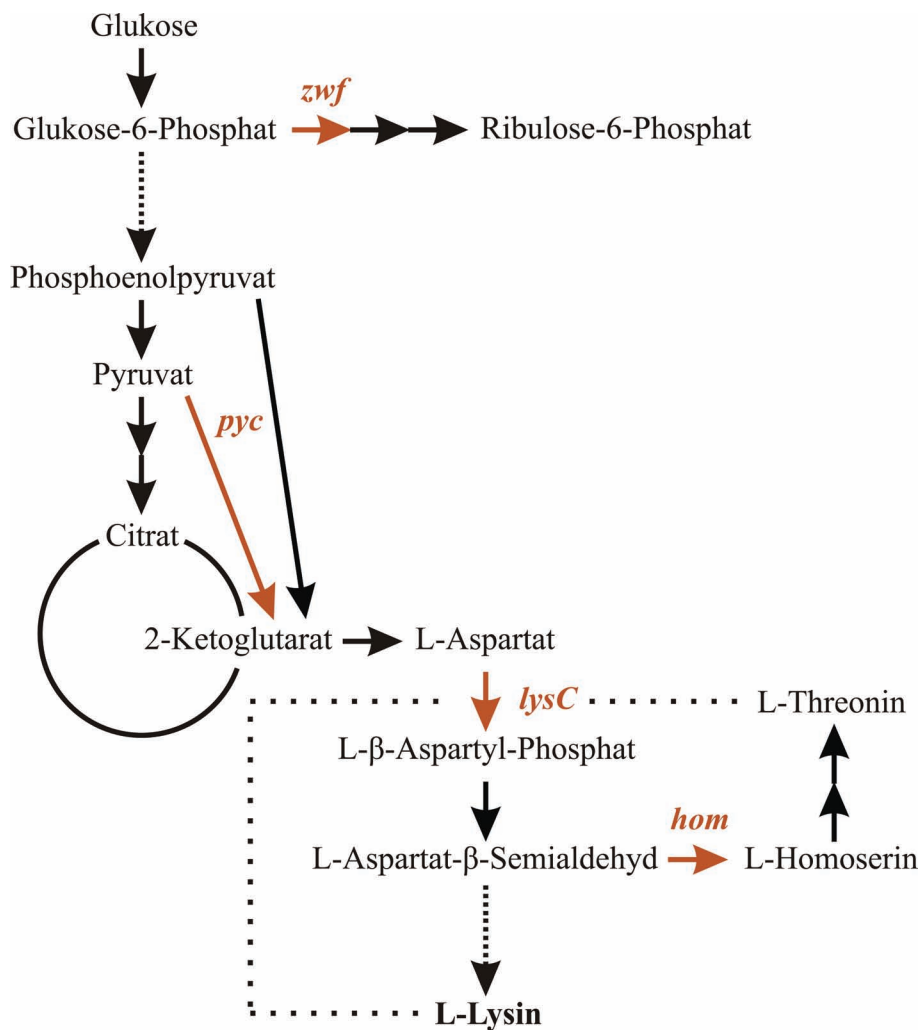


Abb. 1-4: Biosynthese von L-Lysin in *Corynebacterium glutamicum* DM1730.

Vereinfachte Darstellung des Biosynthesewegs von L-Lysin in *Corynebacterium glutamicum*. Die im Stamm DM1730 punktmutierten Gene sind rot hervorgehoben. Die punktierten Linien kennzeichnen die Rückkopplungshemmung von L-Lysin und L-Threonin auf die Aspartat-Kinase *lysC*.

Bei der bioinformatischen Analyse des 3,2 Mbp großen Genoms von *Corynebacterium glutamicum* (GenBank BX927147) wurden 3.057 Proteine annotiert (Kalinowski *et al.*, 2003; Ikeda und Nakagawa, 2003). Ungefähr 650 (22%) von ihnen wurden als integrale Membranproteine vorhergesagt. Einige Studien haben sich bereits mit der Untersuchung des *Corynebacterium glutamicum*-Membranproteoms befasst (Hermann *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001; Schluesener *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2006). Zu den dort identifizierten Membranproteinen gehörten u.a. Bestandteile der

Atmungskette, Phosphotransferasesysteme für verschiedenste Zuckerarten und weitere Transportproteine. Die meisten identifizierten Membranproteine waren allerdings hypothetischer Natur, denn ihnen ist noch keine genaue Funktion zuzuordnen. Insgesamt konnten bisher ungefähr die Hälfte aller im Genom annotierten Membranproteine auf Proteinebene nachgewiesen werden.

1.1.4 Analytik von Membranproteinen

Es gibt zwei generelle Probleme beim analytischen Umgang mit Membranproteinen. Erstens stellen die Membranen als zweidimensionale Struktur mit wenigen Ausnahmen nur ein relativ geringes Teilvolumen der Zelle dar. Deshalb liegen die meisten Membranproteine nur in sehr geringer Anzahl in der Zelle vor. Um eine ausreichende Proteinmenge für die Analyse zu erhalten, sind deshalb spezielle Anreicherungsverfahren notwendig. Zweitens setzt die Mehrheit der eingesetzten Verfahren in wässrigen Medien gelöste Proteine voraus. Das wässrige Milieu stellt aber nicht die natürliche Umgebung für Membranproteine in ihrer nativen Konformation dar, da sie zahlreiche unpolare Bereiche zur Interaktion mit der Lipidschicht besitzen. Oft weisen weder das relativ hydrophobe Gesamtprotein, noch einzelne Peptide aus den Transmembranbereichen eine ausreichende Löslichkeit auf, so dass es zu Aggregation, Präzipitation oder Adsorption an Oberflächen kommen kann. Um dies zu verhindern, werden sämtliche experimentellen Abschnitte bei der Untersuchung von Membranproteinen speziell an die erhöhte Hydrophobizität angepasst (Rabilloud, 2009).

Zur Analyse kompletter Membranproteome wird überwiegend die generell als *Bottom up Proteomics* bezeichnete Strategie eingesetzt. Das als *Top down-Proteomics* bezeichnete konkurrierende Verfahren, bei dem ein Probenprotein direkt in einem hochauflösendem Massenspektrometer fragmentiert und analysiert eignet sich prinzipiell nur für hochkonzentrierte Lösungen von Einzelproteinen (Whitelegge *et al.*, 2006; Zabrouskov und Whitelegge, 2007; Han *et al.*, 2008). Aufgrund des Fehlens leistungsfähiger Flüssigchromatographie zur Trennung von Proteinen und der Ineffizienz der Extraktion größerer Proteine aus den weit verbreiteten Polyacrylamidgelen erweist sich die Untersuchung kompletter Membranproteome, die üblicherweise eine Vielzahl von Proteinen beinhalten, mittels *Top down* momentan noch als schwierig. Bei *Bottom up* werden daher über einen proteolytischen Schritt Peptide aus den Proteinen erzeugt, die besser aufgetrennt oder extrahiert werden können. Der eigentliche Nachweis verläuft dann über die massenspektrometrische (MS) Detektion dieser Peptide. Je nachdem, ob die eigentliche Trennung der Probenbestandteile vor oder nach der proteolytischen Spaltung erfolgt, werden zwei grundlegende Arbeitsabläufe innerhalb der *Bottom up-Proteomics* unterschieden, die im Folgenden kurz besprochen werden (Abb. 1-5). Deren einzelne Komponenten, die Aufreinigung, Trennung, Proteolyse und massenspektrometrische Messung, werden in den Kapiteln 1.2 bis 1.5 im Detail beschrieben.

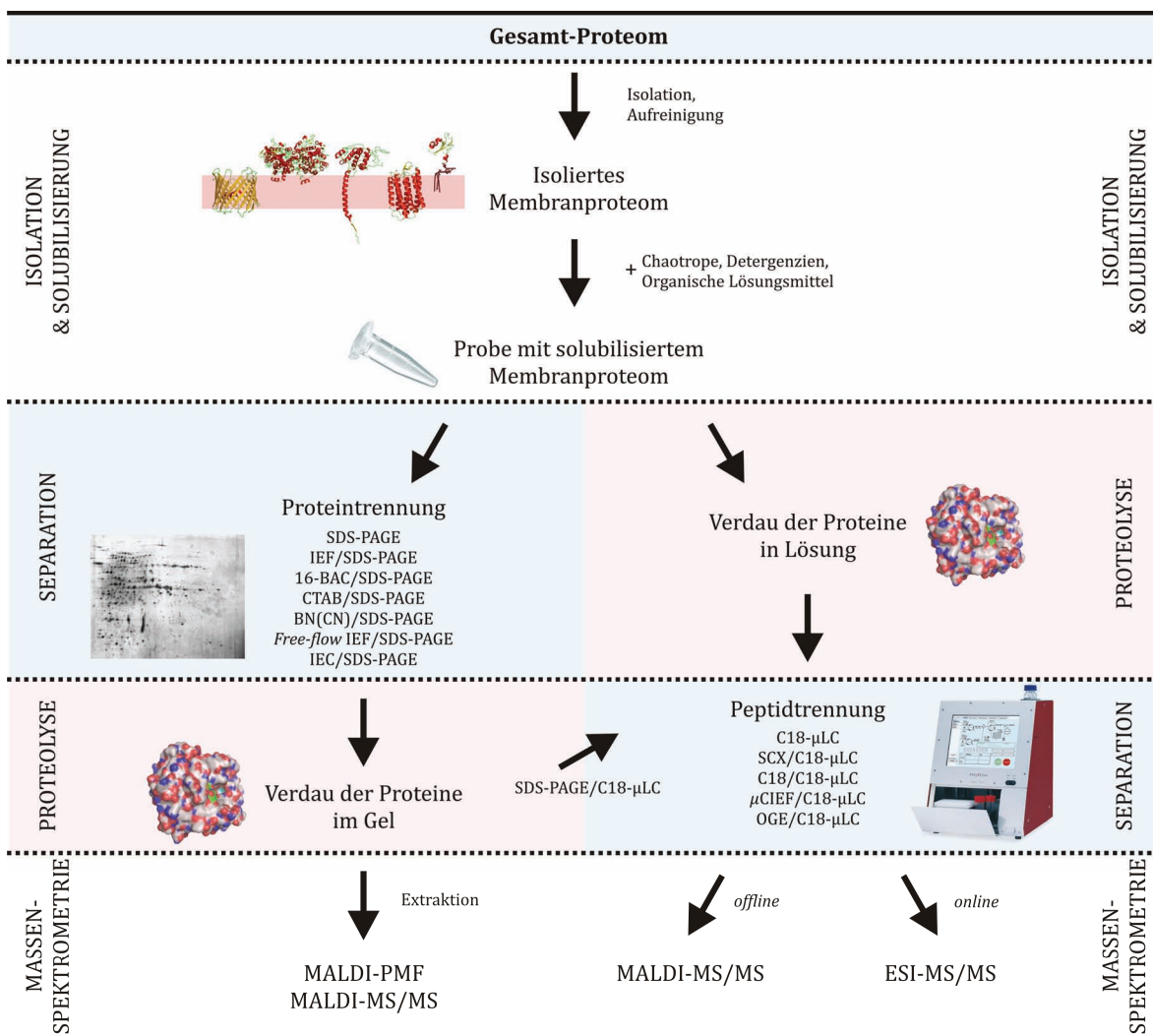


Abb. 1-5: Allgemeiner Ablauf von Bottom up Membranproteomics-Experimenten.

Das Schaubild stellt die wichtigsten Abschnitte von gängigen Bottom up-Verfahren der Isolation eines Membranproteoms bis zur massenspektrometrischen Messung hin dar.

Der überwiegende Teil der Trennungen auf Proteinebene wird per Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Danach werden die Proteine angefärbt, die entsprechenden Stellen des Gels ausgeschnitten und anschließend eine Hydrolyse der Peptide durchgeführt (Henzel *et al.*, 1993; Shevchenko *et al.*, 1996). Die entstandenen Peptide werden dann aus der Gelmatrix extrahiert und können direkt für die massenspektrometrische Messung vorbereitet werden.

Wird das Membranproteom vor der Auftrennung proteolytisch gespalten, schließen sich häufig ein oder mehrere flüssigchromatographische Trennverfahren an. Der letzte Schritt dieses als *Shotgun Proteomics* bekannten Ablaufs besteht in nahezu allen Fällen aus einer Peptidtrennung an einer Umkehrphase, deren Eluat entweder durch *online*-Kopplung mit einem ESI-MS/MS-Instrument direkt vermessen wird (Covey *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 1992) oder alternativ für eine nachfolgende *offline*-Messung mittels MALDI-MS/MS zusammen mit Matrix auf einem Probenhalter deponiert wird (Zhang und Caprioli, 1996; Miliotis *et al.*, 2000; Ericson *et al.*, 2003). Durch die *offline*-Messung entfällt die zeitliche Limitierung bei der Fragmentierung mehrerer Vorläuferpeptide innerhalb einer Fraktion, allerdings besteht durch den Prozess des MALDI-Spottens die Gefahr einer Verschleppung der Probe.

1.2 Aufreinigung und Solubilisierung

1.2.1 Isolierung und Anreicherung

Zur Anreicherung der Membranproteome von Bakterien und einfachen eukaryotischen Einzellern wird eine Vorfraktionierung einzelner Zellkompartimente durch mehrere Zentrifugationsschritte vorgenommen (Lasserre *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007). Dadurch werden Zelltrümmer und die cytoplasmatischen Bestandteile der Probe weitgehend entfernt. Eine bessere Aufreinigung kann durch eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation erzielt werden, da hier eine detailliertere Auftrennung der einzelnen Zellbestandteile erfolgt (Goo *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2004).

Für deutlich komplexere Membranproteome sind aufwendigere Anreicherungsstrategien notwendig. Zellen höherer Eukaryonten enthalten zahlreiche verschiedene Membrankompartimente, so dass die Gewinnung einer Gesamt-Membranfraktion nicht ausreichend ist. Durch verschiedene Dichtegradienten-Zentrifugationen können viele der Submembranproteome isoliert werden, da sich die Membranen in ihrem Zentrifugationsverhalten unterscheiden (Da Cruz *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Coughour *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Hunzinger *et al.*, 2006; Zahedi *et al.*, 2006). Alternativ können einzelne Membranen auch immunologisch affinitätsgereinigt werden, indem Antikörper gegen Proteine eingesetzt werden, die nur im gewünschten Membrantyp vorhanden sind (Morciano *et al.*, 2005; Burré *et al.*, 2006a; Sprenger *et al.*, 2006; Ostrom und Insel, 2006).

Lösliche und nichtkovalent mit der Membran assoziierte Proteine können durch Waschen mit hochionischen Puffern entfernt werden, da die hydrophoben Membranproteine keine Wechselwirkungen mit den extrem polaren Lösungen eingehen. Typische Salze zur ionischen Dissoziation sind NaCl, NaBr, KCl, KBr oder die Alkalien Na₂CO₃ und NaOH (Speers und Wu, 2007). Insbesondere Na₂CO₃ wird häufig verwendet (Pedersen *et al.*, 2003; Da Cruz *et al.*, 2003; Schirmer *et al.*, 2003; Blonder *et al.*, 2004b; Moebius *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006), da durch den hohen pH-Wert zusätzlich Membranvesikel geöffnet und die eingeschlossenen Kontaminationen freigesetzt werden (Fujiki *et al.*, 1982; Howell und Palade, 1982). Mit zunehmender Anzahl und Stärke der Waschlösungen verbleiben immer weniger Membran-assoziierte und lösliche Proteine bei gleichbleibender Anzahl an integralen Membranproteinen in der Probe (Pasini *et al.*, 2006). Die Kombination mehrerer Arten von Waschlösungen kann zu einer

gesteigerten Effektivität beitragen, allerdings scheint der Erfolg stark von der Art der verwendeten Membranprobe abzuhängen. Bei den Zellmembranen von *Corynebacterium glutamicum* ist das Entfernen von löslichen und Membran-assoziierten Proteinen mittels Waschen relativ ineffektiv, so dass hier als Alternative ein Vorverdau der Membranen mit der Protease Trypsin vorgeschlagen wird (Fischer *et al.*, 2006).

Neben der Erhöhung der Probenkomplexität durch ungewollte Proteinbestandteile erschwert auch die Anwesenheit von Membranlipiden die Analyse. Proteinfällungen stellen gängige Methoden zum Entfernen der Lipide dar, da sie möglichst quantitativ die Proteine ausfällen sollten und die anderen Bestandteile der Probe in Lösung verbleiben. Sie werden durch Zugabe von Methanol/Chloroform, kaltem Aceton (le Maire *et al.*, 1993; Mastro und Hall, 1999; Carboni *et al.*, 2002; Borner *et al.*, 2005) oder Trichloressigsäure (TCA) zur Probe durchgeführt (Simões-Barbosa *et al.*, 2000; Moebius *et al.*, 2005). Die erhaltenen Präzipitate können anschließend mittels Detergenzien, chaotropen Salzen und Ultraschall größtenteils resolubilisiert und weiter verwendet werden (Speers *et al.*, 2007).

1.2.2 Solubilisierung in wässrigen Lösungen

Sobald hydrophobe Proteinbestandteile in Kontakt mit einem wässrigen Lösungsmittel kommen, sorgt der hydrophobe Effekt dafür, dass sie sich, gemäß des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik, unter Entropiezunahme zusammenlagern. Um trotzdem die Löslichkeit von integralen Membranproteinen zu gewährleisten, werden den Lösungen verschiedene niedermolekulare Stoffe zugesetzt.

Als erstes sind chaotrope Reagenzien zu nennen, welche die entfalteten Proteine durch Wasserstoffbrücken und elektrostatische Interaktionen stabilisieren (Makhatadze und Privalov, 1992; Tobi *et al.*, 2003; Möglich *et al.*, 2005). Zur Solubilisierung von Proteinen bei der isoelektrischen Fokussierung wird standardmäßig Harnstoff, bei Membranproben zusätzlich in hoher Konzentration stärker denaturierender Thioharnstoff oder Guanidiniumchlorid zugesetzt (Castellanos-Serra und Paz-Lago, 2002; Görg *et al.*, 2004).

Neben den chaotropen Substanzen sind Detergenzien weit verbreitete Additive, um Membranproteine in Lösung zu halten. Gewöhnlich setzt man sie in Mengen zu, die über der kritisch mizellaren Konzentration liegen. Dann ist ausreichend Detergenz vorhanden, um Membranproteinvesikel aufzubrechen und die enthaltenen Membranproteine zu solubilisieren (Kragh-Hansen *et al.*, 1993; le Maire *et al.*, 2000). Besonders ionische Detergenzien wie SDS sind in Bezug auf ihre Denaturierungs- und Solubilisierungseigenschaften sehr effektiv (Reynolds und Tanford, 1970). SDS bindet an Proteine in einem Massenverhältnis von 1,4 zu 1 und bricht durch seine hydrophobe Kette und anionische Kopfgruppe die bestehenden Interaktionen innerhalb der Proteine auf (Pitt-Rivers und Ambesi Impiombato, 1968). So werden sie durch eine Art SDS-Hülle umgeben, welche eine Aggregation durch die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Oberfläche verhindert (Speers und Wu, 2007).

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden aufgrund ihres ampholytischen Verhaltens zwitterionische Detergenzien eingesetzt. Üblicherweise wird das synthetische Gallensäure-Derivat 3-Chloramidopropyl-Dimethylammonio-1-Propansulfat (CHAPS; Hjelmeland *et al.*, 1980, Rabilloud *et al.*, 1997) verwendet. Allerdings lassen sich hinsichtlich der Untersuchung von Membranproteinen bessere Resultate durch den Einsatz von Amidosulfobetainen (ASB) erzielen (Chevallet *et al.*, 1998; Carboni *et al.*, 2002). Auch Kombinationen beider Detergenzien sind möglich und versprechen eine realistischere Darstellung eines Membranproteoms (Martins-de-Souza *et al.*, 2007).

Während ionische Detergenzien überwiegend direkt Protein-Protein-Wechselwirkungen stören, wirken nichtionische an den Lipidbestandteilen der Membran. Sie basieren strukturell überwiegend auf Polyoxyethylen (z.B. Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20, Brij) oder Glykosiden (DDM, OG, Digitonin) und sind ebenfalls für die isoelektrische Fokussierung verwendbar (Luche *et al.*, 2003). Ihre Anwesenheit verursacht ein Aufbrechen der Membran in kleinere Vesikel, die bei steigender Einlagerung von Detergenzmolekülen zunehmend instabiler werden. Letztendlich entstehen gemischte Lipid/Detergenz/Protein-Mizellen, in denen die hydrophoben Transmembranbereiche der Proteine weitgehend mit Detergenz abgedeckt sind (Speers und Wu, 2007). Dieser Vorgang erfolgt nicht immer vollständig, so dass es teilweise zu Aggregation der solubilisierten Proteine kommen kann (Kragh-Hansen *et al.* 1993; Kragh-Hansen *et al.*, 1998; le Maire *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Wirkweise sind nichtionische Detergenzien als relativ mild einzustufen.

Der Einsatz löslichkeitsvermittelnder Substanzen ist zwar förderlich für die Solubilisierung der Proteine, kann aber auch Inkompatibilitäten mit den Analysemethoden verursachen. Dann muss die störende Substanz vorher durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt entfernt werden oder eine alternative kompatible Methode verwendet werden. Chaotrope Agenzien müssen grundsätzlich vor der massenspektrometrischen Messung durch einen Entsalzungsschritt entfernt werden (Naldrett *et al.*, 2005). Dies kann im Mikroliter-Maßstab über speziell immobilisiertes Umkehrphasenmaterial oder durch eine Dialyse geschehen. Aufwändiger gestaltet sich das Entfernen von Detergenzien aus der Probe. Viele Detergenzien verursachen eine ausgeprägte Suppression der Ionisierung bei MALDI- oder ESI-MS (Loo *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2004; Zischka *et al.*, 2004). Die weit verbreitete Aufreinigung über Umkehrphasen kann zu deren Entfernung häufig nicht angewandt werden, da insbesondere bei starken Detergenzien ausgeprägte Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Material eingegangen werden. (Bossert *et al.*, 1989; Kawasaki und Suzuki, 1990; Vissers *et al.*, 1996). Alternative Reinigungsmethoden wie das Entfernen mittels Dialyse oder starker Kationenaustausch-Chromatographie (SCX) erweisen sich als relativ ineffizient (Zhang *et al.*, 2007), bessere Ergebnisse lassen sich durch hydrophiler Interaktions-Chromatographie (HILIC) erzielen (Jenö *et al.*, 1993; Schneider 2008). Einige der nicht-ionischen glykosidischen Detergenzien sind in niedrigen Konzentrationen weitgehend MALDI- und ESI-MS-kompatibel und können in der Probe verbleiben (Loo *et al.*, 1994; van Montford *et al.*, 2002; Quach *et al.*, 2003).

Diese doch zahlreichen Probleme haben zur Entwicklung von speziellen „MS-kompatiblen“-Detergenzien geführt. Sie werden vor der eigentlichen Messung in nicht störende Produkte gespalten. Bei den prominentesten Vertretern wird dies durch eine Hydrolyse in saurem Milieu erreicht (z.B. *RapiGest*TM, *PPS*TM; Norris *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). Mit diesen funktionell entwickelten Detergenzien lassen sich vergleichsweise mehr integrale Membranproteine identifizieren, als es mit Vertretern anderer Detergenzklassen möglich ist (Ruth *et al.*, 2006).

1.2.3 Solubilisierung in organischen Lösungen

Organisch-wässrige Lösungsmittelsysteme stellen eine potente Alternative zur Verwendung von chaotropen Salzen und Detergenzien dar. Da sich viele der organischen Lösungsmittel durch einfache Evaporation entfernen lassen, sind keine aufwendigeren Reinigungsschritte als bei den anderen Zusätzen erforderlich. Generell stabilisieren sie aufgrund ihrer im Vergleich zu Wasser gesteigerten Hydrophobizität freigesetzte unpolare Bereiche eines entfalteten Proteins und unterstützen so die Solubilisierung und Denaturierung von Proteinen (Fink und Painter, 1987; Welinder 1988; Russell *et al.*, 2001). Insbesondere kurzkettige Alkohole führen zu einem deutlichen Verlust der Membranintegrität, der genaue Wirkmechanismus unterscheidet sich selbst innerhalb nah verwandter Substanzen jedoch deutlich. Methanol kann als hydratisierter Molekül-Cluster nicht direkt mit den unpolaren Lipidbestandteilen interagieren, sondern verursacht durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung der wässrigen Phase eine Deformation der Membran (Abb. 1-6). Ethanol lagert sich hingegen unterhalb der hydrophilen Kopffregion direkt in die Membran ein und kann aufgrund seiner erhöhten Hydrophobizität die Lipiddoppelschicht sogar passieren (Feller *et al.*, 2002; Ly *et al.*, 2004; Patra *et al.*, 2006; Pinisetty *et al.*, 2006). Neben Alkoholen und Nitrilen unterstützen auch starke organische Säuren wie Ameisensäure und Trifluoressigsäure die Denaturierung von Membranen. Hohe Konzentrationen von bis zu 90% Ameisensäure solubilisieren Membranen nahezu vollständig und erlauben nach entsprechender Verdünnung eine einfachere und effizientere Analyse (Da Cruz *et al.*, 2003; Martosella *et al.*, 2006). In den meisten Fällen werden die stark sauren Lösungen zur chemischen Spaltung der Proteine durch Bromcyan (CNBr) verwendet (Washburn *et al.*, 2001; Wolters *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2003; Prinz *et al.*, 2004; Gaucher *et al.*, 2004; Fischer und Poetsch, 2006).

Die enzymatische Aktivität von Trypsin und anderer Proteasen wird durch die Anwesenheit ausgewählter organischer Lösungsmittel kaum nachhaltig beeinflusst. Trypsin zeigt sich von einem breiten Konzentrationsspektrum an getesteten Lösungsmitteln (DMSO, Ethanol, Acetonitril, Ethylacetat, Dioxan, Toluol) relativ unbeeinflusst, während sich bei Chymotrypsin ein zunehmender Aktivitätsverlust einstellt (Simon *et al.* 1998; Simon *et al.*, 2001). Bei Pepsin, Glu-C, Lys-C, Arg-N und Elastase führt schon die Anwesenheit von 20% Methanol, Ethanol, Propanol oder Acetonitril zu einer Abnahme der Aktivität, die Enzyme sind aber trotzdem noch einsatzfähig (Welinder 1998). Durch den Verdau einiger Modellproteine konnte gezeigt werden, dass

Zusätze von Methanol oder Acetonitril sich sogar vorteilhaft auf die massenspektrometrische Analyse auswirken können (Russell *et al.*, 2001). Insbesondere Proteolysepuffer, die 60% Methanol enthalten, haben sich zur tryptischen Analyse von schwer denaturierbaren Membranproben bewährt (Blonder *et al.*, 2002; Blonder *et al.*, 2004a; Blonder *et al.*, 2004b; Blonder *et al.*, 2006). Obwohl die Aktivität der Protease in Anwesenheit des Methanols reduziert war, reichte sie zu einem vollständigen Verdau des Membranproteoms aus (Blonder *et al.*, 2004b).

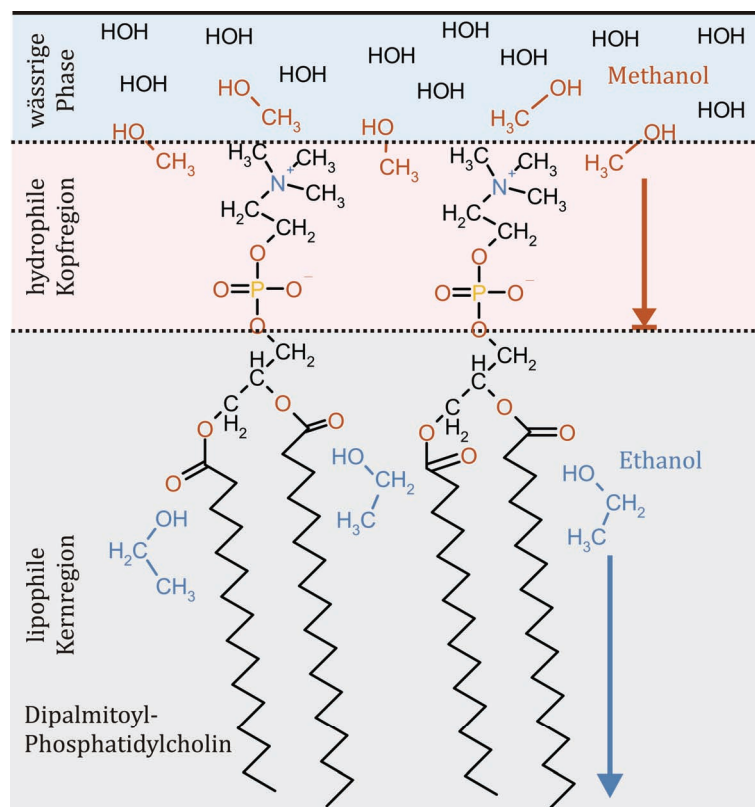


Abb. 1-6: Position von Methanol- und Ethanolmolekülen im Membranquerschnitt.

Die bevorzugten Stellen von Methanol und Ethanol in der Plasmamembranstruktur sind vereinfacht dargestellt. An den angedeuteten Positionen sind die meisten Moleküle der organischen Lösungsmittel anzutreffen. Pfeile kennzeichnen die Permeabilität der beiden Alkohole.

1.3 Trennstrategien

1.3.1 Methoden zur Proteintrennung

Der Großteil der Proteintrennungen in *Proteomics*-Anwendungen wird mit gelelektrophoretischen Methoden durchgeführt. Als Grundlage für viele dieser Techniken dient die SDS-PAGE, bei der die Proteine in Anwesenheit von SDS in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden (Lämmli, 1970). Das SDS sorgt für eine umfassende Solubilisierung aller Proteine und bleibt als Hauptladungsträger während der gesamten Elektrophorese am Protein gebunden. Allerdings ist die Leistungsfähigkeit eindimensionaler Methoden bei der Analyse komplexer Proteome beschränkt, da sich in einer Bande mehrere Proteine befinden können, die so nicht einzeln untersucht werden können (Moebius *et al.*, 2005). Deshalb werden zahlreiche andere gelelektrophoretische Techniken mit der SDS-PAGE kombiniert, um eine bessere Auflösung durch die zweidimensionale Trennung zu erhalten.

Die klassische 2D-Gelelektrophorese (IEF/SDS-PAGE), eine Kombination aus isoelektrischer Fokussierung und SDS-PAGE, wird schon lange zur Trennung von komplexen Proteinmischungen eingesetzt (O'Farrell *et al.*, 1975; Klose *et al.*, 1975; Scheele, 1975; Görg *et al.*, 2009). Starke ionische Detergenzien zur Solubilisierung von Membranproteinen sind nicht mit der IEF/SDS-PAGE kompatibel, da die resultierende hohe Ionenstärke eine gute Fokussierung unmöglich macht (Görg *et al.*, 2004). Da somit auf schwächere zwitterionische und nichtionische Detergenzien, wie CHAPS, ASB-14 oder DDM zurückgegriffen werden muss, werden mittels IEF/SDS-PAGE überwiegend β -Barrel- und hydrophilere Membranproteine identifiziert (Chevallet *et al.*, 1998; Santoni *et al.*, 1999; Molloy *et al.*, 2000; Galeva und Altermann, 2002; Lehner *et al.*, 2003; Luche *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2003). Zusätzlich ist bei allen zweidimensionalen Gelen der Proteintransfer zwischen beiden Dimensionen stark verlustbehaftet, was höhere Probenmengen voraussetzt und gerade bei wenig abundanten Membranproteinen extrem unvorteilhaft ist (Klein *et al.*, 2004). Das allgemein schlechte Leistungsvermögen der IEF/SDS-PAGE im Bezug auf Membranproteine hat zu speziell angepassten weiterentwickelten Gelsystemen geführt.

Bei der 16-BAC/SDS-PAGE werden in der ersten Dimension die Proteine in einem diskontinuierlichen sauren Gradienten (pH 4,0-1,5) in Anwesenheit des kationischen Detergenz 16-BAC nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und in der zweiten Dimension eine reguläre SDS-PAGE durchgeführt (Macfarlane, 1989; Hartinger *et al.*, 1996). Ein ähnliches Verfahren verwendet die quartäre Ammoniumverbindung CTAB für die Trennung in der ersten Dimension (Körs und Steinhart, 1997, Buxbaum, 2003). Mit diesen Methoden lassen sich deutlich mehr integrale Membranproteine identifizieren, teilweise auch solche, die mit hohen isoelektrischen Punkten außerhalb der Zugänglichkeit einer IEF/SDS-PAGE liegen. (Langen *et al.*, 2000; Dreger *et al.*, 2001; Coughenour *et al.*, 2004; Burré *et al.*, 2006a; Burré *et al.*, 2006b). Hinsichtlich der absoluten Trennleistung sind diese Verfahren jedoch der IEF/SDS-PAGE deutlich unterlegen, da diese mittels zweier völlig unterschiedlicher Proteineigenschaften auftrennt (Speers und Wu, 2007).

Auf lediglich einem Detergenz basiert die Doppel-SDS (dSDS)-PAGE, bei der zwei aufeinander folgende SDS-PAGE-Trennungen in Gelen mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen durchgeführt werden (Rais *et al.*, 2004). Ähnlich der 16-BAC/SDS-PAGE ist die Orthogonalität bei der dSDS-PAGE gering, da zweimal nach der gleichen Proteineigenschaft getrennt wird. Dennoch lassen sich mit ihr bevorzugt Membranproteine aus Proben mit überschaubarer Komplexität identifizieren (Rais *et al.*, 2004; Hunzinger *et al.*, 2006; Burré *et al.*, 2006b). Dies liegt auch an der Tatsache, dass sich Membranproteine optisch hervorheben, da sie von der diagonalen Spur der hydrophilen Proteine im Gel abweichen.

Auch mit geringen Detergenz-Konzentrationen lassen sich Membranproteine gelelektrophoretisch trennen. Die Proteine liegen dann bei der Trennung noch in ihrem nativen Zustand vor, wodurch ihre Aktivität oder oligomere Komplexe zumindest teilweise erhalten bleiben. Bei der blau-nativen (BN)-PAGE wird neben einer geringen Menge schwacher Detergenzien der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue zugesetzt, welcher die für die elektrophoretische Migration erforderliche Ladung bereitstellt (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994). Die BN-PAGE eignet sich insbesondere zur Charakterisierung und Aufreinigung von überschaubaren Membranproteinkomplexen, kann aber auch als BN/SDS-PAGE ein probates Mittel zur Identifikation von Membranproteinen sein (Stenberg *et al.*, 2005; Wittig *et al.*, 2006; Reifschneider *et al.*, 2006; Lasserre *et al.*, 2006; Babusiak *et al.*, 2007). Eine weitere zur

BN-PAGE-verwandte Technik ist die klar-native (CN)-PAGE, bei der auf Coomassie gänzlich verzichtet wird (Wittig *et al.*, 2006). Die elektrophoretische Mobilität basiert dann auf den intrinsischen Eigenladungen der Proteine. Insbesondere die Entwicklung einer hochauflösenden Variante durch den Zusatz eines milden Detergenzes wie DDM, SDC oder Digitonin, stellt das Auflösungsvermögen dieser Technik auf eine Stufe mit der BN-PAGE (Wittig *et al.*, 2007).

Je nach verwendeter Methode werden zusätzliche Proteindaten über die molekulare Masse oder den isoelektrischen Punkt gewonnen, welche die erhaltenen Ergebnisse zusätzlich absichern können. Darüber hinaus können verschiedene Isoformen eines Proteins im Gel leichter identifiziert werden, da sich diese auf Peptidebene nur geringfügig unterscheiden. Im Idealfall enthält jedes Gelstück nur ein Protein, das isoliert verdaut und analysiert werden kann. Dadurch wird eine Proteinidentifizierung über *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) ermöglicht, da jedes gemessene MS-Spektrum fast ausschließlich die Peptidfragmente eines Proteins enthält. Zur Untermauerung der durch die PMF-Suche erhaltenen Daten, können zusätzlich MS/MS-Fragmentspektren einzelner Peptide aufgenommen werden.

Die Proteintrennung muss nicht zwangsläufig in Gelen stattfinden. Sämtliche lösungsbasierten Ansätze besitzen den Vorteil, dass die Proteine nach erfolgter Trennung nicht einer verlustbehafteten Extraktion unterzogen werden müssen. Es wurden mehrere Methoden zur gel-freien *Free-flow* IEF von Proteinen entwickelt. Die einzelnen Fraktionen sind entweder durch flüssigkeitsdurchlässige Membranen voneinander getrennt (Herbert *et al.*, 2000; Righetti *et al.*, 2005) oder die Fraktionierung erfolgt kontinuierlich orthogonal zur eigentlichen Laufrichtung während des laminaren Flusses durch eine Kammer mit pH-Gradienten (Hannig, 1978; Moritz und Simpson, 2005; Righetti *et al.*, 2005). In Kombination mit weiteren Trenndimensionen (SDS-PAGE, μ LC, IEF/SDS-PAGE) wurden per *Free-flow* IEF vorfraktionierte Membranproteome bereits erfolgreich analysiert (Pedersen *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2004; Peirce *et al.*, 2004). Eine Mischform zwischen *Free-flow* IEF und der klassischen IPG-Gel-IEF stellt die *Off-gel* IEF (OGE) dar. Bei ihr befinden sich Kammern auf einem IPG-Gelstreifen, der die einzige Verbindung zwischen den einzelnen Fraktionen darstellt. Es wurden bereits mehrere lösliche Proteome auf Proteinebene per OGE fraktioniert und analysiert, jedoch liegen noch keine entsprechenden Daten zu Membranproteinen vor (Arnaud *et al.*, 2002; Ros *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2003).

Neben elektrophoretischen Methoden können auch chromatographische Verfahren zur Proteintrennung verwendet werden. Während die in der Analytik von Peptiden weitverbreitete Flüssigchromatographie an Umkehrphasen nur vereinzelt zur Trennung von ganzen Membranproteinen angewendet wird (McDonald *et al.*, 2006; Martosella *et al.*, 2006), stellt die Ionenaustausch-Chromatographie eine geeignetere Technik dar. Im Gegensatz zu den Umkehrphasen ist sie mit milden Detergenzien kompatibel und bietet sich als Vorfraktionierung bei gelelektrophoretischen Verfahren in zweidimensionalen Trennungen an. Mittels Anionenaustausch-Chromatographie (SAX)/SDS-PAGE konnten unter Verwendung von ASB-14 zahlreiche Membranproteine aus *C. glutamicum*-Membranen identifiziert werden. Diese Ergebnisse übertrafen sogar die mittels 16-BAC/SDS-PAGE erreichbare Zahlen (Schluesener *et al.*, 2005). Auch in anderen Studien in denen SAX- oder SCX-Chromatographie als Vorfraktionierung eingesetzt wurden, konnten durchweg gute Ergebnisse erzielt werden (Bagshaw *et al.*, 2005; Schmitt *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2006).

1.3.2 Methoden zur Peptidtrennung

Alternativ kann die Trennung nach der Spaltung der Proteine in Lösung erst auf Peptidebene erfolgen. Dieser Ablauf ist leichter zu automatisieren als die überwiegend gelbasierten Proteintrennungen. Durch die Auftrennung der Peptide vor der MS-Messung ist die Möglichkeit einer Identifizierung über PMF nicht mehr gegeben, da die einzelnen Peptide eines Proteins jetzt in mehreren, unabhängig vermessenen Fraktionen vorliegen. Aus diesem Grund werden die Peptide in diesen Experimenten ausschließlich über MS/MS-Fragmentspektren identifiziert. Dies hat den Vorteil, dass neben der Peptidmasse zusätzliche Fragmentinformation in die Datenbanksuche einfließt und weniger spezifische Suchen bei ausreichender Massengenauigkeit erst ermöglicht werden.

Peptide besitzen im Gegensatz zu Proteinen eine bessere Löslichkeit in wässrigen Medien, so dass es zu weniger Probenverlust durch Aggregation und Adsorption kommt. Zudem wird die schwierige Extraktion der beim Gel-Verdau entstandenen hydrophoben Peptide umgangen (Speers und Wu, 2007). Der vorgezogene Proteolyseschritt steigert die Komplexität der zu trennenden Probe deutlich. Im Falle des Membranproteoms von *Corynebacterium glutamicum* mit ca. 1.300 Proteinen entstehen durch tryptischen Verdau etwa 30.000 Peptide (Fischer und Poetsch, 2006). Die Komplexität erhöht sich nochmals drastisch, wenn weniger spezifische Enzyme mit deutlich mehr potentiellen Schnittstellen eingesetzt werden. Sämtliche Proteinidentifikationen bei *Shotgun Proteomics* basieren auf den MS/MS-Fragmentspektren einzelner Peptide, da die Information der Proteinzugehörigkeit durch die Trennung verlorengeht. Umfassende Maßnahmen zur Vermeidung falschpositiver Identifikationen müssen getroffen werden, da oft wenige oder nur ein Peptid Grundlage für eine Proteinidentifikation sind (Blackler *et al.*, 2006; Elias und Gygi, 2007). In fast allen Fällen enthalten die Strategien zur Peptidtrennung eine flüssigchromatographische Auftrennung an einer C18-Umkehrphase im Mikro- oder Nanolitermaßstab (Covey *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 1992). Ähnlich der SDS-PAGE bei den Proteintrennungen ist eine eindimensionale Trennung mit C18- μ LC nur für Proben geringer Komplexität ausreichend, also für vorfraktionierte oder von sich aus kleine Membranproteome. In umfangreicheren Proben werden bei unzureichender Trennung ausschließlich die abundantesten Proteine detektiert, da nur deren Peptide qualitativ ansprechende MS/MS-Spektren zu erzeugen (Liu *et al.*, 2004). In typischen 1D- μ LC-Experimenten können bis zu 750 Proteine identifiziert werden (Speers und Wu, 2007). Für die Auftrennung vollständiger Membranproteome sind mehrdimensionale Trennmethode notwendig.

Die als MudPIT bezeichnete zweidimensionale flüssigchromatographische Peptidtrennung findet breite Verwendung bei der Analyse sehr komplexer Proben (Link *et al.*, 1999; Washburn *et al.*, 2001; Washburn *et al.*, 2003). In der biphasischen analytischen Säule befindet sich neben C18-Material auch ein starker Kationenaustauscher, von dem schrittweise mit einem Salzgradienten auf die Umkehrphase eluiert und dort aufgetrennt wird. Die Detektion erfolgt *online* durch ESI-MS, wodurch ein hoher Grad an Automatisierbarkeit für Hochdurchsatz-Messungen ermöglicht wird. Vereinzelt werden auch MALDI-basierte SCX/C18-Trennungen durchgeführt. Diese sind aber aufgrund des MALDI-Spottens aufwendiger (Vanrobaeyes *et al.* 2005; Zhao *et al.*, 2008). Obwohl sich mittels MudPIT eine 2- bis 5-fach höhere Zahl an Proteinen nachweisen lässt, beträgt der Anteil an Membranproteinen bei optimierten Anreicherungsstrategien bezogen auf die Gesamtzahl der identifizierten Proteine maximal ca. 50-65%. Ein solcher Wert ist auch mit eindimensionalen Trennungen erreichbar (Speers und Wu, 2007). Für eine bessere Identifikation hydrophober Membranpeptide kann die Ausführung der chromatographischen Trennung bei höheren Temperaturen vorteilhaft sein. Bei Verwendung auf 60°C beheizter Säulenöfen eluieren selbst bei moderaten Acetonitril-Konzentrationen zusätzlich deutlich hydrophobere und längere Peptide von der Säule als bei einer analogen Trennung bei Raumtemperatur (Martosella *et al.*, 2006; Speers *et al.*, 2007). Die Vorfraktionierung mittels SCX macht für die Analyse hydrophober Peptide allerdings nur eingeschränkt Sinn, da die meisten neutralen Peptide bei geringen Salzkonzentrationen vom Kationenaustauscher eluieren. Eine bessere Orthogonalität lässt sich dadurch erzielen, dass zuerst in alkalischem Milieu an einer C18-Umkehrphase und dann die reguläre saure Ionenpaar-C18-Trennung durchgeführt wird. Peptide besitzen bei unterschiedlichen pH-Werten verschiedene Nettoladungen und interagieren deshalb anders mit der stationären Phase. Bei der *Shotgun*-Analyse cytoplasmatischer Proteome liefert diese Methode im Vergleich zu SCX/C18- μ LC bereits sehr gute Ergebnisse und verspricht ein ähnliches Verhalten bei hydrophoben Membranpeptiden. (Delmotte *et al.*, 2007; Lasaosa *et al.*, 2009).

Analog zur Trennung von Proteinen mittels SDS-PAGE besitzt die isoelektrische Fokussierung auch auf Peptidebene eine ausgezeichnete Orthogonalität zur Umkehrphasen- μ LC. Die Vorfraktionierung kann entweder durch Kapillarelektrophorese, IPG-IEF oder die bereits vorgestellte OGE geschehen (Cargile *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Insbesondere die OGE eignet sich gut zur Fraktionierung von Peptiden (Lam *et al.*, 2007). Ganze Proteome können durch nachfolgende C18- μ LC-Trennung der

einzelnen Fraktionen und anschließender Messung mit ESI-MS (Heller *et al.*, 2005a; Hörth *et al.*, 2006; Hübner *et al.*, 2008) oder MALDI-MS untersucht werden (Chenau *et al.*, 2008). Bisher liegen nur sehr wenige Daten zur Analyse eines Membranproteoms mit OGE/C18- μ LC-ESI-MS vor, bei denen hinsichtlich der Identifikation von Membranproteinen mit MudPIT vergleichbare Resultate erzielt werden (Elschenbroich *et al.*, 2009; Manadas *et al.*, 2009).

Eine weitere leistungsstarke Technik zur Untersuchung von Membranproteomen vereint die Vorteile der SDS-PAGE mit denen aller μ LC-MS-Methoden. Die Proteine werden gelelektrophoretisch in einer SDS-PAGE getrennt, anschließend verdaut und die erhaltenen Peptidmischungen nochmals über C18- μ LC aufgetrennt (Simpson *et al.*, 2000; Schirle *et al.*, 2003). Die Proteine können durch SDS in Lösung gehalten werden, es gibt keinen verlustbehafteten Gel-Gel-Transfer und es gibt keine Einschränkung hinsichtlich des isoelektrischen Punktes oder der Hydrophobizität der untersuchten Proteine. Mittels SDS-PAGE/C18- μ LC lässt sich eine deutlich bessere Auflösung als mit anderen zur Untersuchung von Membranproteinen eingesetzten 2D-Gelsystemen (dSDS-PAGE, 16-BAC/SDS-PAGE, BN/SDS-PAGE) erzielen. Die erhaltenen Proteinzahlen sind vergleichbar mit IEF/SDS-PAGE, mit der aufgrund physikochemischer Einschränkungen deutlich weniger integrale Membranproteine nachweisbar sind (Goo *et al.*, 2003; Rahbar und Fenselau, 2005; Schindler *et al.*, 2006).

1.4 Proteolyse

1.4.1 Proteasen

Die Hydrolyse der Peptidbindungen in der Peptidkette eines Proteins wird von zahlreichen Endoproteasen (alternativ: Endopeptidasen) enzymatisch katalysiert. Sie verlief unter unkatalysierten Bedingungen bei neutralem pH viel zu langsam, obwohl die Reaktion generell thermodynamisch günstig ist. Die Spaltung eines typischen Peptids nähme dann einen Zeitraum von 10 bis 1,000 Jahren ein. Grund hierfür ist die Stabilität der C-N-Peptidbindung mit ihrem partiellen Doppelbindungscharakter, die einen nukleophilen Angriff an das Carbonyl-Kohlenstoffatom erschwert. Die Enzyme müssen also den Angriff auf ein eigentlich unreaktives Carbonyl-C-Atom ermöglichen, um die Proteolyse mit ausreichender Geschwindigkeit ablaufen zu lassen (Berg *et al.*, 2002).

Je nach Art des bereitgestellten Nukleophils im aktiven Zentrum des Enzyms lassen sich mehrere Endoproteasefamilien unterscheiden: Serinproteasen, Cysteinproteasen, Aspartatproteasen und Metalloproteasen. Neben den Endoproteasen existieren weitere Proteasentypen, die entweder die aminoterminalen (Aminopeptidasen) oder die carboxyterminalen Aminosäure (Carboxypeptidasen) freisetzen, Dipeptide (Dipeptidasen) spalten oder spezielle Enzyme zur Hydrolyse von zyklischen Peptiden und Isopeptidbindungen (Omegaproteasen) darstellen. Fast alle Proteasen werden üblicherweise als inaktive Zymogene synthetisiert, die dann durch eine auto- oder fremdkatalytische Spaltung in ihre aktive Form überführt werden.

1.4.2 Serinproteasen

Die zahlenmäßig größte Gruppe innerhalb der Endoproteasen stellen die Serinproteasen dar, denen sowohl die prominenten Enzyme des Verdauungstraktes Trypsin, Chymotrypsin und Elastase als auch die Blutgerinnungsfaktoren Plasmin und Thrombin angehören. Weiterhin sind zahlreiche bakterielle und fungale Vertreter bekannt, u.a. die im Rahmen dieser Arbeit behandelte Proteinase K des Ascomyceten *Engyodontium album* und die Glutamyl Endopeptidase I (Glu-C) des gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* V8. Anhand ihres aktiven Zentrums und ihrer Faltung lassen sich die einzelnen Proteasen systematisch einordnen. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Plasmin und Thrombin werden der überwiegend tierische Enzyme beinhaltenden Unterfamilie S1A zugeordnet, während Glu-C als sekretierte bakterielle Protease in die Unterfamilie S1B eingeordnet wird. Sämtliche Vertreter der Familie S1 zeichnet eine typische Proteinfaltung mit zwei β -Barrel-Domänen aus, während die Subtilisin-ähnlichen Proteasen der Unterfamilie S8 (u.a. Proteinase K) nur aus einer Domäne bestehen, die sowohl antiparallele β -Faltblätter als auch α -helikale Sekundärstrukturen besitzt. Allen hier vorgestellten Serinproteasen ist gemein, dass sie im aktiven Zentrum die identische räumliche Anordnung der drei Aminosäure-Seitenketten His-Asp-Ser besitzen, unter denen sich auch der namensgebende Serinrest befindet. Dieses als „katalytische Triade“ bezeichnete Charakteristikum ist in dieser Form in vielen, aber nicht in allen Serinproteasen vorhanden, denn es sind auch andere katalytische Strukturen wie z.B. Glu-Asp-Asp-Ser, Ser-Lys oder His-Ser-His bekannt.

Der genaue katalytische Mechanismus wurde aus der dreidimensionalen Struktur der eng verwandten Serinproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase abgeleitet (Bender und Kézdy, 1965; Matthews *et al.*, 1967; Blow *et al.*, 1969). In ihrem aktiven Zentrum befindet sich das Serin 195, dessen γ -O-Atom sich in Wasserstoffbrückendistanz zum ϵ 1-N des Histidins 57 befindet. Das zweite δ 1-N des Imidazolrings geht eine weitere Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylgruppe des Aspartats 102 ein. Durch die besondere geometrische Anordnung der drei konservierten Seitenketten wird ein Protonentransfer von der basischen Hydroxylfunktion des Serins 195 auf Histidin 57 ermöglicht (Abb. 1-7A; Polgár und Bender, 1969; Fersht und Sperling, 1973; Bachovchin und Roberts, 1978; Kossiakoff und Spencer, 1981). Das Aspartat 102 stabilisiert hierbei das erforderliche Tautomer des Imidazolrings, so dass die katalytische Aktivität im Vergleich zu einem analogen Asparaginrest um den Faktor 1,000 erhöht ist (Craik *et al.*, 1987). Die Deprotonierung des Serins durch Basenkatalyse des Imidazolrings

erzeugt ein stark basisches Alkoxid (Alkoholat), welches ein deutlich stärkeres Nukleophil als der ursprüngliche Alkohol darstellt und in der Lage ist, das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Peptidkette anzugreifen. Aus dem Übergangszustand kann dann säurekatalytisch durch Übertragung des Wasserstoffs vom protonierten Imidazol auf die Aminofunktion der Abgangsgruppe die Freisetzung des neu gebildeten Aminoterminus erfolgen. Zusätzlich wird im tetrahedralen Übergangszustand, bei dem die Peptidkette an das Enzym gebunden vorliegt, durch zwei Aminogruppen des Peptidrückgrats in der sogenannten „Oxyaniontasche“ die negative Ladung stabilisiert (Abb. 1-7B; Henderson, 1970; Robertus *et al.*, 1972). Da diese Bindetasche speziell an die Maße eines Sauerstoffanions angepasst ist, wird hierdurch eine Spezifität für Amid- und Ester-Substrate erreicht und die Spaltung von Thioestern, trotz ähnlicher chemischer Reaktivität, aufgrund des größeren Schwefelatoms ausgeschlossen (Asbóth und Polgár, 1983).

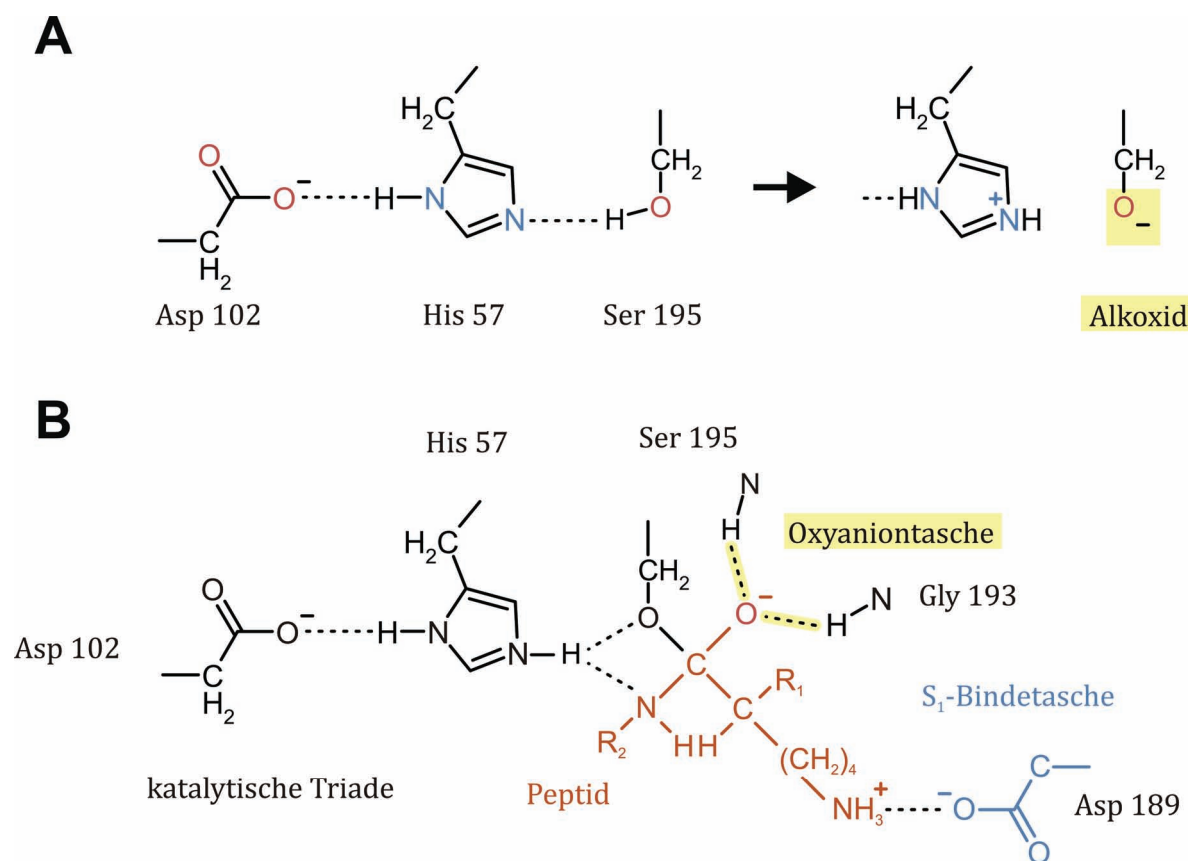


Abb. 1-7: Die katalytische Triade der Serinproteasen.

(A) Aufbau der katalytischen Triade von Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Die Entstehung des nukleophilen Alkoxid-Anions zur Spaltung von Peptidbindungen wird veranschaulicht (B) Darstellung des Übergangszustandes von Trypsin mit gebundenem Substratpeptid. Neben der stabilisierenden Oxyaniontasche ist auch die Wechselwirkung in der spezifitätsgebenden S_1 -Bindetasche dargestellt.

Aus proteomanalytischer Sicht ist neben der Aktivität der Protease, deren Optimum bei allen genannten Serinproteasen um pH 8 erreicht wird, vor allem ihre Spezifität gegenüber der gespaltenen Peptidsequenz entscheidend. Gemäß der üblichen Nomenklatur (Schechter und Berger, 1967) werden die aminoterminalen Aminosäure-Positionen des Substratpeptids vor der hydrolysierten Bindung mit P_1 , P_2 bis P_n und die carboxyterminalen Aminosäure-Positionen nach der Spaltstelle mit P'_1 , P'_2 bis P'_n bezeichnet und analog dazu die entsprechenden Bindestellen der Protease mit S_1 , S_2 bis S_n bzw. S'_1 , S'_2 bis S'_n (Abb. 1-8).

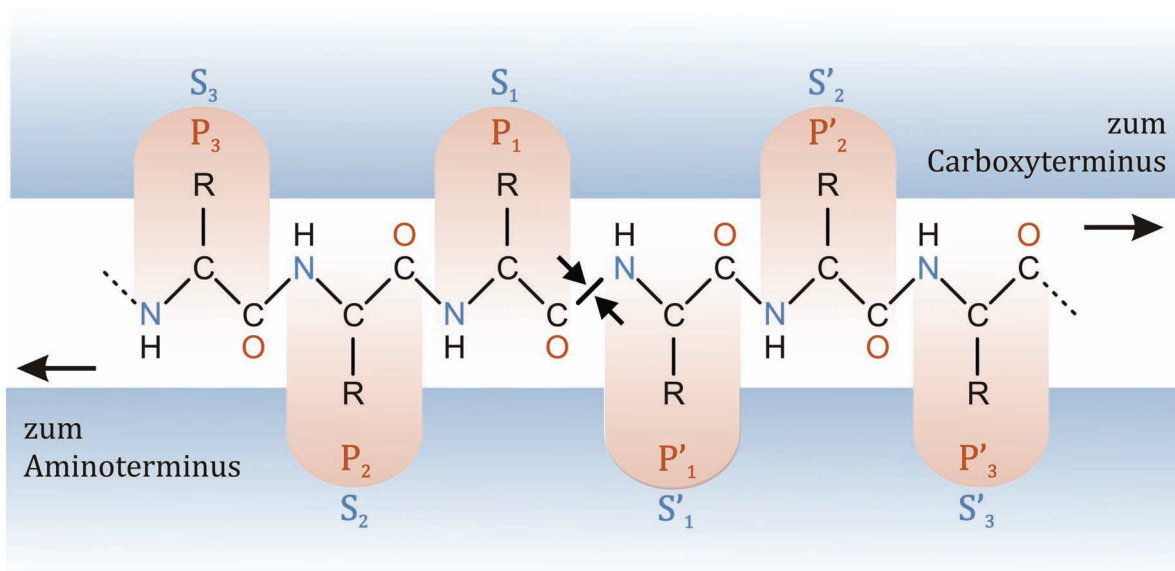


Abb. 1-8: Nomenklatur der Seitenketten und enzymatischen Bindestellen an der Spaltstelle.

Übersicht der Bezeichnungen von Aminosäuren in Nähe der proteolytischen Spaltstelle. Die Aminosäuren sind mit P_3 , P_2 , P_1 , P'_1 , P'_2 und P'_3 , die entsprechenden Bindestellen am Enzym mit S_3 , S_2 , S_1 , S'_1 , S'_2 und S'_3 gekennzeichnet. Die proteolytisch gespaltene Bindung ist durch zwei Pfeile in der Mitte der Peptidkette optisch hervorgehoben.

Die pankreale Protease Trypsin, ein 23,3 kDa großes basisches Protein, schneidet sehr spezifisch carboxyterminal der Aminosäuren Lysin und Arginin. Es besitzt somit eine hohe Spezifität für die beiden basischen Aminosäuren an der Position P₁ (Perona und Craik, 1995; Olsen *et al.*, 2004). Die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) für die beiden basischen Aminosäuren ist mindestens um den Faktor 10⁵ größer als für die anderen natürlichen Aminosäuren, wobei nach Arginin nochmals um den Faktor 2 bis 10 bevorzugt gegenüber Lysin gespalten wird (Craik *et al.*, 1985). Die sekundären Bindestellen des Peptids an die Protease spielen für die Spezifität nur eine untergeordnete Rolle, tragen aber zu einer Erhöhung der katalytischen Effektivität bei (Corey *et al.*, 1992; Schellenberger *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 2000; Baird *et al.*, 2001). Strukturell wird die hohe Spezifität des Trypsins durch die geometrische Beschaffenheit seiner S₁-Bindetasche erreicht. Während das Substratpeptid ein antiparalleles β -Faltblatt mit der Protease eingeht, ragt die P₁-Seitenkette in die Bindetasche hinein, an deren Boden sich die negativ geladene Carboxylgruppe des Aspartats 189 befindet (Abb. 1-9AB). Diese interagiert direkt mit der Guanidiniumfunktion des Arginins oder vermittelt über ein Wassermolekül den Kontakt zur ϵ -Aminogruppe eines Lysins (Gráf *et al.*, 1987; Gráf *et al.*, 1988; Perona *et al.*, 1994). Nicht zuletzt wegen dieser außergewöhnlich starken Spezifität ist Trypsin für viele Proteomforscher die Protease der Wahl, wenn ein möglichst vorhersagbares Peptidspektrum entstehen soll. Als weitere Unterstützung zum Erhalt möglichst aussagekräftiger Ergebnisse sind zahlreiche modifizierte Trypsinprodukte kommerziell erhältlich, die möglichst wenig Fremd- und Autoproteolyseaktivität aufweisen (Sebela *et al.*, 2006). Dies wird zum einen durch die Behandlung mit speziellen Inhibitoren anderer Proteasen (z.B. dem Chymotrypsin-Inhibitor TPCK), zum anderen über eine Dimethylierung aller Lysine des Trypsins, also der mehrheitlich endogenen Schnittstellen in der Proteasesequenz, erreicht. Von vielen anderen Proteasen sind mittlerweile auch modifizierte oder behandelte Varianten zu beziehen, welche jedoch bei weitem nicht so umfassend angewendet werden wie die modifizierten Trypsine.

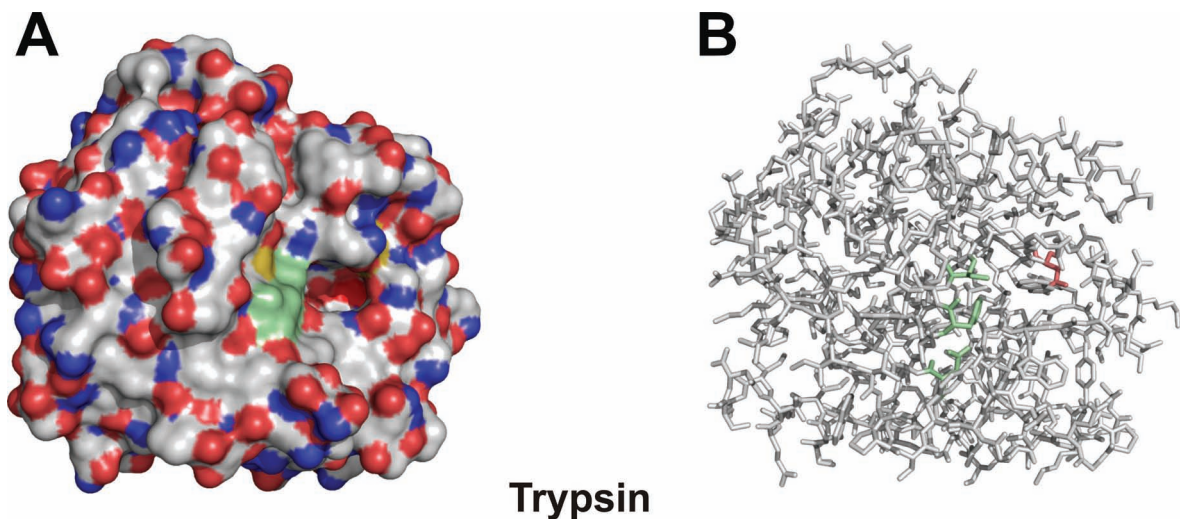


Abb. 1-9: 3D-Strukturmodelle von Trypsin.

(A) Raumfüllendes Oberflächenmodell von Trypsin. Die katalytische Triade ist grün hervorgehoben; rot, blau und gelb kennzeichnen O-, N- und S-Atome. (B) Gittermodell des Trypsins mit Kennzeichnung der katalytischen Triade (grün) und des spezifitätsbestimmenden Aspartats 189 (rosa). Identische Orientierung wie (A) (3D-Strukturmodelle siehe Tab. 3-10).

Die Primärsequenz einer weiteren Protease aus der Bauchspeicheldüse, des Chymotrypsins, weist lediglich 50% Homologie zu Trypsin auf. Trotzdem sind ihre funktionellen Tertiärstrukturen nahezu identisch (Abb. 1-9A; Abb. 1-10A). Auch dieses Enzym besitzt eine ausgeprägte Spezifität für die Position P_1 , die sich jedoch grundlegend von der des Trypsins unterscheidet. Die entsprechende S_1 -Bindestelle enthält keinen geladenen Rest, sie besteht ausschließlich aus Atomen der Hauptkette der Proteinsequenz und bildet somit eine große hydrophobe Tasche (Abb. 1-10A). Diese Morphologie führt zu einer P_1 -Spezifität für die großen sperrigen und aromatischen Seitenketten von Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Leucin oder Methionin (Bergman und Fruton, 1941; Neurath, 1957; Desnuelle, 1960). Allerdings kann durch ein Mutationsexperiment an der Aminosäure-Position 189, wodurch ein Aspartatrest im Inneren der Tasche analog zum Trypsin erzeugt wird, nicht einfach eine tryptische Spezifität generiert werden (Venekei *et al.*, 1996). Auch weitere Aminosäure-Substitutionen waren nicht erfolgreich, allerdings war man in der Lage im umgekehrten Experiment auf diesem Wege eine weitgehende Konvertierung von Trypsin zu Chymotrypsin durchzuführen (Hedstrom *et al.*, 1992; Hedstrom *et al.*, 1994; Perona *et al.*, 1995). Dass dieses Experiment nur in eine Richtung funktioniert, kann der größeren Flexibilität der

Chymotrypsin-Struktur zugesprochen werden, während Trypsin ein eher starres Gebilde darstellt (Markley, 1979). Möglicherweise ist gerade diese erhöhte Flexibilität auch mit dafür verantwortlich, dass das Enzym im Vergleich zu Trypsin einen deutlich höheren Anteil an nicht-spezifischen Schnitten erzeugt. Aus diesem Grund ist die Verwendung von Chymotrypsin in der Proteomanalytik aufwendiger, obwohl seine Spezifität der Untersuchung von Membranproteinen, die nur wenige tryptische Schnittstellen besitzen, sicherlich zugutekommt (Ulmschneider *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2006).

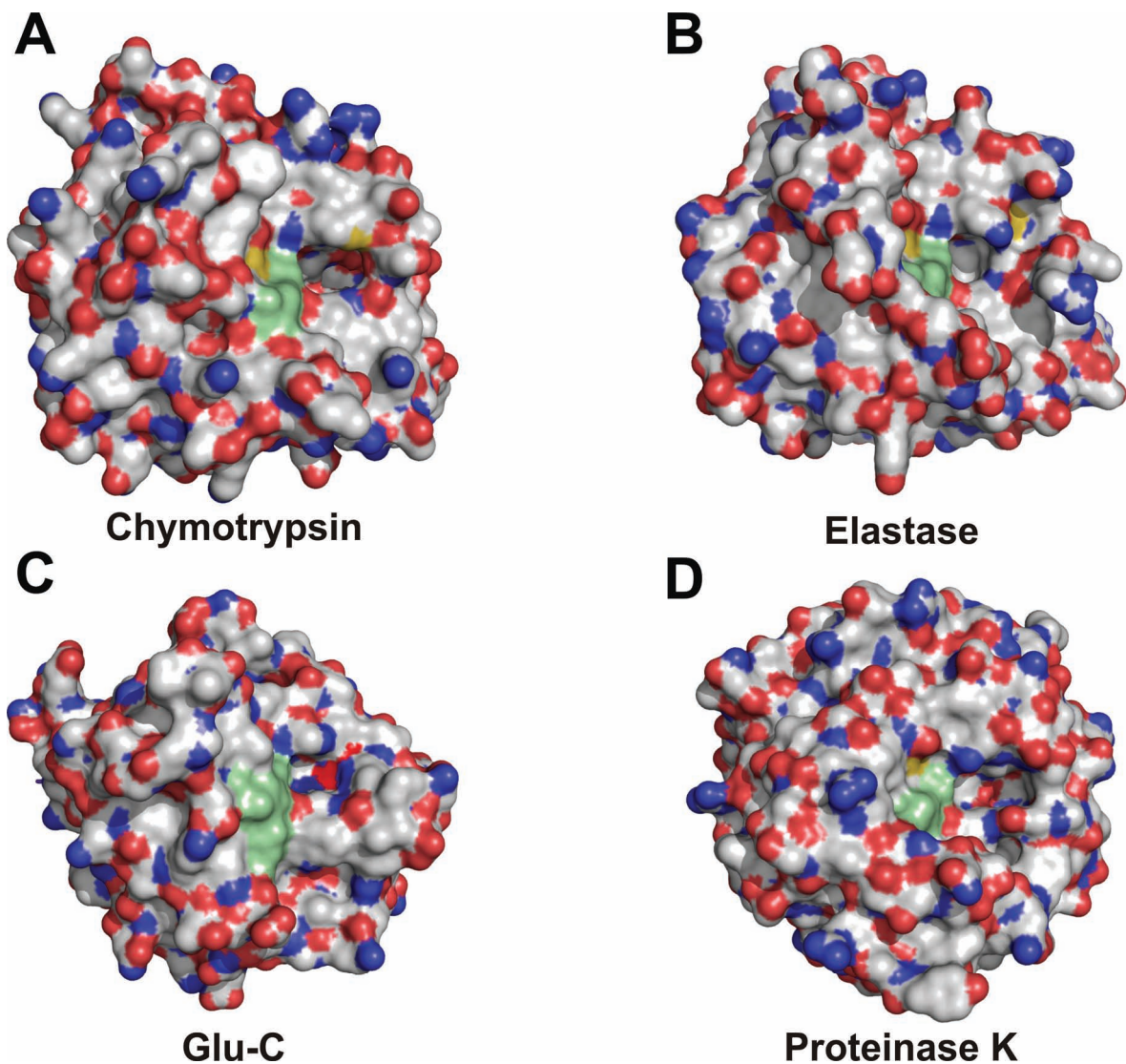


Abb. 1-10: 3D-Strukturmodelle weiterer Serinproteasen.

Raumfüllende Oberflächenmodelle von Chymotrypsin (A), Elastase (B), Glu-C (C) und Proteinase K (D). Die katalytische Triade ist grün hervorgehoben; rot, blau und gelb kennzeichnen O-, N- und S-Atome. Alle Proteasen sind in vergleichbarer Orientierung gezeigt, um Einblick in die S_1 -Bindetasche rechts des aktiven Zentrums zu erhalten (3D-Strukturmodelle siehe Tab. 3-10).

Das dritte vorgestellte Verdauungsenzym ist die Pankreatische Elastase I, die von vielen Säugetieren, aber nicht von der Bauchspeicheldrüse des Menschen produziert wird. Diese synthetisiert überwiegend Elastase II, welche aber die gleiche physiologische Funktion übernimmt (Gertler *et al.*, 1977). Die hochgradig glykosylierten Elastasen sind über ihre Fähigkeit zum Abbau des Faserproteins Elastin, der Elastinolyse, definiert. Das fibrilläre Protein ist reich an den Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin und Valin und wird in der Regel von anderen Proteasen wie Chymotrypsin aufgrund seiner außerordentlichen Stabilität nicht hydrolysiert. Aus Experimenten mit verschiedensten Substraten wurde eine P₁-Spezifität für die Aminosäuren Alanin, Serin, Glycin, Valin und Isoleucin abgeleitet (Bieth, 1978; Largman, 1983; Takahashi *et al.*, 1989). Elastase besitzt folglich eine Spezifität für kleine, nichtgeladene Seitenketten. Diese katalytische Spezifität ist konform mit der Tertiärstruktur der S₁-Bindestelle des Enzyms (Abb. 1-10B; Bode *et al.*, 1989). Die Bindetasche wird ähnlich dem Chymotrypsin überwiegend durch unpolare Strukturen gebildet, ist aber deutlich kleiner. Im Wesentlichen gleichen sich die Strukturen, allerdings ragen im Falle von Elastase die zwei nichtgeladenen Seitenketten von Serin 189 und Valin 216 in den Hohlraum und versperren die Bindetasche (Abb. 1-11). Da auch Elastase eine hohe Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur zu Trypsin aufweist, verläuft die Bindung des Substratpeptids an die Protease analog. Allerdings zeigt die katalytische Aktivität der Elastase eine starke Abhängigkeit von der Kettenlänge des gebundenen Substrats (Bieth, 1986). Das Besetzen der Bindestelle S₄ vier Positionen vor der eigentlichen Schnittstelle erhöht die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m bis um das 500-fache (Bieth *et al.*, 1989). Die verstärkte Bindung durch die P₄-S₄-Interaktion könnte dann zu einem optimalen Abstand der Spaltstelle zum Enzym führen oder zu einer Erhöhung der Nukleophilie des katalytischen γ -O des Serins 195 beitragen (Bieth, 2004). Im Gegensatz zu den anderen vorgestellten Enzymen wurde Elastase bisher nur in sehr wenigen Fällen zur Proteinanalyse herangezogen (Schlosser *et al.*, 2002; Galkin *et al.*, 2007).

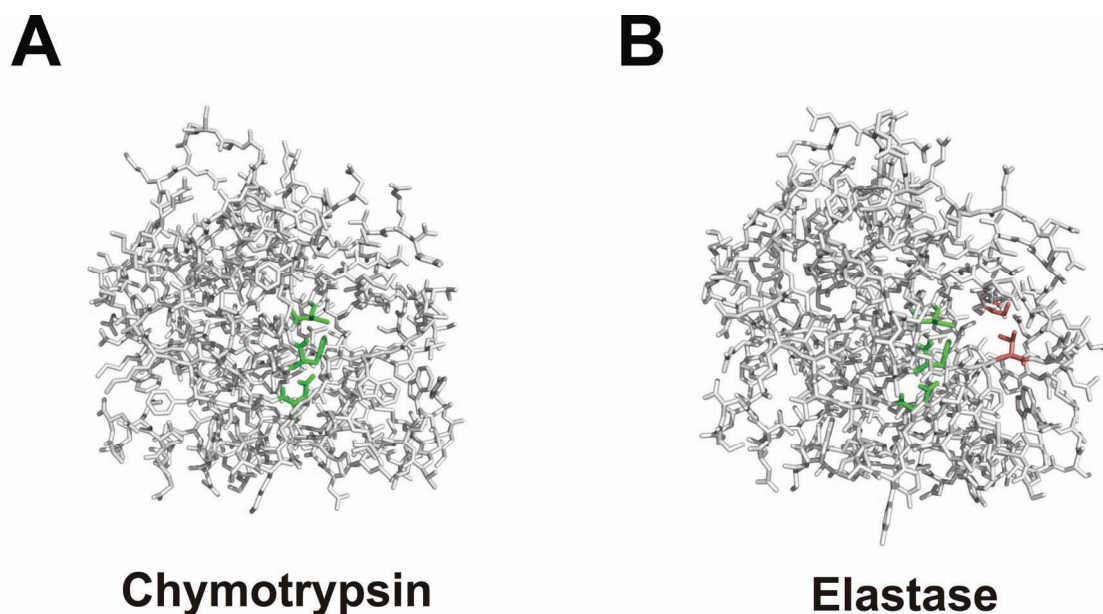


Abb. 1-11: Strukturvergleich von Chymotrypsin und Elastase.

Gittermodelle von Chymotrypsin (A) und Elastase (B). Die katalytische Triade ist jeweils grün gekennzeichnet, die zwei die S_1 -Bindetasche der Elastase blockierenden Seitenketten von Serin 189 und Valin 216 sind rosa hervorgehoben (3D-Strukturmodelle siehe Tab. 3-10).

Die bakterielle Glutamyl Endopeptidase I, bzw. Glu-C (V8) wurde fälschlicherweise den Metalloproteasen zugeordnet, da sie sich nicht durch den Serinproteasen-Inhibitor PMSF irreversibel hemmen ließ (Drapeau *et al.*, 1972; Yoshida *et al.*, 1988). Sie besitzt eine ausgeprägte P_1 -Spezifität für die sauren Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure, wobei die Spaltung nach Glutaminsäure ca. 5000-fach bevorzugt erfolgt (Breddam und Meldal, 1992). Verantwortlich für die Spezifität sind zwei Seitenketten in der Bindetasche, die insgesamt deutlich undefinierter erscheint als bei den anderen vorgestellten Proteasen (Abb. 1-10C). Die Interaktion mit der γ -Carboxylgruppe des zu spaltenden Peptids wird durch Histidin 213 aber auch durch die Hydroxylgruppe des Threonins 190 eingegangen (Barbosa *et al.*, 1996). Insgesamt zeigt das Enzym aber mehr Fremdaktivität für Schnitte außerhalb der Spezifität als Trypsin und auch eine deutlich höhere Autoproteolyse (Stennicke und Breddam, 2004). Entgegen weit verbreiteter Annahmen wird die Spezifität des Enzyms nicht durch die äußeren Pufferbedingungen beeinflusst, allerdings ist die Hydrolyserate des Enzyms in Phosphatpuffer 10-fach im Vergleich zu Ammoniumhydrogencarbonat (ABC)-Puffern erhöht, da das

Hydrogencarbonat-Ion das Enzym inhibiert (Sørensen *et al.*, 1991). Als auffälliges Merkmal besitzt Glu-C eine 12-malige Wiederholung des Tripeptids Pro-Asn/Asp-Asn am C-Terminus, die in verwandten bakteriellen Proteasen nicht auftritt und auch nicht essentiell für die katalytische Aktivität ist (Carmona und Gray, 1987; Yabuta *et al.*, 1995).

Die alkalische Proteinase K wird von dem Schlauchpilz *Engyodontium album* bei Anwesenheit von Keratin ins Nährmedium sekretiert (Ebeling *et al.*, 1974). Sie besitzt eine grundlegend andere Faltung als die vorher behandelten Serinproteasen, verwendet aber den gleichen Katalysemechanismus mit Ser-His-Asp-Triade und Oxyaniontasche (Abb. 1-10D; Betzel *et al.*, 2001). Die morphologische Beschaffenheit der entsprechenden Bindetasche ist als relativ groß und undefiniert anzusehen und unterstützt die Annahme des Fehlens einer Spezifität. Wie bei den verwandten Subtilisin-Proteasen besteht eine gewisse Bevorzugung von aromatischen und hydrophoben Aminosäuren, die aber nicht an die Spezifität des Chymotrypsins heranreicht (Kraus *et al.*, 1976). Somit ist Proteinase K als weitgehend unspezifisch für die P₁-Position anzusehen, was ihr analytisches Einsatzgebiet deutlich einschränkt. In der P'₁-Position tragen kleine Seitenketten von Aminosäuren wie Alanin und Glycin zu einer schnelleren Spaltung des gebundenen Peptids bei (Brömme *et al.*, 1986). Die geringe Spezifität und hohe Aktivität über einen breiten pH-Bereich resultiert in einer hohen Autoprotolyse, die besonders bei geringen Enzymkonzentrationen < 10 µg/ml ausgeprägt ist (Bajorath *et al.*, 1988; Sweeney und Walker, 1993).

1.4.3 Aspartatproteasen

Neben den Serinproteasen, die das zur Spaltung der Peptidbindung notwendige Nukleophil durch einen kovalent gebundenen, deprotonierten Serinrest bereitstellen, existieren auch weitere Proteasetypen, die andere strukturelle Mechanismen zur Generierung des Nukleophils besitzen. Im Falle der Aspartatproteasen ist dies ein aktiviertes Wassermolekül, welches den Carbonylkohlenstoff der Peptidkette in Form eines Hydroxidions angreift. Es wird durch die spezielle geometrische Anordnung zweier Aspartatreste, die als Liganden für das besagte Wassermolekül fungieren und die Basenkatalyse ausführen, im aktiven Zentrum des Enzyms erzeugt (Abb. 1-12). Zusätzlich wird entsprechend der Oxyaniontasche in den Serinproteasen, der Übergangszustand durch eine elektrophile Struktur aus einem der Aspartate und über den Phenolring eines Tyrosins stabilisiert (Blundell *et al.*, 1987; James *et al.*, 1992). Aus unbekanntem Gründen ist diese Form der Katalyse nur in Endoproteasen verwirklicht, obwohl es keine offensichtlichen Gründe gibt, warum dieser Mechanismus nicht auch in einer Exoprotease verwirklicht werden könnte (Rawlings und Barrett, 2004).

Wie alle Proteasen werden auch die Aspartatproteasen systematisch unterteilt. Das hier ausführlich besprochene Pepsin gehört der Familie A1 an. Pepsin ist eine von der Magenschleimhaut produzierte stark saure Protease, die im Gegensatz zu den vorgestellten Serinproteasen eine Aktivität im sauren pH-Bereich bei einem pH-Optimum von 3,5 aufweist (Lin *et al.*, 1992). Die physiologisch aktive Struktur ist das Monomer mit einem Molekulargewicht von 34,6 kDa. Es besteht aus zwei identischen lappenförmigen β -Barrel-Domänen, die jeweils ein Aspartat der katalytischen Dyade tragen und höchstwahrscheinlich durch die Duplikation eines ursprünglichen Gens entstanden sind (Tang *et al.*, 1978). Pepsin besitzt als multifunktionale Protease des Magens eine relativ geringe Spezifität. Die prominentesten Erkennungsstellen auf dem Enzym sind die S₁- und S'₁-Motive, die große hydrophobe Seitenketten wie Phenylalanin und Leucin bevorzugen (Tang, 1963; Fruton, 1976). Die Erkennung weiter von der Schnittstelle entfernter Bindungsstellen ist wie auch bei den anderen Enzymen weitaus weniger spezifisch (Dunn *et al.*, 1986; Rao und Dunn, 1995). Neuere Erkenntnisse über die Spezifität konnten aus der Auswertung proteomischer Datensätze gewonnen werden, diese decken sich aber weitgehend mit den älteren Ergebnissen (Zhang *et al.*, 2008; Hamuro *et al.*, 2008). Kleinere Spezifitätsunterschiede lassen sich durch ein unterschiedliches Ansprechen des Enzyms auf verschiedene pH-Werte erklären, da die entsprechenden Versuche nicht bei ein und demselben normierten pH-Wert durchgeführt wurden.

Pepsin wird vor allem in den analytischen Abläufen zur Proteolyse verwendet, in denen ein saures Milieu zwingend erforderlich ist. Hauptsächlich sind dies Wasserstoff-Deuterium-Austausch (HDX)-Experimente, bei denen sowohl der niedrige pH-Wert als auch die breite Spezifität des Pepsins dem Reaktionsablauf zugutekommt (Zhang et al., 2008). Hierzu wird das Enzym oft in seiner immobilisierten Form an spezielle Trägermaterialien gebunden und nur kurz verdaut, um Autoproteolyse zu reduzieren und seine Effizienz zu erhöhen (Huenerbein et al., 2007; Schmelzer et al., 2007; Hamuro et al., 2008; Stigter et al., 2008)

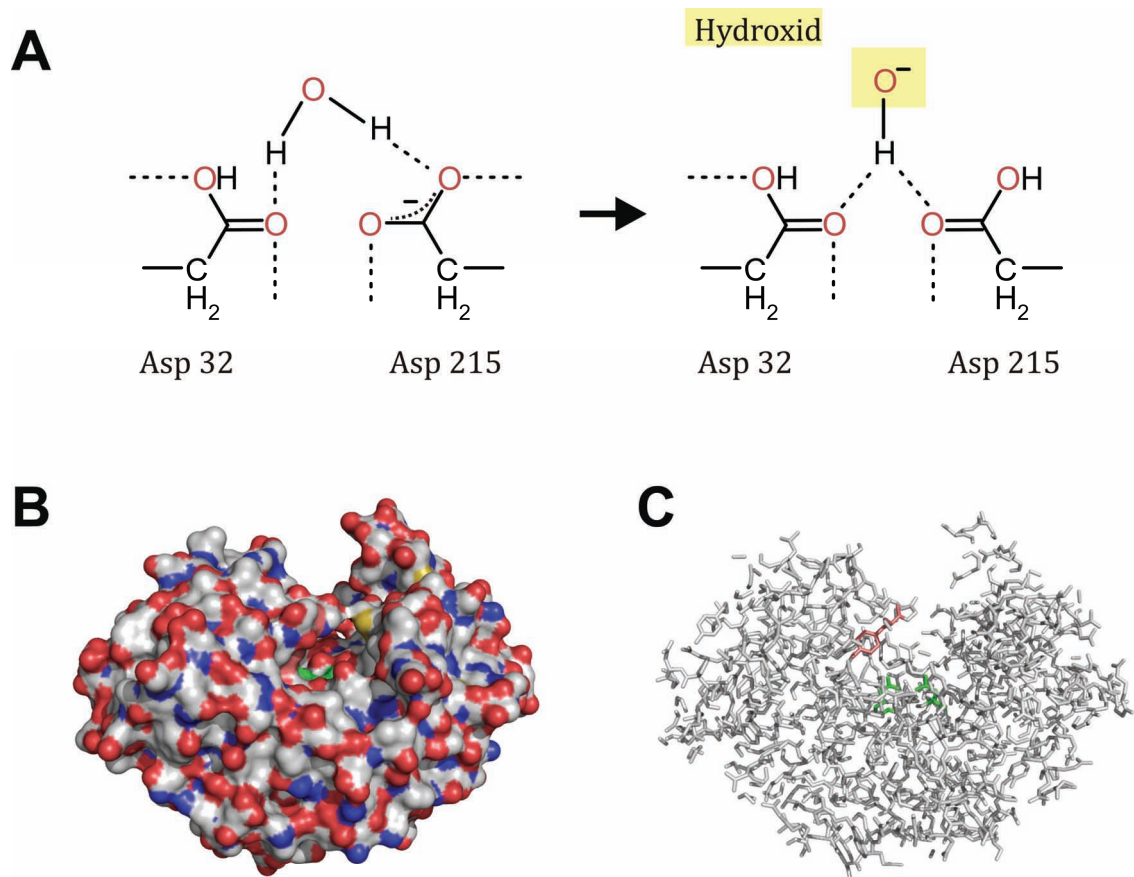


Abb. 1-12: Aktives Zentrum der Aspartatprotease Pepsin.

(A) Schema der Generierung des Hydroxid-Nukleophils im aktiven Zentrum von Pepsin. (B) Raumfüllendes Oberflächenmodell eines Pepsin-Monomers, das aktive Zentrum ist grün markiert. (C) Analoges Gittermodell eines Monomers, die Aspartat-Reste der katalytischen Dyade sind grün, das Tyrosin 75 zur Stabilisierung des Übergangszustandes ist rosa gekennzeichnet (3D-Strukturmodell siehe Tab. 3-10).

1.4.4 Cystein- und Metalloproteasen

Weitere große Endoproteasegruppen, die abweichende Katalysemechanismen besitzen, sind die Cysteinproteasen und Metalloproteasen. Cysteinproteasen besitzen eine ähnliche Funktionsweise wie Serinproteasen. Bei ihnen ist lediglich das Serin im aktiven Zentrum durch ein Cystein ersetzt, so dass dort eine Asp-His-Cys-Triade vorliegt. Während die Bildung des Alkoholat-Nukleophils in Serinproteasen unmittelbar beim Alkylierungsschritt durch das Peptid über eine generelle Basenkatalyse mit Hilfe des benachbarten Histidins erfolgt, liegt das entsprechende Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar in den Cysteinproteasen schon im freien Enzym vor (Polgár *et al.*, 2004). Wie bei den Serinproteasen auch entspricht der weitere Ablauf der Reaktion der allgemeinen Säurekatalyse. Zu den bekanntesten Cysteinproteasen zählen u.a. diverse Caspasen, Bromelain und Papain, welches überwiegend zur Erzeugung von F_c-Fragmenten aus Antikörpern verwendet wird (Inman und Nisonoff, 1966).

Bei den Metalloproteasen sind jene ein bis zwei Metallkationen namensgebend, die ein aktiviertes Wassermolekül tetraedrisch koordinativ gebunden haben, um ähnlich den Aspartatproteasen das notwendige Nukleophil bereitzustellen. Die anderen Ligandenpositionen werden durch geladene Peptidseitengruppen der Protease besetzt. In den meisten Fällen sind die gebundenen Metalle Zinkionen, vereinzelt sind aber auch Mangan- oder Kobaltionen anzutreffen. Eine wichtige Metalloendoprotease ist das temperaturstabile Thermolysin, den überwiegenden Teil der Metalloproteasen stellen aber Amino- und Carboxyexoproteasen. Aufgrund ihrer geringen Spezifität werden Cystein- als auch Metalloendoproteasen nicht zur allgemeinen Proteolyse im *Proteomics*-Bereich eingesetzt.

1.4.5 Chemische Spaltreagenzien

Neben der enzymatischen Spaltung kann die Proteinkette auch durch einige chemische Reagenzien gespalten werden. Hierbei handelt es sich nicht, wie beim Kochen in Salzsäure, um eine unspezifische Hydrolyse aller Peptidbindungen, sondern um spezifische Schnitte nach oder zwischen bestimmten Aminosäuren.

Am häufigsten wird hierzu Cyanbromid eingesetzt, welches quantitativ nach allen Methioninresten im Protein die Peptidbindung hydrolysiert (Witkop, 1961, Gross und Witkop, 1962). Nach Tryptophanresten kann mit BNPS-Skatol oder Iodosobenzoesäure gespalten werden (Fontana, 1972; Hunziker *et al.*, 1980). Allerdings sind die aggressiven Reaktionsbedingungen problematisch, die zum Ablauf der Reaktionen nötig sind. Nahezu alle chemischen Spaltreagenzien sind nur unter extrem hohen Konzentrationen von Säuren oder Basen ausreichend aktiv, was eine Weiterverarbeitung der Probe erschwert. So verursachen hohe Ameisensäurekonzentrationen ungewollte Spaltungen von Bindungen zwischen Asparaginsäure und Prolin und können die Probe formylieren (Piskiewicz *et al.*, 1970; Loo und Loo, 2007). Die Verwendung chemischer Agenzien zur Spaltung von Proteinen besitzt allerdings den Vorteil, dass weder störender Selbstverdau noch nicht-spezifische Schnitte auftreten können. Zudem handelt es sich um kleine Moleküle, die einfacher an schwer zugängliche Zielstrukturen gelangen können, was für viele Proteasen ein Problem darstellt.

1.4.6 Die optimale Protease zur Hydrolyse von Membranproteinen

In den letzten Jahren haben sich innerhalb der *Bottom up-Proteomics* einige sehr erfolgreiche Protokolle zur Untersuchung von Proteinen aber auch von komplexen Proteinmischungen etabliert. Diese kombinieren zahlreiche der bereits vorgestellten Trennmethode mit einer Hydrolyse der zu untersuchenden Proteine durch die Protease Trypsin. Normalerweise werden die Proteolysereaktionen in einem wässrigen System durchgeführt, welches weitgehend das natürliche duodenale Milieu nachbilden soll. Schwach alkalische Puffersysteme wie ABC, TRIS oder HEPES bieten sich hierfür an. Die erzeugten Peptide können dann massenspektrometrisch detektiert werden. Trypsin stellt hierfür eine nahezu perfekte Protease dar, denn es besitzt eine hohe Spezifität für zwei Aminosäuren, die zu ca. 10,8% in den Primärsequenzen von Proteinen vorkommen (Quelle: NCBIInr-Datenbank). Somit wird statistisch nach jeder zehnten Aminosäure gespalten, wodurch die resultierenden Längen entstehenden der Peptide im optimalen Bereich der nachfolgenden Detektion liegen, da weniger als 10% von ihnen kleiner als 600 Da sind (Fischer und Poetsch, 2006). Ein typisches, kleineres Proteom (z.B. *Halobacterium salinarium*) mit ungefähr 2.800 Proteinen wird durch Trypsin in ca. 30.000 Peptide gespalten. Im Falle von Chymotrypsin mit vier Schnittstellen (FWYL entsprechend ca. 18,0% des Aminosäure-Vorkommens) sind es, ohne die Berücksichtigung überlesener Schnittstellen, schon 45.000 Peptide, Proteasen mit noch geringerer Spezifität produzieren folglich noch größere Peptidpopulationen.

Die genannten Vorteile von Trypsin sind jedoch nicht für alle Proteinsubstrate gültig, sondern unterliegen einigen Einschränkungen. Erstens muss das zu untersuchende Protein eine entsprechende Anzahl tryptischer Schnittstellen, sprich Arginin- und Lysinreste, enthalten und zusätzlich sollten diese möglichst gleichmäßig über die Proteinsequenz verteilt sein. Dies ist aber gerade bei α -helikalen Membranproteinen nicht der Fall. Sie sind überwiegend hydrophob, besitzen deshalb nur wenige geladene Aminosäuren, zu denen Arginin und Lysin zählen. Falls dennoch geladene Seitenketten vorhanden sind, treten diese gehäuft in den hydrophilen Schleifenregionen der Membranproteine auf. Dies führt selbst bei einer optimalen Spaltung durch Trypsin zu langen Transmembranpeptiden und kurzen Peptiden aus den Schleifenregionen. Das verwendete Modellprotein Bacteriorhodopsin besitzt beispielsweise nur sieben Arginin- und sieben Lysinreste, was einem Gesamtanteil von 5,6% an tryptischen Schnittstellen in der gesamten Primärsequenz entspricht. Im für Massenspektrometer üblichen Messbereich zwischen 700 und 4.000 Da existieren sechs mögliche tryptische Peptide. Im realen MALDI-PMF-Experiment wurden

drei tryptische Peptide nachgewiesen, die lediglich 8% der Bacteriorhodopsin-Sequenz abdecken (Fischer und Poetsch, 2006). Durch den Wechsel der Protease auf Chymotrypsin oder einen kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-Verdau lassen sich geringfügig bessere Ergebnisse erzielen. Es werden bis zu sechs Peptide (27% Sequenzabdeckung) zugeordnet. Chymotrypsin schneidet nicht wesentlich besser ab, da die von ihm geschnittenen aromatischen Aminosäuren in den meisten Proteinsequenzen unterrepräsentiert sind.

Die Hydrophobizität der Bestandteile von Membranprotein-Proben ist ein weiteres Problem für die Proteolyse. Die unpolaren Transmembranbereiche lagern sich in wässrigen Lösungen häufig zusammen und führen zur Bildung eines Präzipitats, welches kein geeignetes Substrat für die Protease darstellt. Ebenso sind sie häufig mit Lipiden, Detergenzien oder anderen unpolaren Proteinbereichen bedeckt, so dass die Zugänglichkeit einer Protease zu potentiellen Schnittstellen erschwert ist.

Neben allgemein verbesserten Reinigungsstrategien zur Isolierung der Membranproteine haben sich einige modifizierte Proteolyseprotokolle speziell zur *Shotgun*-Analyse durchgesetzt, um speziell die Probleme hinsichtlich der Löslichkeit und Proteolyse anzugehen. Sie basieren überwiegend auf dem Einsatz alternativer Lösungsmittelsysteme und/oder anderer Proteasen als Trypsin. Das Problem der Zugänglichkeit zu den Transmembranbereichen kann durch die Verwendung von CNBr als chemischem Spaltreagenz umgangen werden (Washburn *et al.*, 2001). Da es nur an den im Proteom seltenen Methioninresten schneidet, kann durch einen Vorverdau der Probe mit Trypsin, der lösliche Anteil bereits abgetrennt und separat analysiert werden. Allerdings sind für die CNBr-Spaltung hohe Ameisensäurekonzentrationen erforderlich, welche die bereits beschriebenen Nebenreaktionen eingehen können. Mit deutlich weniger Ameisensäure kommt ein Protokoll zur Untersuchung des Membranproteins Aquaporin 0 aus, welches Pepsin zum Verdau einsetzt (Han *et al.*, 2004). Hierbei wurde die gesteigerte Löslichkeit des integralen Membranproteins in der organischen Säure ausgenutzt und 100% Sequenzabdeckung erzielt. Alternativ existieren Ansätze ohne Ameisensäure, bei denen der proteolytische Schritt in Anwesenheit von 60% Methanol durchgeführt wird. Mittels Trypsin lässt sich hier eine umfassendere Untersuchung von Bacteriorhodopsin und den Purpurchromophoren gewährleisten, jedoch bestehen weiterhin die oben besprochenen Probleme durch die Anwendung von Trypsin auf Membranproteine (Blonder *et al.*, 2004b). Durch die Kombination von Trypsin mit Chymotrypsin lassen sich in Methanol deutlich bessere Ergebnisse erzielen, da das Schnittstellenproblem von

Trypsin reduziert wird (Fischer *et al.*, 2006). Auch weit weniger spezifische Proteasen wurden bereits erfolgreich eingesetzt. Ein Vorverdau von Membranen mit Proteinase K und anschließendem Nachverdau der Transmembranbereiche mit CNBr hat sich als vielversprechend erwiesen (Wu *et al.*, 2003; Speers *et al.*, 2007). Allerdings entstehen bei Spaltungen mit wenig spezifischen Proteasen sehr komplexe Peptidgemische, die ein hohes Maß an Trennleistung erfordern, weshalb diese Analysen auch nur mit aufwendigen zweidimensionalen flüssigchromatographischen Techniken angewandt wurden.

Jedes dieser Protokolle stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber dem Referenzprotokoll dar, trotzdem bleibt die Identifizierung der Transmembranbereiche ein Problem. Keines der alternativen Enzyme besitzt wirklichen Zugang zu den Helixbereichen und der Verlust an Spezifität im Vergleich zu Trypsin erschwert die Interpretation der Daten zusätzlich. Eine zusammenfassende Übersicht der auftretenden Einschränkungen bei der Verwendung der vorgestellten Analysemethoden vermittelt Abb. 1-13. Ein für die Membranproteomanalyse optimales Enzym vereint alle Vorteile in sich: es müsste eine gute Schnittspezifität für in Membranproteinen ausreichend vorkommende Aminosäuren besitzen aber auch Zugang zu diesen haben, wie es bei chemischen Spaltreagenzien der Fall ist. Gleichzeitig dürften die Autoproteolyse und seine enzymatische Aktivität nicht zu hoch sein, um die Komplexität der Proben, wie im Falle von Proteinase K, nicht unnötig zu erhöhen. Prinzipiell erfüllt die pankreatische Elastase zumindest einen Teil des Anforderungsspektrums, da bereits bekannt ist, dass sie eine Spezifität für die häufig in den Membranhelices vorkommenden kleinen ungeladenen Aminosäuren besitzt. Ihr wurde bereits vor Jahrzehnten eine gewisse Eignung für die massenspektrometrische Analyse von Proteinen zugesprochen (Morris, 1974), allerdings auch Aktivitätsprobleme bei der Anwendung auf komplexe Proteingemische nachgesagt (Wu *et al.*, 2003). Prinzipiell sollte jedoch aufgrund der hohen Homologie innerhalb der Serinprotease-Familie S1 angenommen werden, dass auch Elastase in methanolischen Lösungen zur Spaltung von Membranproteinen geeignet ist, wenn keine inaktivierende Konformationsänderungen der Protease durch das Lösungsmittel auftreten. Genauere Untersuchungen zu den anderen Punkten und zur generellen Kompatibilität mit bestehenden Protokollen zur Untersuchung von Membranproteinen wurden aber noch nicht durchgeführt.

1.5 Massenspektrometrie

1.5.1 Instrumentation für Biomolekül-Massenspektrometrie

Zweck eines Massenspektrometers ist es, gasförmige Ionen zu erzeugen, diese nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufzutrennen und anschließend zu detektieren. Jedes Massenspektrometer besteht hauptsächlich aus drei mehr oder weniger unabhängigen Bauteilen, der Ionenquelle, dem Massenanalysator und einem Detektor. Entweder findet der gesamte massenspektrometrische Prozess im Hochvakuum statt oder der Ionisationsvorgang wird unter Atmosphärendruck durchgeführt, wie es bei den Techniken ESI, APCI, AP-MALDI oder DART der Fall ist (Carroll *et al.*, 1975; Laiko *et al.*, 2000; Cody *et al.*, 2005).

Zur Ionisation größerer Biomoleküle, wie der von Peptiden oder Proteinen, haben sich zwei sanfte Techniken als geeignet herausgestellt, die Matrix-unterstützte-Laserdesorption/Ionisation (MALDI; Karas und Hillenkamp, 1988) und die Elektrospray-Ionisation (ESI; Fenn, 1988). Beide Verfahren zur Ionenerzeugung lassen sich, gemäß ihrer technischen Rahmenbedingungen mit verschiedenen Massenanalysatoren kombinieren (Tab. 1-1). Bei MALDI sind überwiegend Kopplungen mit Flugzeitmassen-Analysatoren vorzufinden (MALDI-TOF), die direkt kompatibel mit der gepulsten Ionenpaket-Erzeugung der MALDI-Quelle sind. Durch die Implementierung einer zweiten Ionenquelle zur Nachbeschleunigung von Fragmenten der primär gebildeten *Precursor*-Ionen werden in einem sog. Tandem-Massenspektrometer (MALDI-TOF/TOF) verbesserte MS/MS-Fragmentspektren erhalten (Medzihradsky *et al.*, 2000). Inzwischen werden MALDI-Quellen auch in Hybrid-Massenspektrometern verbaut, die mehrere verschiedene Massenanalysatoren enthalten. Eine MALDI-LIT-Orbitrap besitzt neben einer linearen Quadrupol-Ionenfalle (LIT) zur *Precursor*-Selektion und Fragmentierung zusätzlich den hochauflösenden Orbitrap-Massenanalysator, der eine sehr hohe Massengenauigkeit ermöglicht (Strupat *et al.*, 2007).

Gekoppelt an ESI-Quellen sind solche Hybrid-Massenspektrometer mit LIT-Orbitrap-Kombination weit verbreitet, zusätzlich existieren aber auch zahlreiche ESI-Geräte mit anderen Massenanalysatoren. Insbesondere Triple Quadrupol (QqQ)-, Quadrupol-Ionenfallen (QIT)- und LIT-Instrumente, aber auch Quadrupol-TOFs mit orthogonaler Extraktion finden in der Analytik Anwendung (Yost und Enke, 1979; Paul *et al.*, 1990; Tolmachev *et al.*, 2000; Boyle und Whitehouse, 1992). Eine ebenfalls sehr hohe

Massengenauigkeit bietet die Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS), welche jedoch einen großen apparativen Aufwand erfordert (Comisarow *et al.*, 1974, Henry *et al.*, 1989).

Tab. 1-1: Übersicht gängiger Massenspektrometer.

In der Tabelle sind die geläufigsten Ionenquellen, Massenanalysatoren und Detektoren aufgeführt. Abkürzungen siehe Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

Ionenquelle	Massenanalysator	Detektor
EI		
CI	Magnetisches Sektorfeld (B)	
FDI	Elektrisches Sektorfeld (E)	
LDI	Flugzeitanalysator (TOF)	
²⁵² Cf-PDI	Orthogonales TOF (oTOF)	<i>Faraday-Cup</i>
FAB	Quadrupol (Q)	Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV)
MALDI	Triple Quadrupol (QqQ)	<i>Channeltrons</i> (CEM)
ESI	Quadrupol-Ionenfalle (QIT)	Multikanalplatte (MCP)
APCI	Lineare Ionenfalle (LIT)	Messung von „ <i>Image currents</i> “
AP-MALDI	Orbitrap	
DART	FT-Ionenzyklotronresonanz (FT-ICR)	

1.5.2 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation

Die Grundvoraussetzung jeder massenspektrometrischen Messung ist die intakte Überführung des Analyten in die Gasphase. Während dies durch Elektronenstoß (EI; Thomson, 1897, Dempster, 1917, Aston, 1918)-, Chemische (CI; Munson und Field, 1966)-, Felddesorption (FDI; Beckey, 1969)-, Californium-252-Plasmadesorption (^{252}Cf -PDI; Macfarlane und Torgerson, 1976)-Ionisation oder *Fast Atom Bombardement* (FAB; Morris *et al.*, 1981) mit niedermolekularen temperaturstabilen Stoffen möglich ist, halten größere Biomoleküle der thermischen Belastung in der Regel nicht stand. Dies hat zur Entwicklung sanfter Ionisationsmethoden geführt, bei denen auch größere Analytmoleküle in die Gasphase überführt werden können. In Einzelfällen konnten mittels ^{252}Cf -PDI und insbesondere FAB Moleküle größer als 1.000 Da erfolgreich analysiert werden, für die routinemäßige Biomolekül-Massenspektrometrie reichte dies jedoch noch nicht aus (Wilkins *et al.*, 1985; Coates *et al.*, 1985; Macfarlane, 1999).

Das Verfahren der Laserdesorption-Ionisation (LDI) ermöglicht die Ionisation kleinerer organischer Substanzen, führt jedoch bei größeren Molekülen zu extensiver Fragmentierung (Fenner und Daly, 1966; Vastola *et al.*, 1970). Erst das Beimischen einer niedermolekularen organischen Matrix zur Probenpräparation ermöglicht eine schonende Überführung größerer Moleküle in die Gasphase. Das als MALDI bezeichnete Verfahren stellt heute eine der am weitesten verwendeten Ionisationsarten in der Massenspektrometrie dar (Karas *et al.*, 1985; Karas *et al.*, 1987; Karas und Hillenkamp, 1988; Karas *et al.*, 1989a). Mittels MALDI ist selbst die Ionisation intakter Proteine möglich, die teilweise Massen über 100 kDa besitzen (Karas *et al.*, 1989b; Karas *et al.*, 1990; Karas *et al.*, 1991, Hillenkamp *et al.*, 1991; Hillenkamp und Karas, 2000). Die Analytmoleküle kokristallisieren während der Probenpräparation mit der Matrix, sind aber auch in Flüssigkeitseinschlüssen nach erfolgter Kristallisation vorzufinden (Strupat *et al.*, 2001; Krüger *et al.*, 2001; Horneffer *et al.*, 2001). Als Matrixmoleküle kommen für die Messung von Peptiden überwiegend α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure (CHCA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) zum Einsatz, für andere Analytgruppen (z.B. Proteine, Oligonukleotide) existieren weitere Matrices (Taranenko *et al.*, 1994; Beavis *et al.*, 1989; Strupat *et al.*, 1991). Die Matrix übernimmt in erster Linie die Aufgaben der Absorption des Laserlichts, der Übertragung der zur Desorption nötigen Energie und die Bereitstellung von Protonen für den Transfer auf den Analyten. Üblicherweise werden ultraviolette Strahlung emittierende N_2 - (337 nm) oder Nd:YAG-Laser (355 nm) verwendet. Da die Matrix deutlich im

Überschuss zugesetzt wird, wird die thermische Belastung des Analyten bei UV-MALDI drastisch gesenkt und eine Fragmentierung weitgehend vermieden. Ab einer gewissen Bestrahlungsstärke kommt es zu einem Abtrag der Präparation und in der sich rasch ausdehnenden MALDI-*Plume*, der entstehenden Wolke aus Analyt- und Matrixmolekülen, bilden sich Ionen (Strupat *et al.*, 1991; Ens *et al.*, 1991; Mowry *et al.*, 1993, Quist *et al.*, 1994). Zur genauen Erklärung der ablaufenden Prozesse zur Ionenbildung existieren mehrere Modelle, u. a. das *Cluster*-Modell, bei dem der Analyt mit der Matrix als *Cluster* desorbiert und dann über verschiedenste Prozesse wie Photoionisation oder Ladungstrennung seine Ladung erhält (Karas *et al.*, 2003). In den *Clustern* kommt es dann durch Protonen- und Elektronentransfer zu Neutralisationsreaktionen. Die am Ende detektierbaren mehrheitlich einfach geladenen Ionen stellen letztlich die „*Lucky Survivors*“ dieses Prozesses dar (Karas *et al.*, 2000). Beim klassischen Peptid-CHCA-MALDI kommt es zu einer starken Diskriminierung, da die Effektivität des Protonentransfers auf den Analyten stark von dessen Gasphasenbasizität und der Protonenaffinität der Matrix abhängt (Krause *et al.*, 1999). So werden bevorzugt Peptide mit stark basischen Lysin- und insbesondere Argininfunktionen protoniert, während es zu einer Suppression neutraler und saurer Peptide kommt. Erst kürzlich konnte eine deutlich verbesserte und gleichmäßigere Ionisation durch die Verwendung des CHCA-Derivats 4-Chlor-Cyanozimtsäure (CICCA) erreicht werden, die durch die verringerte Protonenaffinität der Matrix zu erklären ist (Jaskolla *et al.*, 2008; Jaskolla *et al.*, 2009). Auch für die Erzeugung negativer Ionen hat sich gezeigt, dass ein weiteres CHCA-Derivat, die 2,4-Difluor-Cyanozimtsäure (CFCA), als Alternative zu den bestehenden Matrices eingesetzt werden kann (Bäumlisberger *et al.*, 2009).

1.5.3 Das MALDI-TOF-Flugzeitmassenspektrometer

Das MALDI-Verfahren eignet sich als gepulstes Ionisationsverfahren zur Kopplung mit einem Flugzeitmassenanalysator. Die Ionen werden in der Ionenquelle mittels eines elektrischen Potentialgefälles beschleunigt und anschließend in eine feldfreie Driftregion im Flugrohr überführt. Die eigentliche Massentrennung beruht auf der unterschiedlichen Flugzeit, welche die Ionen zum Passieren der Driftstrecke zwischen Ionenquelle und Detektor, üblicherweise einer Mikrokanalplatte (MCP), benötigen. Bei gleichem Ausgangspunkt und kinetischer Energie ist die Verweildauer im Flugrohr direkt proportional zur Wurzel des Masse-zu-Ladungsverhältnisses eines Ions, welches dadurch berechnet werden kann (Stephens, 1946; Cameron *et al.*, 1948).

Das klassische axiale MALDI-TOF besitzt im Vergleich zu anderen Massenspektrometern eine hervorragende Sensitivität, da ohne verlustbehaftete Transferoptiken praktisch alle generierten Ionen ein Signal am Detektor erzeugen können. Dies gilt nicht für ESI-gekoppelte TOF-Geräte (Glish und Goeringer, 1984), da die Extraktion zur Generierung der für den TOF-Analysator notwendigen distinkten Ionenpakete aus dem kontinuierlichen ESI-Ionenstrom immer mit einem Verlust von Analytionen einhergeht. Bei der zur ursprünglichen Ionenachse orthogonalen Extraktion (ESI-qQ-oTOF) ergeben sich allerdings deutlich bessere Randbedingungen zur Erreichung hoher Massenauflösungen als in axialen Flugzeit-MS-Systemen (Boyle und Whitehouse, 1992; Verentchikov *et al.*, 1994). In einem oTOF werden die Ionen durch einen Spannungsimpuls aus einer räumlich ausgedehnten Ionenwolke beschleunigt und weisen vor dem Einsetzen der Beschleunigung vernachlässigbare Geschwindigkeitskomponenten in Flugrichtung auf. Die gepulste Extraktion der räumlich ausgedehnten Ionenwolke führt zu einem scharfen Ortsfokus im TOF-System außerhalb der gepulsten Quelle (Wiley und McLaren, 1955) und führt zusammen mit der Energiefokussierung durch einen Ionenreflektor zu einer geringen Streuung der am Detektor eintreffenden Ionen eines m/z -Wertes und somit zu hoher Auflösung und Massengenauigkeit.

In einer MALDI-Quelle kommt es durch den Laserbeschuss zu einem explosionsartigen Abtrag einer Probenschicht und zur Ausdehnung einer Wolke (*Plume*) von Analyt- und Matrixmolekülen und -ionen. Diese Ionen besitzen unterschiedliche Startgeschwindigkeiten und -richtungen. Erfolgt die Beschleunigung der Ionen unmittelbar in einem statischen elektrischen Feld, ergeben sich trotz nur geringer axialer Ortsunterschiede insbesondere durch bremsende Stöße mit Neutralteilchen für die

nachfolgende Flugzeitanalyse sehr nachteilige Ioneneigenschaften. Ionen einer Masse verlassen die Ionenquelle zu unterschiedlichen Zeiten mit unterschiedlichen Endenergien, so dass auch die Energiefokussierung durch Ionenreflektoren nur begrenzte Verbesserungen ermöglichte. Erst die Kombination der „verzögerten Extraktion“ (Brown und Lennon, 1995) mit Ionenreflektoren brachte hier den entscheidenden Durchbruch. Die Beschleunigungsspannung wird variabel typisch einige 100 ns nach dem Laserschuss angeschaltet. Die Ionenwolke dehnt sich während dieser Zeit durch die prozessgegebenen Ionenanfangsgeschwindigkeiten aus. Näher zum Detektor befindliche Ionen haben dann zwar eine geringere Strecke zurückzulegen, werden aber auch weniger beschleunigt, da sie eine geringere Potentialdifferenz durchlaufen. In der sogenannten Raumfokusebene werden sie von den stärker beschleunigten isobaren Ionen, die eine weitere Strecke zurücklegen müssen, eingeholt. Da durch die Zeitverzögerung und die Ausdehnung der Ionen- und Neutralwolke auch die Stöße der Ionen stark abnehmen, zeigen die Ionen im Ortsfokus im wesentlichen nur noch unterschiedliche (End-) Geschwindigkeiten bzw. -energien, deren Auswirkung auf die Flugzeit sich sehr gut durch einen Ionenreflektor minimieren lassen (Alikhanov *et al.*, 1957; Mamyurin *et al.*, 1973). Während der Driftphase treffen die Ionen auf ein elektrisches Gegenfeld, dringen in dieses ein und werden reflektiert. Ionen mit höherer Geschwindigkeit dringen tiefer in das Reflexionsfeld ein und müssen dementsprechend eine längere Flugstrecke zurücklegen. Im optimalen Fall treffen dann alle Ionen identischer Masse gleichzeitig am Detektor ein. Mittels dieser Optimierungen erreichen moderne TOF-Geräte gute Auflösungen, die bei entsprechender interner Kalibrierung zu Massengenauigkeiten unter 10 ppm führen (Han und Yates, 2008). Auch für lineare Flugzeitsysteme ohne Ionenreflektor, die für die Protein- und auch Oligonukleotidanalytik eingesetzt werden, bewirkt die verzögerte Extraktion bereits allein deutliche Verbesserungen. Hierbei muss durch eine zweistufige Extraktion bei geeigneten Spannungen und Verzögerungszeiten der Zeitfokus an das Ende eines linearen Flugrohrs gelegt werden.

Durch metastabile Zerfälle von Ionen nach der Beschleunigungsphase in der Quelle ist es möglich, Fragmentationenspektren von Molekülen mittels eines MALDI-TOF-Instruments aufzunehmen (Spengler *et al.*, 1992; Kaufmann *et al.*, 1993; Spengler *et al.*, 1997). Dieser als *Post Source Decay* (PSD) bekannte Prozess wird durch Überschüsse in der eingestrahlten Laserenergie verursacht, die dann zu Bindungsbrüchen führt oder durch die bei Stößen in der *Plume* übertragene Energie. Da die Ionen nur zu einem gewissen Teil fragmentieren, fliegen die entstandenen Fragmente zusammen mit den Vorläuferionen

durch das Flugrohr und werden erst durch den Reflektor nach ihrer Masse getrennt. Über einen *Timed Ion Selector* (TIS) unmittelbar vor dem Reflektor, kann gesteuert werden, dass nur ein Vorläufer-Fragmentenpaket durchgelassen wird. Andere „störende“ Ionen werden durch ihn abgelenkt. Aufgrund der bestehenden Geometrie lassen sich so jedoch nicht alle Fragmente gleichzeitig auf dem Detektor fokussieren, insbesondere kleinere Fragmente besitzen hierfür häufig zu geringe Energien. Aber selbst die Fragmente, welche auf den Detektor auftreffen, besitzen nur eine schlechte Auflösung, da der Reflektor die auftretenden großen Energieunterschiede nur ungenügend kompensieren kann. Diese Probleme wurden durch die Einführung von TOF/TOF-Geräten mit einer zweiten Quelle zur Beschleunigung beseitigt (Medzhradsky *et al.*, 2000; Suckau *et al.*, 2003). Dort durchlaufen über den TIS selektierte Vorläuferionen bei niederen Ionenenergien eine relativ lange lineare Strecke, in der metastabiler oder stoßinduzierter Zerfall erfolgt. Sie werden dann auf hohe Energien nachbeschleunigt, damit die relativen Energieunterschiede so klein werden, dass alle Fragmente in einem Schritt mit ausreichender Auflösung detektierbar werden. Ein *Metastable Ion Suppressor* (MIS) vor dem Reflektor blendet den *Precursor* und nach der Nachbeschleunigung entstandene metastabile Ionen aus. TOF/TOF-Instrumente bestehen somit praktisch aus zwei getrennten Massenspektrometern, im ersten wird der Vorläufer selektiert und im zweiten dessen Fragmentationen aufgetrennt. Zur Unterstützung der Fragmentierung kann eine Kollisionszelle vor die zweite Beschleunigungszelle für die *high-energy* kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) geschaltet werden. Die zu fragmentierenden Ionen werden hinter dem TIS abgebremst, kollidieren in der CID-Zelle mit einem Stoßgas und die entstandenen Fragmente werden anschließend durch die zweite Quelle beschleunigt. Die so erhaltenen Fragmentspektren sind dann eine Kombination aus dem laserinduzierten PSD in der ersten Quelle und der CID-Fragmentierung, wobei erstere sicherlich den größeren Beitrag zur Fragmentierung leistet.

Moderne MALDI-TOF/TOF-Geräte wie das *4800 TOF/TOF*TM (Abb. 1-14) werden mit großem Erfolg zur Identifizierung, Sequenzierung, Charakterisierung und Quantifizierung in der Protein- und Peptidanalytik eingesetzt. Sie ermöglichen eine schnelle, unkomplizierte Aufnahme von Spektren, da inzwischen Laser mit Frequenzen bis zu 1 kHz verbaut werden. Weitere Optimierungen betreffen den Einstrahlungswinkel des Lasers, um eine optimale Energieverteilung auf der Probenoberfläche zu gewährleisten. Der Ionengang wird dafür durch zwei Ablenkplatten-Paare leicht von der Instrumentenachse abgelenkt, so dass der Laserbeschuss senkrecht erfolgen kann.

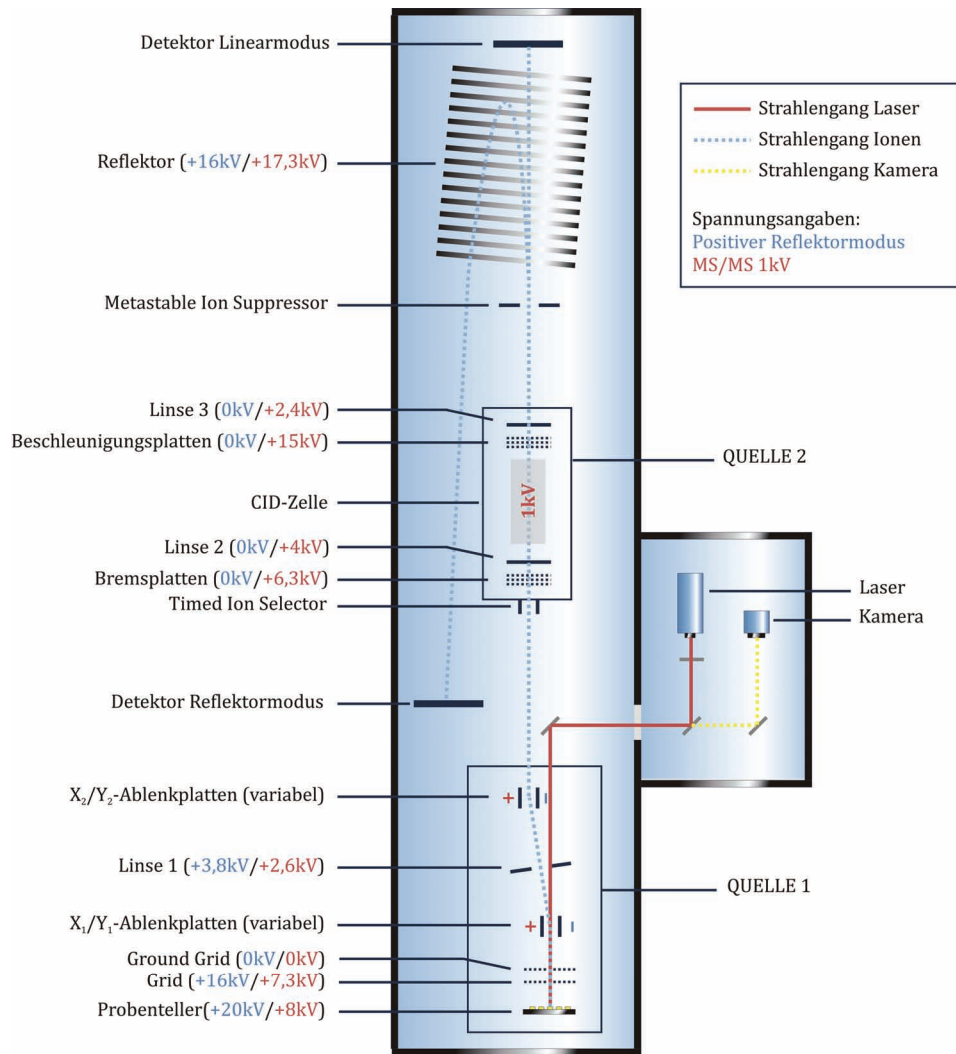


Abb. 1-14: Schematische Darstellung des 4800 TOF/TOF Analyzers.

Übersicht des Aufbaus des MDS/Sciex ABI 4800 MALDI-TOF/TOF-Instrumentes. Für eine Erklärung der einzelnen Komponenten siehe Text. An den jeweiligen Bauteilen sind die angelegten Spannungen im positiven Reflektormodus (blau) und im 1kV-MS/MS-Modus (rot) angegeben (nach Produktbroschüre Applied Biosystems 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer).

1.5.4 Elektrospray-Ionisation

Die Elektrospray-Ionisation ist die zweite große sanfte Ionisationsmethode, hierbei erfolgt die Erzeugung meist mehrfach geladener Teilchen direkt aus einer Lösung. Nach ihrer mechanistischen Beschreibung im Jahre 1968 konnten nach einigen Verbesserungen Proteine mit einer Masse von über 40 kDa mittels ESI gemessen werden (Dole *et al.*, 1968; Yamashita und Fenn, 1984; Fenn, 1988). Mit der Einführung von nano-ESI, bei der nur wenige Nanoliter pro Minute versprüht werden, wurde die erforderliche Probenmenge deutlich reduziert (Wilm *et al.*, 1994; Wilm *et al.*, 1996). Dadurch wurde die Untersuchung von Peptidgemischen erst ermöglicht, da hier nur in gesonderten Fällen größere Probenmengen vorliegen. Bei nano-ESI wird die Probenlösung aus einer Gold-bedampften Kapillare versprüht, deren Spitze nur einige Mikrometer Innendurchmesser aufweist. An die Kapillare wird Spannung angelegt, als Gegenelektrode fungiert der nur wenige Millimeter entfernte Einlass zum Massenspektrometer. Der dabei vorliegende Probenfluss, mit dem die Probe versprüht wird, basiert dabei ausschließlich auf dem angelegten elektrischen Feld und der vorliegenden Öffnung der Kapillare (Schmidt *et al.*, 2003). Durch das elektrische Feld kommt es zu einer elektrophoretischen Migration einer Ionensorte zur Kapillarenspitze, an der sich durch Deformation ein elektrohydrodynamisch instabiler Flüssigkeitskegel ausbildet (Taylor, 1964). Dieser sog. *Taylor-Cone* bildet einen Flüssigkeitsstrahl der zu zahlreichen hochgeladene Flüssigkeitströpfchen führt, die in kleinere Tröpfchen zerfallen. Während ihrer Wanderung zur Gegenelektrode kommt es zu einer Evaporation des Lösungsmittels und somit zur Konzentrierung der Ladung. Bei ausreichender Ladungsabstoßung kommt es zur Coulomb-Explosion und dem weiteren Zerfall des Tröpfchens. Zur genauen Freisetzung der Ionen existieren mehrere Theorien, von denen das „*Charge-Residue*“-Modell wohl am ehestens auf Makromoleküle wie Peptide und Proteine zutrifft (Dole *et al.*, 1968; Mack *et al.*, 1970; Röllgen *et al.*, 1987). Das Analytmolekül verbleibt gemäß diesem Modell nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im geladenen Rest des Tröpfchens, übernimmt dessen Ladung und wird durch entgegengesetzt geladene Rest-Gegenionen teilweise neutralisiert. Da dies nicht immer in gleichem Ausmaß geschieht, lassen sich auf diese Weise die verschiedenen Ladungszustände erklären, die bei ESI erhalten werden.

1.5.4 Das ESI-LIT-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer

Mittels ESI wird ein kontinuierlicher Ionenstrom erzeugt, der sich vorzüglich für die Kopplung mit Quadrupol- und Ionenfallen-Massenanalysatoren eignet. Prinzipiell ist es auch möglich solche Analysatoren mit gepulsten Ionisationsverfahren wie MALDI zu betreiben, allerdings sind dann aufwendigere Mechanismen zur Kontrolle des Ionenflusses notwendig. Quadrupole sind Massenfilter, die bei bestimmten angelegten Kombinationen von Gleich- und hochfrequenten Wechselspannungen nur Ionen mit einem definierten m/z -Wert passieren lassen. Wird dann über einen gewünschten Massenbereich gescannt, kann ein Spektrum erhalten werden. Durch die Kombination mehrere Quadrupole können relativ kostengünstig Tandem-Massenspektrometer mit der Möglichkeit zur Fragmentierung konstruiert werden (Yost und Enke, 1978; Yost und Enke, 1979). In Triple-Quadrupol-Geräten wird beispielsweise im ersten Quadrupol der *Precursor* selektiert, im zweiten per *low-energy* CID fragmentiert und im dritten die entstandenen Fragmente analysiert.

Mit Ionenfallen sind in einem Bauteil mehrere verschiedene MS-Experimente möglich. Ionen können gesammelt und akkumuliert ihre Masse bestimmt werden, aber auch die Isolierung einzelner Vorläuferionen und deren Fragmentierung sind möglich. Hierbei sind sogar mehrere Selektions- und Fragmentierungszyklen hintereinander möglich, so dass in MS^n -Experimenten selbst Fragmentspektren von vorigen Fragmenten aufgenommen werden können. In der Ionenfalle sind verschiedene Fragmentierungstechniken möglich, vornehmlich werden aber CID, auch technisch modifiziert als gepulste Quadrupol-Dissoziation (PQD) oder die Anregung durch Elektronentransfer (ETD) verwendet. Ionenfallen besitzen aufgrund ihrer physikalischen Ausmaße und den anlegbaren Spannungen nur einen begrenzten Massenbereich bei der Aufnahme von Übersichts- und Fragmentspektren. Nicht zuletzt deswegen eignet sich ESI als Ionisationsmethode, da mehrfach geladene Ionen von Molekülen gemessen werden können, die im zugänglichen Massenbereich der Geräte liegen.

Von Ionenfallen existieren vier grundlegende Typen, die Quadrupol-Ionenfalle (QIT), ihre lineare Bauweise LIT, die Orbitrap und die nicht näher besprochene FT-ICR-Zelle. In einer QIT liegt ein dreidimensionales elektrisches Quadrupolfeld vor, welches durch drei Elektroden erzeugt wird, eine ringförmige Elektrode und zwei Endkappenelektroden (Paul *et al.*, 1990). Eine höhere Speicherkapazität, schnellere Scanzeiten und damit eine bessere Auflösung besitzt die LIT (Tolmachev *et al.*, 2000; Mao und Douglas, 2003). Sie besteht aus vier zweifach unterbrochenen Quadrupolstäben mit denen ein

zweidimensionales Quadrupolfeld erzeugt wird, in dem die Ionen gehalten und selektiv ausgestoßen werden können. Die Detektion erfolgt üblicherweise durch einen SEV mit Konversionsdynoden.

Ein weiterer großer Durchbruch in der Geschichte der Massenspektrometrie wurde mit der Einführung der Orbitrap erzielt (Makarov *et al.*, 2000). Ihre Funktionsweise basiert auf der Kingdon-Falle, in der Ionen in Orbits um einen zentralen Draht gehalten werden können, ohne dass ein magnetisches oder dynamisches elektrisches Feld angelegt werden muss (Kingdon, 1923). Die Falle besitzt neben dem zentralen Draht als Innenelektrode zwei Endkappen- und eine zylindrische Außenelektrode, an die Gleichspannung angelegt ist. Durch eine Änderung der Form der Außenelektrode in eine in der Mitte unterbrochene hohle Spindel, kann zusätzlich zum radialen Potential zwischen Innen- und Außenelektrode ein axiales quadrologarithmisches Potential erzeugt werden, wodurch die Ionen harmonisch auf der Spindelachse oszillieren (Knight, 1981). Im Orbitrap-Massenspektrometer wird der zentrale Draht durch eine spindelförmige Elektrode ersetzt und die Geometrie der äußeren Elektrode angepasst. Die Frequenz der harmonischen Oszillation entlang der Spindelachse ist unabhängig von der radialen Bewegung der Ionen und korreliert mit dem m/z -Verhältnis der Teilchen. Die Frequenz erzeugt in Detektorplatten Ströme („*Image Currents*“) die per Fourier-Transformation zur Massenbestimmung ausgewertet werden können. Da die Orbitrap im Vergleich zu anderen Ionenfallen eine höhere Kapazität besitzt und die Oszillation unabhängig von der räumlichen und energetischen Streuung der Ionen ist, können extrem hohe Auflösungen und Massengenauigkeiten von unter 3 ppm erzielt werden.

Da in der Orbitrap keine Fragmentierung möglich ist, werden LIT-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer wie das LTQ-OrbitrapTM verwendet (Abb. 1-15). In der LIT wird zuerst die gesamte Probe mit ausreichender LIT-Genauigkeit vermessen, um *Precursor*-Massen zur Fragmentierung auszuwählen. Sämtliche Ionen werden dann über eine gekrümmte *Curved-Trap* (C-Trap) orthogonal in die Orbitrap zur Präzisionsmassenbestimmung injiziert, während mehrere MS/MS-Experimente in der LIT ablaufen (Syka *et al.*, 2004a; Olsen *et al.*, 2005; Scigelova *et al.*, 2006). Das LIT-Orbitrap-System wird stetig erweitert. Die Einführung von *Higher Energy Collisional Dissociation* (HCD) in einer der C-Trap nachgeschalteten Zelle eröffnet eine weitere Fragmentierungsmöglichkeit. Auch ETD ist in der LIT möglich (Syka *et al.*, 2004b). Durch den Einsatz einer speziellen LIT mit zwei unterschiedlichen Druckbedingungen

erfolgt Ionenmanipulation und -detektion jeweils separat bei optimalen Bedingungen, was gepaart mit einer Verbesserung des Ionentransfers sowohl die benötigte Scanzeit als auch das Auflösungsvermögen deutlich erhöht (Second *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2009).

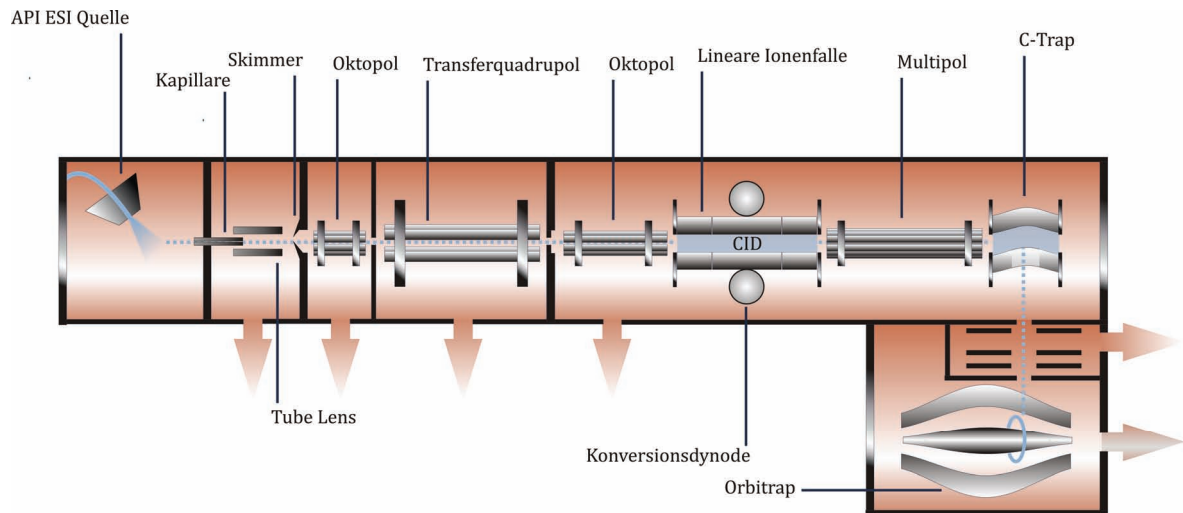


Abb. 1-15: Schematische Darstellung des LTQ-Orbitrap-Massenspektrometers.

Übersicht des Aufbaus des Thermo Scientific LTQ-Orbitrap-Instrumentes. Für eine Erklärung der einzelnen Komponenten siehe Text (nach Makarov *et al.*, 2006).

1.5.5 Fragmentierungsverhalten von Peptiden

Die Fragmentanalyse von einzelnen Peptiden stellt heute ein unverzichtbares Mittel zur Identifikation von Proteinen dar. Während LC/MS-*Shotgun*-Experimente ausschließlich über MS/MS-Spektren ausgewertet werden müssen, sind diese auch wertvolle Zusatzinformationen für PMF-basierte Proteinidentifikationen. Nur über Fragmentspektren lässt sich fundierte Sequenzinformation über einzelne Peptide erhalten, mittels spezieller Algorithmen lassen sich sogar Aminosäuresequenzen unbekannter Peptide *de novo* ermitteln (Johnson *et al.*, 2005; Wysocki *et al.*, 2005; Palagi *et al.*, 2006). Die Fragmentierung von Peptiden geschieht durch Brüche in der Peptidkette zwischen den einzelnen Aminosäuren (Qin und Chait, 1995). Da von Molekülen ausgegangen wird die mindestens eine Ladung tragen, müssen diese auf die entstehenden Tochterfragmente verteilt werden. Im Falle von einfach geladenen Ionen, wie sie vornehmlich bei MALDI, aber auch zu gewissen Teilen bei ESI auftreten, entsteht zwangsläufig ein geladenes und ein neutrales Fragment. Je nachdem, ob der Bindungsbruch vor, in oder nach der Peptidbindung erfolgt entstehen, nach der gängigen Nomenklatur (Biemann, 1982; Roepstorff und Fohlmann, 1984), carboxyterminale x-, y- und z-Ionen oder aminoterminal a-, b- und c-Ionen (Abb. 1-16).

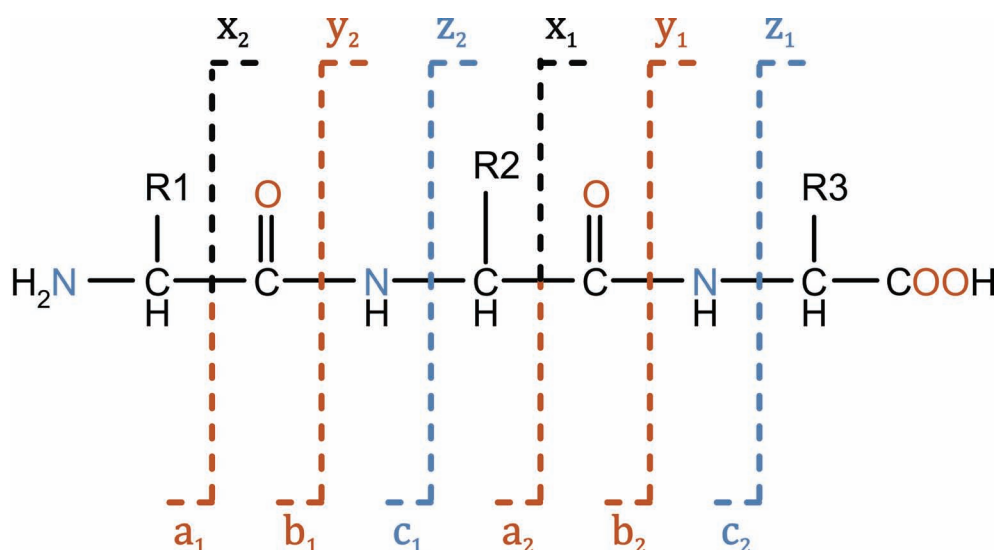


Abb. 1-16: Fragmentbildung und Nomenklatur am Beispiel eines Tripeptids.

Darstellung der entstehenden Fragmente bei MS/MS-Fragmentierung eines Tripeptids. Die auftretenden Brüche sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet. Die vornehmlich bei CID-Aktivierung entstehenden a-, b- und y-Fragmentationen sind rot, die bei ETD erzeugten c- und z-Ionen blau gekennzeichnet. Brüche von Seitenketten sind in diesem Schaubild nicht berücksichtigt.

Die Art der energetischen Aktivierung der Ionen für die Fragmentierung bestimmt die überwiegend entstehenden Ionentypen. Bei laserinduziertem MALDI-TOF-PSD (Spengler *et al.*, 1991) entstehen vornehmlich b- und y-Ionen, a-Ionen durch einen CO-Verlust eines b-Ions sowie Immonium-Ionen und zahlreiche interne Fragmente (Wysocki *et al.*, 2005). Durch zugeschaltetes *high-energy* CID erhöht sich die Komplexität der Fragmentspektren. Die Anzahl an Immonium-Ionen nimmt zu, zusätzlich entstehen H₂O- oder NH₃-Verlustfragmente bestehender Ionen, weitere interne Fragmente und Seitenkettenbrüche. Beim *low-energy* CID (Jennings, 1968) in Ionenfallen und Quadrupolen fehlen die hochenergetischen Fragmente. Die hier bevorzugt gebildeten Ionen sind vom b- und y-Typ plus die entsprechenden Verlustfragmente. HCD bietet als Alternative eine ähnliche Ionenbildung, unterliegt aber nicht der Einschränkung des Massenbereichs von CID in Ionenfallen. Fragmentierungstechniken wie ECD (Zubarev *et al.*, 1998) und ETD (Syka *et al.*, 2004b), die durch Elektroneneinfang oder -transfer initiiert werden, gelten als komplementär zu CID und bilden vornehmlich c- und z-Ionen. Da der Elektroneneinfang an jeder Stelle des Peptids mit vergleichbarer Wahrscheinlichkeit geschieht, kommt es zu einer regelmäßigeren Fragmentierung.

Neben der Aktivierung nimmt auch die vorliegende Peptidsequenz Einfluss auf die Fragmentierung. Bestimmte Aminosäuren führen aus verschiedenen Gründen zu gerichteten Spaltungen ihrer Bindungen (Tabb *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Khatun *et al.*, 2007). Insbesondere die Bindungen vor Prolin erscheinen in der Gasphase labil, da die umgekehrte carboxyterminale Spaltung über einen instabiles und energetisch ungünstiges bityklischen Oxalozon-Ion führt (Schwartz und Bursey, 1992, Vaisar und Urban, 1996; Schlosser und Lehmann, 2000; Wysocki *et al.*, 2000; Breci *et al.*, 2003). Ähnlich verhält es sich mit Asp-Xxx-Bindungen, deren Spaltung über einen cyclischen Übergangszustand stabilisiert wird (Yu *et al.*, 1993; Schlosser und Lehmann, 2000).

Die Fragmentierungsstatistiken wurden überwiegend aus tryptischen und vergleichbaren LysC-gespaltenen Peptidpopulationen erstellt, die sowohl mit ESI (Abb. 1-17) als auch mit MALDI erzeugt wurden (Tabb *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Khatun *et al.*, 2007). Diese Datensätze unterliegen einer Einschränkung, da diese Peptide bedingt durch die Spezifität des verwendeten Enzyms zwangsläufig mindestens einen basischen Rest enthalten. Dessen Einfluss auf die Fragmentierung kann somit nicht untersucht werden, ebenso nicht das Fragmentierungsverhalten nicht-tryptischer Peptide. Mittlerweile existiert auch ein mit

Proteinase K hydrolysierter nicht-spezifischer ESI-Datensatz (Tabb *et al.*, 2004). Dieser ist mit insgesamt 2.568 ausgewerteten Peptiden jedoch verhältnismäßig klein.

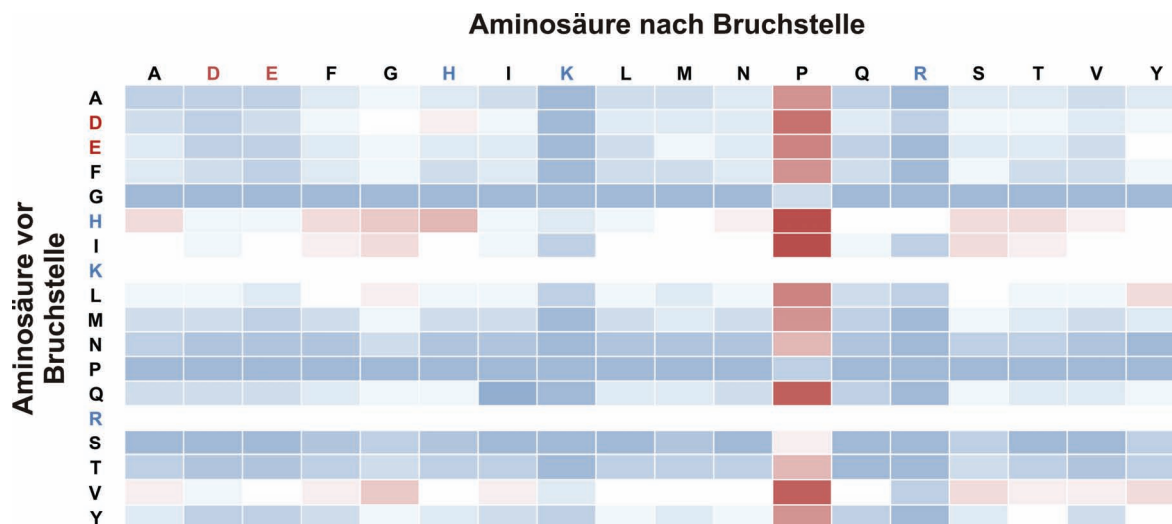


Abb. 1-17: Statistik von *low-energy* CID-Bindungsbrüchen in einem ESI-QIT-Instrument.

Relative Darstellung der auftretenden Brüche bei *low energy*-CID-Fragmentierung von 5,654 doppelt geladenen Peptiden in einem ESI-QIT-Instrument. Die rote Färbung kennzeichnet Aminosäure-Paare mit überdurchschnittliche vielen Spaltungen, blaue Färbung ein entgegengesetztes Verhalten. Da ausschließlich tryptische Peptide zur Erstellung verwendet wurden, sind keine carboxyterminalen Schnitte nach Arginin und Lysin vorhanden. Aufgrund ihres geringen Vorkommens im Datensatz wurden Cystein und Tryptophan nicht berücksichtigt (nach Huang *et al.*, 2004).

1.5.6 Datenbanksuchen

Der Weg vom aufgenommenen Spektrum zu einer erfolgreichen Protein- oder Peptididentifikation führt über einen Abgleich der gemessenen Massen mit einer Datenbank. In dieser sind idealerweise die Primärsequenzen aller in Frage kommender Proteine abgelegt. Die Datenbanksuche erfolgt überwiegend auf zwei Arten, je nachdem ob mit den Übersichtsspektren des hydrolysierten Proteins oder mit Fragmentspektren gesucht wird. Beide Formen sind auch zu einer Erhöhung der Signifikanz kombinierbar.

MS-Spektren, die durch den enzymatischen oder chemischen Verdau eines Proteins entstehen, können über *Peptide Mass Fingerprinting* einer Proteinsequenz zugeordnet werden (Henzel *et al.*, 1993; James *et al.*, 1993). Ein Suchalgorithmus erzeugt aus den Proteinsequenzen in der Datenbank durch einen theoretischen Verdau einzelne Massenlisten, gegen welche die tatsächlich gemessenen Peptidmassen abgeglichen werden. Dies erfolgt innerhalb einer gewählten Suchgenauigkeit, die ungefähr dem 3-fachen Wert der Standardabweichung der Massenfehler des aufgenommenen Spektrums entsprechen sollte (Zubarev und Mann, 2007). Kommt es bei einem Protein zu einer Anhäufung von Übereinstimmungen, kann es zu einer positiven Identifikation kommen. Ob und wie signifikant ein solcher Treffer ist, entscheidet der Suchalgorithmus. Davon existieren mehrere, wovon der von der *Mascot*-Suchmaschine eingesetzte *MOWSE* (*MOlecular Weight SEarch*) sicherlich der am weitesten verbreitete ist (Pappin *et al.*, 1993). Die Größe der aus der Datenbank generierten Massenliste hängt stark von der gewählten Enzymspezifität und der Zahl der berücksichtigten überlesenen Schnittstellen und Proteinmodifikationen ab. Bei einem tryptischen Verdau reichen bei einer Genauigkeit von 30-50 ppm schon wenige Signale aus, um ein Protein signifikant zu identifizieren (Mann *et al.*, 1993). Anders verhält es sich bei weniger und nicht-spezifischen Suchabfragen. Hier muss gegen alle möglichen Sequenzkombinationen gesucht werden, deren Zahl im Vergleich zum tryptischen Suchraum viel größer ist. Aus einem Protein der Länge n können ungefähr $n/10$ tryptische Peptide ohne Berücksichtigung des messbaren Massenbereichs erzeugt werden, beim Verdau mit einem nichtspezifischen Enzym gibt es hingegen insgesamt $n(n+1)/2$ mögliche Peptide (Abb. 1-18). Bei einem kleinen Protein mit 250 Aminosäuren erhöht sich der Suchraum dementsprechend bereits ca. 1000-fach, so dass nur, wenn überhaupt, bei extrem hohen Massengenauigkeiten eine Zuordnung möglich ist. Dieser extrem große Suchraum bei einer unzureichenden Massengenauigkeit verhindert die Signifikanz vieler Treffer. (Zubarev *et al.*, 1996; Spengler, 2004). Bei den spezifischeren tryptischen oder vergleichbaren Suchen ist dies aufgrund des generell

deutlich kleineren Suchraums noch nicht ausschlaggebend, so dass auch mit geringfügig schlechterer Massengenauigkeit erfolgreich gesucht werden kann. Eine Erhöhung der Signifikanz kann auch durch eine Verkleinerung der Datenbankgröße erreicht werden. Generell nimmt die Datenmenge in den gängigen Datenbanken, wie SwissProt/TrEMBL und NCBIInr, durch Neueinträge von Jahr zu Jahr zu, was die signifikante Identifikation eines Proteins aus dem gesamten Datensatz stetig schwerer werden lässt. Durch die Verwendung eingeschränkter Subdatenbanken, die lediglich alle Proteinsequenzen des untersuchten Organismus und gegebenenfalls weit verbreitete Proteinkontaminationen enthalten, kann die Datenbankgröße reduziert werden.

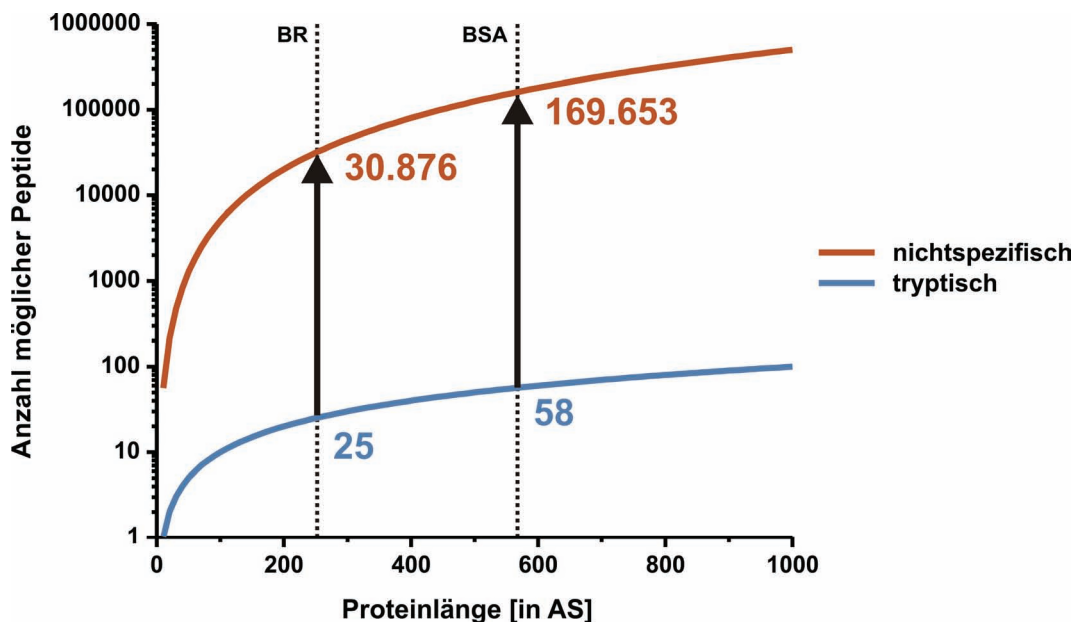


Abb. 1-18: Entstehende Peptidkomplexität bei spezifischen und nichtspezifischen Verdau.

Darstellung der entstehenden Peptidanzahl beim Verdau eines Proteins mit bekannter Größe. Die Skala veranschaulicht deutlich die erhöhte Komplexität. Der Unterschied zwischen tryptischer (blau) und nichtspezifischer (rot) Proteolyse wird exemplarisch an den zwei Modellproteinen Bacteriorhodopsin und BSA demonstriert.

Die Suche von MS/MS-Fragmentspektren ist vergleichbar mit der PMF-Suche, allerdings müssen zwei getrennte Schritte voneinander unterschieden werden. Der erste Suchabschnitt besteht aus einem Abgleich der *Precursor*-Masse mit der Peptidliste aus der Datenbank. Für diese Suche muss analog zu PMFs eine *Precursor*-Suchgenauigkeit festgelegt, sowie die vorliegende Enzymspezifität und etwaige Modifikationen berücksichtigt werden. Im zweiten Abschnitt wird von jedem der im ersten Teil der Suche

erhaltenen Peptide ein theoretisches Fragmentspektrum erzeugt. Hierbei berücksichtigt die Suchmaschine neben einer gewissen Fragmentmassen-Toleranz auch die Art der Aktivierung für die Fragmentierung der Ionen. Die gängigsten MS/MS-Suchmaschinen *Mascot*TM (Perkins *et al.*, 1999) und *SEQUEST*TM (Delahunty *et al.*, 2005) haben dies über eine Einstellung für verschiedene Typen von Massenspektrometern realisiert. Dadurch kann festgelegt werden, welche Ionenserien zur Generierung der Fragment-Massenlisten in Betracht gezogen werden. Dann geschieht ein Vergleich des gemessenen Fragmentspektrums mit den einzelnen theoretischen Spektren und der Grad der Übereinstimmung wird vom Suchalgorithmus bewertet. Ob ein Treffer signifikant ist, wird über einen Signifikanzschwellenwert definiert, der wesentlich durch beide Teilschritte der Suche bestimmt wird. So kommt es vor, dass ein sehr gutes Fragmentspektrum aufgrund einer schlechten *Precursor*-Genauigkeit als ähnlich signifikant angesehen wird, wie ein Spektrum mit nur wenigen zugeordneten Fragmenten, dessen *Precursor*-Masse aber sehr genau ermittelt wurde. So kann es bei den stetig wachsenden Datenbankgrößen vorkommen, dass selbst bei der guten erreichbaren Massengenauigkeit eines TOF-Massenanalysators von ca. 30 ppm keine signifikanten Treffer erzeugt werden.

Ein wesentliches Kriterium für die Qualität von massenspektrometrischen Suchergebnissen ist die Falschpositivenrate, der Prozentsatz falscher Treffer innerhalb der dargestellten Ergebnisse. Bei Suchen von größeren MS/MS-Datensätzen kann per Abfrage gegen eine *Decoy*-Datenbank, in der die richtigen Proteinsequenzen randomisiert vorliegen, eine verlässliche Aussage über den Anteil falschpositiver Informationen getroffen werden. Durch eine Anpassung des Signifikanzschwellenwertes kann der Datensatz auf bestimmte Falschpositivenraten normalisiert werden. Gängig akzeptierte Werte hierfür sind Raten unter 5% (Elias *et al.*, 2005). Da bei MS/MS-Suchen ausschließlich Peptide identifiziert werden, muss geklärt werden, ab welchem Punkt auch die Identifikation des Ursprungproteins als gesichert anzusehen ist. Die renommierte Fachzeitschrift *Molecular & Cellular Proteomics* veröffentlichte 2005 Richtlinien für die Publikation von *Proteomics*-Daten, die zwei nicht überlappende Peptide pro Protein erfordern (*Molecular & Cellular Proteomics*; <http://www.mcponline.org/misc/PhiladelphiaGuidelinesFINALDRAFT.pdf>). Trotzdem sind die Ein-Peptid-Proteine („*One-hit Wonder*“) nicht falsch, sondern nur nicht abgesichert. Im Zuge des Fortschritts der proteomanalytischen Methoden wurden die Kriterien erst kürzlich verschärft, so dass nun drei nicht überlappende Peptide zur Absicherung der Proteinidentifikation notwendig sind.

Kapitel 2

ZIELSETZUNG

2. Zielsetzung

Die Membranproteinanalytik hinkt der Analyse löslicher Proteine immer noch hinterher. Diese Problematik betrifft nicht nur Massenspektrometrie-Anwendungen, sondern umfasst nahezu alle Teilbereiche der Analytik, so auch die Kristallstrukturanalyse und andere spektroskopische Verfahren. Ziel dieser Arbeit ist eine deutliche Verbesserung der Situation für MS-basierte *Proteomics* zur Untersuchung von Membranproteomen, um zu den löslichen Proteinen aufzuschließen.

Der Einsatz von alternativen Proteasen für die Hydrolyse komplexer Membranproteome ist ein vielversprechender Ansatz, da einige der offensichtlichen Einschränkungen der Standardprotease Trypsin umgangen werden. Trotz des hohen Verwandtschaftsgrades zu Trypsin und Chymotrypsin wurde das Enzym pankreatische Elastase I hierfür noch nicht eingesetzt. Elastase fand lediglich zur gerichteten Analyse weniger Einzelproteine Anwendung. Die Tauglichkeit zur Hydrolyse von größeren Proteinmischungen wurde ihr sogar völlig abgesprochen. Da diese Aussage allerdings ohne nähere Begründung getroffen wurde, wird im Rahmen dieser Arbeit die Eignung von Elastase zum Verdau von Membranproteinen evaluiert.

Die Methode wird am Modellsystem Purpurmembranen entwickelt und im Erfolgsfall auf die Analyse des Membranproteoms von *Corynebacterium glutamicum* transferiert. Im Zuge dessen werden verschiedene Verdaubedingungen untersucht. Ein besonderer Fokus liegt auf dem Zusatz organischer Lösungsmittel, da dies für andere Enzyme eine deutliche Steigerung der Ergebnisqualität bewirkt hat. Die mit Elastase erhaltenen Ergebnisse werden mit der Referenzprotease Trypsin verglichen und ausgewertet.

Eine umfassendere Analyse der elastatisch hydrolysierten Proben erfolgt über ihre flüssigchromatographische Auftrennung mittels nano-HPLC. Die anschließende massenspektrometrische Detektion wird auf zwei aktuellen Plattformen, einem MALDI-TOF/TOF- und einem ESI-LIT-Orbitrap-Instrument, durchgeführt und verglichen. Aus den erhaltenen Daten beider Geräte erfolgt eine detailliertere Auswertung der Schnittspezifität von Elastase, der physikochemischen Eigenschaften der entstandenen Peptide und ihres Fragmentierungsverhaltens bei MS/MS-Experimenten.

Durch den Einsatz einer weniger spezifischen Protease wird mit der erhöhten Komplexität der erhaltenen Peptidmischung ein zusätzliches Problem geschaffen. Eine erhöhte Trennleistung zur Kompensation wird durch eine Vorfraktionierung der Peptide mittels *Off-Gel* IEF bereitgestellt, die an die verwendete nLC-MALDI-MS/MS-Methodik angepasst wird. Die Effekte der vorgeschalteten Trenndimension werden genauer untersucht.

Da die elastatische im Vergleich zur tryptischen Spezifität höhere Anforderungen an die Datenbanksuchen stellt, werden die optimalen Suchbedingungen experimentell ermittelt. Die Massengenauigkeit der erhaltenen Daten kann mittels eines Verfahrens, welches die Kombination zweier MALDI-Instrumente mit verschiedenen Massenanalysatoren beinhaltet, bereitgestellt werden, um höhere Identifikationsausbeuten zu erzielen. Dabei werden die jeweiligen Stärken der Instrumente ausgenutzt und vorhandene Schwächen kompensiert.

Neben Elastase wird auch Pepsin zur Proteolyse von Purpormembranen untersucht. Die saure Protease eröffnet innerhalb der Proteomforschung aufgrund ihrer Verdaubedingungen, andere Anwendungsmöglichkeiten. Auch hier wird neben der generellen Eignung und der peptischen Spezifität auch der Zusatz von geringen Konzentrationen organischer Lösungsmittel untersucht, um eine bessere Solubilisierung von Membranpeptiden zu erreichen.

Kapitel 3

**MATERIAL
UND METHODEN**

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Biologische Materialien

In dieser Arbeit sind zahlreiche biologische Proben eingesetzt und analysiert worden, die in Tab. 3-1 aufgeführt sind. Ein besonderer Dank gilt den Arbeitsgruppen von Dr. Norbert Dencher (TU Darmstadt) und Dr. Ansgar Poetsch (Ruhr-Universität Bochum), für die Bereitstellung der *Halobacterium*- und *Corynebacterium*-Proben.

Tab. 3-1: Verwendete biologische Proben.

In der Tabelle sind neben der Art der Probe auch die Herkunft und die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt.

Probe	Beschreibung	Herkunft
Rinderserumalbumin (BSA)	Modell für lösliche Proteine	Sigma-Aldrich
Purpurchmembranen mit >99% BR (PM)	Modell für Membranproteine	Actilor
<i>H. salinarium</i> NRC-1 Purpurchmembranen (PM)	Modell für Membranproteom	AG Dencher
<i>C. glutamicum</i> -Membranen DM1698 (CGM1698)	Membranproteom	AG Poetsch
<i>C. glutamicum</i> -Membranen DM1730 (CGM1730)	Membranproteom	AG Poetsch
<i>C. glutamicum</i> -Cytosol DM1730 (CGC1730)	Lösliches Proteom	AG Poetsch

Die nachfolgend beschriebene Präparation der *Corynebacterium glutamicum*-Proben ist von der AG Poetsch in Bochum durchgeführt worden und wurde bereits ausführlich beschrieben (Schluesener *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2006). Es sind zwei verschiedene Stämme von *C. glutamicum* eingesetzt worden. Der Bakterienstamm DM1698 ist aus einer Zufallsmutagenese von *C. glutamicum* ATCC 21527 hervorgegangen und gehört zu den L-Lysin-produzierenden Stämmen. Der ebenfalls L-Lysin-produzierende Stamm DM1730 konnte durch vier gezielte Punktmutationen im Lysin-Biosyntheseweg (*jom59*, *lysC2311*, *pyc458*, Δzwf) hergestellt werden (Ohnishi *et al.*, 2002).

Die bakteriellen Zellen werden bei 30°C in einem Schüttelkolben mit LB-Vollmedium angezogen oder stammten aus einer Fermentation der Degussa AG. Der Zellaufschluss erfolgt per *French Press*, überschüssige Zelltrümmer werden durch Zentrifugieren entfernt. Durch Ultrazentrifugieren lassen sich die Cytoplasmamembranen isolieren, der verbleibende Überstand wird als cytosolische Probe verwendet. Neben weiteren Reinigungsschritten werden die Membranen mit 2,5 M NaBr gewaschen, um quantitativ die integralen Membranproteine anzureichern (Schluesener *et al.*, 2005).

Die von der AG Dencher durchgeführte Isolation der Purpormembranen erfolgte nach einem seit Jahrzehnten etablierten Protokoll und wird daher nicht näher erläutert (Oesterhelt und Stoeckenius, 1974).

Die Proteinquantifizierung der Proben wird nach dem Verfahren von Lowry *et al.* (1951) durchgeführt.

3.1.2 Proteolytische Enzyme

Zur Hydrolyse von Peptidbindungen kommen mehrere Endopeptidasen zum Einsatz. Einen Überblick aller verwendeten Proteasen verschafft die Tab. 3-2. Bei Trypsin, Chymotrypsin und Glu-C handelt es sich um speziell für den *Proteomics*-Einsatz hergestellte Enzympräparate, die besonders niedrige Raten an Selbstverdau und Fremdaktivität aufweisen. Dies wird durch chemische Modifikation spaltungssensitiver Stellen und die Behandlung mit spezifischen Protease-Inhibitoren erreicht.

Tab. 3-2: Verwendete proteolytische Enzyme.

In der Tabelle ist neben der Bezugsquelle und dem Wirtsorganismus auch die Klassifizierung der Protease nach MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) angegeben.

Protease	MEROPS-Klassifizierung	Wirtsorganismus	Bezugsquelle
Trypsin	Ser, Clan PA(S), Familie S1A	<i>Sus scrofa</i>	Sigma-Aldrich
Pankreatische Elastase	Ser, Clan PA(S), Familie S1A	<i>Sus scrofa</i>	Roche / USB Corp.
Chymotrypsin	Ser, Clan PA(S), Familie S1A	<i>Sus scrofa</i>	Princeton Sep.
Endoproteinase Glu-C	Ser, Clan PA(S), Familie S1B	<i>Staphylococcus aureus</i> V8	Princeton Sep.
Proteinase K	Ser, Clan SB, Familie S8A	<i>Engyodontium alba</i>	Sigma-Aldrich
Pepsin	Asp, Clan AA, Familie A1	<i>Sus scrofa</i>	Sigma-Aldrich

3.1.3 Protein- und Peptidstandards

Zur Kalibrierung sämtlicher MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF-Messungen wird das *Sequazyme™ Peptide Mass Standards Kit* von Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet.

Die Instrumenten-Kalibrierung der MALDI-Orbitrap wird mit dem Sigma-Aldrich *MALDI Mass Standard Kit™* vorgenommen, welches zwei Peptidsätze für die Kalibrierung der beiden Massenbereiche des Instruments enthält. Für die Nachkalibrierung der MALDI-Orbitrap-MS-Spektren kommt zusätzlich das tryptische BSA-Proteolysat *BSA Standard Digest™* von Bruker Daltonics (Bremen) zum Einsatz.

Als Protein-Längenstandard für die gelelektrophoretischen Anwendungen dient der *Unstained Precision Plus Protein™ Standard* von Bio-Rad (München), der zehn rekombinante Proteine im Massenbereich von 10 bis 250 kDa enthält.

3.1.4 Andere Chemikalien

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind, sofern verfügbar, mindestens vom Reinheitsgrad *p.a.* und werden entweder von Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben.

3.2 Proteolyseprotokolle

3.2.1 Elastase-Verdau von löslichen Proteinen

Es werden 100 μl Proteinlösung einer Konzentration von 20 pmol/ μl mit 25 mM NH_4HCO_3 -Puffer hergestellt. Dann werden 10 μl Reduktionslösung (100 mM DTT in H_2O) hinzugegeben und die Mischung für 30 min bei 57°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Alkylierung sämtlicher Cysteine des Proteins durch die Zugabe von 40 μl Alkylierungsreagenz (100 mM IAA in H_2O). Die Reaktion wird unter Lichtausschluss für 45 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Um überschüssiges IAA abzubauen wird 50 μl DTT-Lösung zugesetzt und nochmals 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die fertige Protein-Stammlösung wird dann 1:10 mit 25 mM NH_4HCO_3 -Puffer verdünnt und auf die Substratproteinmenge bezogen 10% (w/w) Elastase zugegeben, um eine 1 pmol/ μl Proteinverdaulösung zu erhalten. Die Proteolyse erfolgt 16 h über Nacht bei Raumtemperatur unter moderatem Schütteln.

3.2.2 Elastase-Verdau von cytosolischen Proteomen

Obwohl es sich bei cytosolischen Proben um überwiegend lösliche Proteinbestandteile handelt, wird der Verdau ebenfalls in Anwesenheit von 60% Methanol durchgeführt. Das Vorhandensein des organischen Lösungsmittels hat in zahlreichen Vorversuchen keine negativen Auswirkungen gezeigt und war beim Verdau des einzigen in dieser Arbeit untersuchten cytosolischen Proteom von *Corynebacterium glutamicum* DM1730 sogar leicht förderlich. Zu 100 μg Probe werden 120 μl Methanol zugesetzt und mit 25 mM NH_4HCO_3 -Puffer auf 200 μl Volumen aufgefüllt. Anschließend erfolgt direkt die Enzymzugabe in einer Konzentration von 5% (w/w). Nach 16-stündiger Inkubation werden eventuelle Schwebeteilchen der Probe durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand weiter verwendet.

3.2.3 Elastase-Verdau von Membranproteomen

Der hier beschriebene Ablauf zum elastatischen Verdau von Membranproteomen in einem Puffer mit 60% Methanol-Gehalt basiert auf dem *Specific Integral Membrane Peptide Level Enrichment* von Fischer *et al.* (2006). Er dient als Grundlage für sämtliche in dieser Arbeit vorgestellten modifizierten Verdauprotokolle von Membranproteinen.

Ein Aliquot Membran-Suspension mit einem Proteingehalt von 100 µg wird in einer Tischzentrifuge bei 12.000 g sedimentiert und das Membransediment mit 200 µl H₂O gewaschen. Nach wiederholtem Zentrifugieren werden die Membranen vorsichtig in 120 µl Methanol resuspendiert und 2 x 10 min im Ultraschallbad behandelt. Der Lösung wird anschließend 79 µl 25 mM NH₄HCO₃-Puffer zugefügt, kurz gemischt und 1 µl in kaltem H₂O gelöstes Enzym zugesetzt. Die eingesetzte Enzymmenge, bezogen auf die Substratmenge, entspricht 10% (w/w) Elastase. Das Lösen der Protease und ihre Zugabe zur Verdaulösung müssen möglichst zügig erfolgen, um den Selbstverdau gering zu halten. Die Proben inkubieren nach einmaligem Schütteln dann für mindestens 16 h bei Raumtemperatur. Nach erfolgtem Verdau wird intensiv gemischt und die festen Membranbestandteile per Zentrifugation entfernt. Zusätzlich kann die Membran noch durch Zugabe von 100 µl Acetonitril für 15 min nachextrahiert werden, die Lösungen werden dann vereint und können direkt verwendet oder bei -20°C gelagert werden. Werden größere Mengen als 100 µg verdaut, müssen auch die Volumina proportional erhöht werden, um eine vergleichbare Proteolyseleistung zu erhalten (pro 100 µg Membran / 200 µl Gesamtvolumen).

3.2.4 Verdau mit anderen Serinproteasen

Werden anstatt Elastase andere Proteasen verwendet, müssen Änderungen am Protokoll vorgenommen werden. Die anderen Serinproteasen Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Glu-C werden mit 2% (w/w) in geringerer Menge zum Ansatz hinzugegeben, da sie deutlich höhere enzymatische Aktivitäten zeigen. Weitere Besonderheiten müssen bei Verwendung von Chymotrypsin und Glu-C beachtet werden. Chymotrypsin benötigt einen Zusatz von 5 mM CaCl₂ als Cofaktor zum NH₄HCO₃-Puffer. Bei den Glu-C-Verdaus wird der NH₄HCO₃-Puffer in allen Schritten durch 25 mM (NH₄)₂HPO₃-Puffer ersetzt. Sämtliche nicht aufgeführten Vorgänge entsprechen dem Referenzprotokoll (Kap. 3.2.3).

3.2.5 Pepsin-Verdau von Membranproteomen

Die Aspartatprotease Pepsin benötigt als einziges behandeltes Enzym saure Bedingungen für eine optimale Aktivität. Sie ist auch nicht mit einer Methanol-Konzentration von 60% im Puffer kompatibel, weshalb diese angepasst werden muss. Die Membranen werden in einer gegebenen Menge reinem Methanol suspendiert, dann mit Ultraschall behandelt und die neunfache Menge an 0,11% TFA-Lösung hinzugegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe des Pepsins in einer Massenkonzentration von 1% (w/w). Die weiteren Schritte sind mit der Elastase-Referenz identisch (Kap. 3.2.3).

3.2.6 Elastase-Vorverdau zum Entfernen löslicher Proteinanteile

Zur Entfernung der löslichen Anteile komplexer Membranproteome wird ein elastatischer Vorverdau in komplett wässrigem Medium vor der eigentlichen Proteolyse durchgeführt. Nach der Sedimentation und dem Waschen der Membranen wird zu 200 µg Probe 200 µl 25 mM NH_4HCO_3 -Puffer gegeben. Auch hier müssen grundsätzlich die verwendeten Volumina an die Probenmenge angepasst werden. Der Vorverdau wird dann durch Zugabe von 10% (w/w) Elastase gestartet und über einen Zeitraum von 12 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand mit den abverdauten Peptiden wird durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen. Von hier an kann mit dem eigentlichen Verdau der Membranen fortgefahren werden, beginnend mit der Zugabe von Methanol zum Membransediment (Kap. 3.2.3).

3.2.7 Verdau mit Elastase im Polyacrylamidgel

Der Ablauf zum Verdau von Proteinen in einem Polyacrylamidgel basiert auf dem Protokoll von Shevchenko *et al.* (1996) und wird an die Verwendung der neuen Protease angepasst. Das Coomassie-gefärbte Gelstück wird mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und dreimal für 15 min in 500 μ l 50% Acetonitril entfärbt. Danach äquilibriert und dehydriert man die Gelstücke durch zweimaliges abwechselndes Waschen mit 25 mM NH_4HCO_3 -Puffer und reinem Acetonitril. Die Flüssigkeit des letzten Waschgangs wird abgenommen und kurz gewartet bis das verbleibende Acetonitril an der Luft getrocknet ist. Die weiteren Schritte der Proteasebehandlung werden vollständig unter Kühlung mit Eis durchgeführt. Zu den Gelstücken werden 20 μ l einer 2,5 ng/ μ l Elastase-Lösung gegeben, die unmittelbar vor Verwendung mit eiskaltem NH_4HCO_3 -Puffer hergestellt wird. Die absolut verwendete Proteasemenge pro Gelstück beträgt also 50 ng. Nach 45 min Inkubation auf Eis werden weitere 30 μ l NH_4HCO_3 -Puffer hinzupipettiert und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Ist der Verdau abgeschlossen wird der Überstand entnommen und aufbewahrt und die verbleibenden Gelstücke können nachextrahiert werden. Dies geschieht durch die sequentielle Extraktion mit einer 50% Acetonitril/0,1% TFA- und eine 90% Acetonitril/0,1% TFA-Lösung. Beide Extrakte und der ursprüngliche Überstand des Verdau werden dann vereint und in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Der Rückstand kann direkt in 50% Acetonitril/0,1% TFA rückgelöst und zur MALDI-MS-Messung verwendet werden.

3.3 Massenspektrometrie

3.3.1 MALDI-TOF-MS im positiven Reflektormodus

Sämtliche Verdauproben werden mittels *Dried Droplet*-Methode für die MALDI-Messung präpariert. Die üblicherweise eingesetzte Probenkonzentration liegt im Bereich von 1-2 pmol/ μ l, höher konzentrierte Proben werden vor der Präparation entsprechend verdünnt. Jeweils 0,5 μ l der Probe werden mit 0,5 μ l Matrixlösung auf dem MALDI-Probenteller gemischt und an der Luft getrocknet. Als Matrixlösung kommt eine 3 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymizsäure-Lösung (gelöst in 70% Acetonitril/0,1% TFA) zum Einsatz. Unmittelbar vor der Messung wird die getrocknete Probenpräparation mit 5% gekühlter Ameisensäure gewaschen. Die MALDI-TOF-Messungen werden im positiven Reflektormodus mit 20 kV Beschleunigungsspannung auf dem Applied Biosystems 4800 *TOF/TOF Analyzer* durchgeführt. Gewöhnlich wird der Aufnahmebereich auf 700 bis 6.000 m/z gesetzt, die Einstellungen der *Low Mass Gate* und der *Delay Time* entsprechen den Standardeinstellungen des Instruments. Die so typischerweise erhaltene Auflösung beträgt bei einer Masse von 1.300 m/z ungefähr 17.000. Pro Spektrum werden bei manuell evaluierter Laserenergie 1.000 Schuss aufsummiert.

Von jedem MALDI-Probenteller wird ein 13-Punkt-Plattenmodell zur externen Kalibrierung generiert. Die Plattengeometrie wird hierbei aus den gemessenen Massen von vier Peptiden (des-[Arg¹]-Bradykinin, Angiotensin I, ACTH Clip 1-17, ACTH Clip 18-39) des verwendeten Standards bestimmt. Zusätzlich werden die Messungen von Verdaus bekannter Proteine intern auf vier bekannte Peptidmassen nachkalibriert, die vorher per MS/MS verifiziert worden sind. So kann je nach Probe eine Massengenauigkeit von 10-20 ppm für PMF-Suchen erreicht werden. Falls nicht ausreichend Kalibriermassen vorhanden sind, wird in Ausnahmefällen nur die externe Kalibrierung mit 30-50 ppm Genauigkeit angenommen.

3.3.2 MALDI-TOF-MS im negativen Reflektormodus

Für Messungen im negativen Reflektormodus wird eine andere Matrixlösung eingesetzt, die aus einer eins-zu-eins-Mischung aus α -Cyano-4-Hydroxymizsäure und 2,4-Difluor-Cyanozimtsäure (gelöst in 70% Acetonitril/0,1% TFA/3 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) besteht. Die Messung erfolgt ebenfalls auf dem 4800 TOF/TOF, jedoch im negativen Reflektormodus bei 20 kV Beschleunigungsspannung.

Da bei Verwendung von 2,4-Difluor-Cyano-Zimtsäure im negativen Ionenmodus zahlreiche Matrixsignale unter 1.000 Da auftreten, wird neben dem Plattenmodell nur eine 1-Punkt-Kalibrierung auf den *Base Peak* der Bacteriorhodopsin-Spektren (M-H 1380,6962 Da) vorgenommen.

3.3.3 MALDI-Orbitrap-MS im positiven Reflektormodus

Die Probenvorbereitung zur Messung auf der MALDI-Orbitrap erfolgt ebenfalls als *Dried Droplet*-Präparation. Je 1 μl der Probenlösung wird mit 1 μl Matrixlösung, die 3 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (gelöst in 70% Acetonitril/20% Ethanol/0,1% TFA) enthält, auf dem Probensteller gemischt und getrocknet. Optional kann auch hier mit 5% gekühlter Ameisensäure gewaschen werden, falls es sich um stark salzhaltige Proben handelt. Die Messung erfolgt im positiven Ionenmodus der Thermo Scientific *MALDI-LTQ-Orbitrap XL*TM mit jeweils unmittelbar vor dem Versuch automatisch angepasster Laserfluenz. Das Instrument wird im *High Mass Range*-Modus betrieben und der Massenbereich von 820 bis 4.000 m/z aufgezeichnet. Bei der Messung mit aktiviertem *Crystal Positioning System* werden pro *Spot* automatisch 50 Einzelscans mit einer Auflösung von 60.000 aufsummiert. Die Detektion erfolgt im Orbitrap-Massenanalysator, dessen Zielfüllmenge auf $1\text{E}+06$ Ionen eingestellt ist.

Die externe Kalibrierung des Geräts wird durch die Messung von sieben Massensignalen der Standard-Peptidmischung auf einer Position des Probenstellers erstellt. Zur Korrektur der Instrumenten-Kalibrierung wird unmittelbar vor jeder Messung ein BSA-Verdau vermessen. Aus den errechneten Differenzen zwischen gemessenen und theoretischen Massen von 25 BSA-Peptiden wird eine Korrekturfunktion 2. Ordnung über den Massenbereich erstellt und auf das ursprünglich gemessene Spektrum angewendet. Durch diese Nachkalibrierung wird eine Massengenauigkeit von 3-5 ppm für PMF-Suchen erreicht.

3.3.4 MALDI-TOF/TOF-MS/MS

MALDI-MS/MS-Experimente außerhalb der nano-HPLC (nLC)-Anwendungen dienen überwiegend der Verifizierung zur Kalibrierung eingesetzter Peptidmassen. Sie werden mit Unterstützung einer CID-Zelle durchgeführt, die Luft als Stoßgas verwendet. Die Fragmentierung der ursprünglich mit 8 kV beschleunigten ausgewählten *Precursor*-Peptide findet bei einer Kollisionsenergie von 1 kV und einem Druck von 1E-06 Torr statt. Die entstehenden Fragmente werden dann in der zweiten Ionenquelle erneut mit 15 kV beschleunigt und über das Reflektor-TOF aufgetrennt. Für gewöhnlich werden 2.000 Laserschüsse aufsummiert, in Einzelfällen bei schlechter Spektrenqualität aber auch bis zu 10.000 Schuss. Vor jeder Messung wird die MS/MS-Methode des Geräts anhand von acht Massen des Fragmentspektrums von Angiotensin I kalibriert.

3.3.5 Datenbanken

Zur *Mascot*-Suche massenspektrometrischer Daten kommen mehrere Datenbanken zum Einsatz, die in Tab. 3-3 aufgeführt sind. In den von SwissProt/TrEMBL (<http://www.expasy.ch/sprot/>) und NCBIInr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) abgeleiteten Datenbanken befinden sich alle zum Zeitpunkt der Erstellung enthaltenen Einträge des betreffenden Organismus. Die *Corynebacterium*-Datenbank der AG Kalinowski stammt aus einer Funktionsvorhersage aller annotierter Gene (Kalinowski *et al.*, 2003)

Tab. 3-3: Vewendete Datenbanken.

In der Tabelle sind die verwendeten Datenbanken, ihre Größe, Herkunft und das Datum des Erstellens aufgeführt.

Datenbank	Probe	Herkunft	Größe	Stand
SP07	PM	Alle <i>H. salinarium</i> -Einträge aus SwissProt/Tr,	2490 Einträge	10.12.2007
NCBI08	PM	Alle <i>H. salinarium</i> -Einträge aus NCBIInr	5230 Einträge	03.12.2008
SP09	PM	Alle <i>H. salinarium</i> -Einträge aus SwissProt/Tr.	2490 Einträge	24.04.2009
CG07	CGM, CGC	AG Kalinowski	3059 Einträge	20.12.2007
NCBI08	CGM	Alle <i>C. glutamicum</i> -Einträge aus NCBIInr	12258 Einträge	03.12.2008

3.3.6 *Peptide Mass Fingerprint*

Der Abgleich von gemessenen Massenlisten und *in silico* errechneten Verdaupeptiden wird mit *BioTools*TM 2.2 (Bruker Daltonics) und dem zugehörigen *Sequence Editor*TM 2.2 vorgenommen. Die Massenlisten werden aus dem Spektrum mit der *Data Explorer 4.9* Software (Applied Biosystems) erzeugt, die verwendeten Kriterien zur Signalerkennung liegen in der Regel im S/R-Bereich von 10 bis 20. Die genaue versuchsspezifische Einstellung ist zusammen mit der verwendeten Suchgenauigkeit bei den jeweiligen Experimenten im Ergebnisteil angegeben. Der Abgleich erfolgt dann gegen den obigen Datenbanken entnommenen einzelne Proteinsequenzen, die um Signalpeptide bereinigt werden. Massen die mehr als einem Peptid eines Proteins zugeordnet werden, treten nur als ein Peptid in den Auswertungen auf. Bei allen Proteinen wird als variable Modifikation die Oxidation von Methionin zum Sulfoxid berücksichtigt. Im Falle von PMF-Suchen mit Bacteriorhodopsin wird zusätzlich die Bildung von Pyroglutamat am N-Terminus des Proteins angenommen. Bei willentlich reduzierten und alkylierten Proteinen wird die Carbamidomethylierung aller Cysteine als permanente Modifikation angesehen.

3.3.7 *Suche von MS/MS-Spektren*

Einzelne MS/MS-Spektren werden analog zu den MS-Spektren mit dem *Data Explorer 4.9* prozessiert und maximal 65 Einträge umfassende Massenlisten erstellt. Der Schwellenwert für die Signalerkennung in einzelnen MS/MS-Spektren beträgt S/R 5. Die Suche der einzelnen MS/MS-Massenlisten wird mit der *Mascot*-Suchmaschine v2.2.03 (Matrix Science Ltd.; Perkins *et al.*, 1999) gegen eine entsprechende Datenbank durchgeführt. Die *Precursor*-Suchgenauigkeit ergibt sich aus der Art des verwendeten Instruments und der erfolgten Kalibrierung. Sie beträgt bei MALDI-Orbitrap-Daten 5 ppm, bei intern kalibrierten MALDI-TOF-TOF-Spektren mit 30 ppm und bei externer Kalibrierung 50 ppm. Als MS/MS-Fragment-Toleranz wird bei MALDI-Orbitrap-Spektren $\pm 0,5$ Da, bei MALDI-TOF/TOF-Spektren $\pm 0,3$ Da angenommen. Bei den MS/MS-Suchen werden die gleichen Proteinmodifikationen wie bei den PMF-Suchen berücksichtigt (Kap. 3.3.6).

3.4 Nano-HPLC-MS/MS-Methoden

3.4.1 Nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF auf der Agilent HP 1100

Die Aufrennung der in Tab. 3-4 aufgeführten Peptidmischungen und das anschließende MALDI-Spotten werden auf einem Agilent Technologies *HP 1100TM Series* HPLC-System, bestehend aus Nano-Kapillarpumpe, Lösungsmittel-*Degaser*, thermostatischem Autosampler und MALDI-Fraktionssammler, durchgeführt. Die Proben werden per Vakuumzentrifugieren auf ein ungefähres Volumen von 8 µl eingengt und mit Fließmittel A (8% Acetonitril; 0,1% TFA) auf ca. 18 µl aufgefüllt. Dann wird die Peptidmischung auf die Vorsäule (Agilent *ZorbaxTM 300StableBond-C18*, Innendurchmesser 75 µm, Porengröße 300 Å, Länge 3 mm) injiziert und bei einem Fluss von 20 µl/min Fließmittel A für 5 min entsalzt und aufkonzentriert. Die eigentliche Trennung auf der analytischen Säule (LC-Packings/Dionex *PepMapTM 100 C18*, Innendurchmesser 75 µm, Porengröße 300 Å, Länge 150 mm) bei einer Flussrate von 300 nl/min geschieht mittels eines 135-minütigen Stufengradienten (Abb. 3-1). Der Anteil von Fließmittel B (95% Acetonitril; 0,1% TFA) am Gesamtlösungsmittel steigt innerhalb der ersten 110 min von 3 auf 55%, in den nächsten 10 min auf 100%, verbleibt dort für weitere 10 min und fällt in den folgenden 3 min auf 3% ab. Zuletzt wird noch für 2 min mit 3% Fließmittel B gespült. Vor dem eigentlichen MALDI-*Spotting* wird das Eluat mit Matrixlösung gemischt. Sie wird durch eine Spritzenpumpe mit 1,2 µl/min bereitgestellt und besteht aus 3 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (Bruker Daltonics, Bremen) plus 10 fmol/µl [Glu¹]-Fibrinopeptid (Bachem, Weil), gelöst in 70% Acetonitril/0,1% TFA. Das endgültige Eluat wird dann alle 15 s auf einen leeren 123 x 81 mm *Opti-TOFTM* LC/MALDI-Probenhalter gespottet.

Tab. 3-4: Auf der Agilent HP 1100 ausgeführte nLC-Experimente (135 min-Gradient).

In der Tabelle sind die verwendeten Proben, die geladene Probenmenge pro Lauf und der zugehörige Versuch im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

Probe	Menge	Versuch	Kapitel	Tabelle
PM	25 µg	Trypsin-Verdau; 1D Trennung für MALDI	4.3.1	4-2
PM	25 µg	Elastase-Verdau; 1D Trennung für MALDI	4.3.1	4-2
CGM1698	200 µg	Elastase-Verdau; 1D Trennung für MALDI	4.3.1	4-2
PM	25 µg	Elastase-Verdau; 1D-Vergleichsreferenz zu OGE/nLC	4.4.2	4-4
CGM1730	100 µg	Elastase-Verdau; 1D-Vergleichsreferenz zu OGE/nLC	4.4.2	4-4

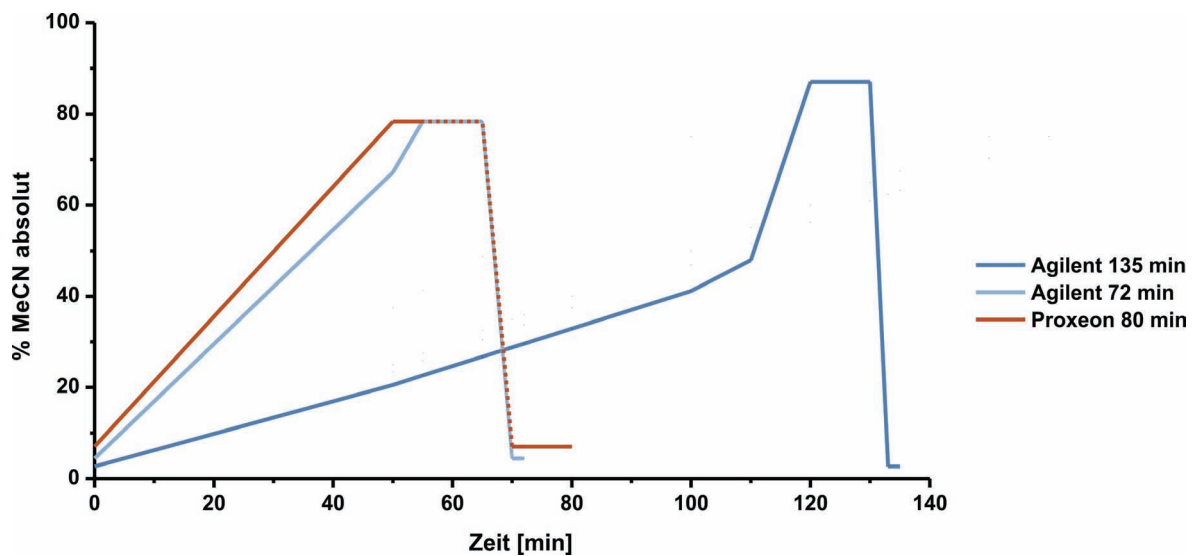


Abb. 3-1: Übersicht über die beim MALDI-Spotting verwendeten nano-HPLC-Gradienten.

Die Verläufe der absoluten Acetonitril-Konzentration in den einzelnen verwendeten nLC-Gradienten sind graphisch dargestellt.

Die *Precursor*-Auswahl der einzelnen nLC-Fractionen erfolgt aus den Spektren einer MS-Messung die entsprechend der in Kap. 3.3.1 vorgestellten Methodik durchgeführt wird. Um den Probenverbrauch vor den MS/MS-Aufnahmen zu verringern, werden die aufsummierten Schüsse auf 750 reduziert. Das Plattenmodell wird bei allen nLC-MALDI-Versuchen, aufgrund der anderen Plattendefinition nur mit acht Kalibrierpunkten erstellt. Anschließend findet eine interne Nachkalibrierung auf die Masse des zugesetzten [Glu¹]-Fibrinopeptids statt, um eine *Precursor*-Massengenauigkeit von weniger als 30 ppm zu gewährleisten. Die instrumenteneigene Interpretationsmethode übernimmt die Auswahl der sechs intensivsten Signale pro *Spot* zur Fragmentierung per MS/MS. Um in Betracht gezogen zu werden, müssen sie mindestens ein S/R von 50 aufweisen. Eine Mehrfachauswahl identischer Massen in unterschiedlichen Fractionen wird hierbei innerhalb 30 ppm Massendifferenz ausgeschlossen. Potentielle Matrixcluster werden ebenfalls von der Fragmentierung ausgeschlossen, indem alle Signale kleiner als 1.400 m/z nicht selektiert werden, falls ihre Nachkommastelle $,03 \pm 0,1$ m/z beträgt. Die Aufnahme der MS/MS-Spektren erfolgt im identischen Gerätemodus wie die Einzelmessungen aus Kap. 3.3.4. Je nach Qualität der aufgenommenen Daten entscheiden automatische Abbruchkriterien über die Zahl der aufsummierten Laserschüsse, maximal sind es 2.500.

Die nLC-MALDI-Daten werden anschließend durch die *Peaks2Mascot*-Funktion der *4000-Exprover*TM-Kontrollsoftware in das *Mascot Generic File* (MGF)-Format exportiert. Die Listen enthalten maximal 65 Massen von Signalen mit einem minimalen S/R von 5 und können direkt zur Datenbanksuche verwendet werden.

Die Suche der aus den nLC-Experimenten stammenden MGF-Dateien wird ebenfalls mit der *Mascot*-Suchmaschine durchgeführt. Die *Precursor*-Suchgenauigkeit beträgt bei TOF/TOF-Spektren mit erfolgter interner Kalibrierung 30 ppm. Als MS/MS-Fragment-Toleranz wird $\pm 0,3$ Da angenommen. Die Abschätzung der Falschpositiven-Rate wird durch die *Mascot*-interne *Decoy*-Suchfunktion vorgenommen, bei der gegen eine randomisierte Zufallsdatenbank gesucht wird. Die Falschpositiven-Rate berechnet sich dann aus dem Quotient von signifikanten *Decoy*-Treffern und der Summe aus tatsächlich identifizierten Peptiden und den *Decoy*-Treffern.

Alle weiteren Auswertungen von MS/MS-Experimenten enthalten nur Peptide, die *Ion Scores* über dem „*Mascot Identity or extensive Homology*“-Schwellenwert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ besitzen. Optional wird in einigen Experimenten auf eine vergleichbare Rate an falschpositiven Identifikationen normalisiert. Ob dies geschieht, wird im entsprechenden Kapitel des Ergebnisteils angegeben. Bei einer mehrfachen Fragmentierung bestimmter *Precursor*-Peptide, werden nur die Daten des Peptids mit dem höchsten *Ions Score* behalten.

3.4.2 Nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF auf der Proxeon EASY-nLC

Die Auftrennung der in Tab. 3-5 gelisteten Proben erfolgen auf einer Proxeon Biosystems (Odense, Dänemark) *EASY-nLC*TM, an die ein *SunCollect*TM MALDI-Spotter (SunChrom, Friedrichsdorf) gekoppelt ist. Das auf die selbstgepackte Vorsäule (Waters *X-Bridge*TM *BEH 180 C18*, Innendurchmesser 200 μm , Porengröße 300 Å, Länge 30 mm) injizierte Probenvolumen beträgt 12 μl und wird anschließend mit 36 μl Fließmittel A entsalzt. Als analytische Säule kommt wiederum eine LC Packings/Dionex *PepMap*TM *100* zum Einsatz, und auch die Flussrate ist mit 300 nl/min zum Agilent *HP 1100*-Aufbau identisch. Der verwendete 80 min lange Gradient beinhaltet einen Anstieg der Fließmittel B-Konzentration von 8 auf 90% in 50 min, eine Plateauphase von 10 min und den Abfall auf 8% innerhalb von 5 min. Dann wird noch weitere 5 min mit 8%

Fließmittel B gespült (Abb. 3-1). Das Eluat wird mit der bereits beschriebenen Matrixlösung alle 20 s auf den Probensteller gespottet.

Die anschließende massenspektrometrische Messung und die Datenbanksuche sind identisch zum Ablauf der nLC-MALDI-MS/MS-Experimente mit dem Agilent *HP 1100*-System (Kap. 3.4.1)

Tab. 3-5: Auf der Proxeon *EASY-nLC* ausgeführte nLC-Experimente (80 min-Gradient).

In der Tabelle sind die verwendeten Proben, die geladene Probenmenge pro Lauf und der zugehörige Versuch im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben. Die mit * gekennzeichneten verwendeten CGM werden nicht durch einen vorgezogenen Proteolyseschnitt von ihren löslichen Proteinanteilen befreit.

Probe	Menge	Versuch	Kapitel	Tabelle
CGM1730*	150 µg	Trypsin-Verdau; 1D Trennung für MALDI	4.3.7	4-3
CGM1730*	150 µg	Elastase-Verdau; 1D Trennung für MALDI	4.3.7	4-3
PM	50 µg	Pepsin-Verdau; 1D Trennung für MALDI	4.7.3	4-9

3.4.3 nLC-ESI-LIT-Orbitrap

Sämtliche nLC-ESI-Experimente dieser Arbeit sind in der Arbeitsgruppe von Dr. Ansgar Poetsch in Bochum durchgeführt worden. Die in Tab. 3-6 aufgelisteten Proben werden vor dem Einbringen in das nLC-System mit Varian *C18-AR Syringe Tips* gereinigt. Der Aufbau besteht aus einer Thermo Scientific (Bremen) *Accela*TM 600 Gradientenpumpe und einer 10 cm langen mit Eclipse *XDB C18*-Material gefüllten RP-Säule. Die Länge des eingesetzten linearen Gradienten beträgt bei den Membranproteom-Proben 150 min. Der komplette nLC-ESI-MS/MS-Aufbau inklusive weiterer Parameter wurde in Wolters *et al.* (2001), Fischer *et al.* (2006) und Haussmann *et al.* (2009) bereits mehrfach ausführlich beschrieben.

Tab. 3-6: Auf der Thermo *Accela* nLC ausgeführte nLC-Experimente (150 min-Gradient).

In der Tabelle sind die verwendeten Proben, die geladene Probenmenge pro Lauf und der zugehörige Versuch im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

Probe	Menge	Versuch	Kapitel	Tabelle
PM	25 µg	Elastase-Verdau; 1D Trennung für ESI	4.3.1	4-2
CGM1698	200 µg	Elastase-Verdau; 1D Trennung für ESI	4.3.1	4-2

An die nLC ist eine Thermo Scientific *LTQ-Orbitrap* gekoppelt. Die Fragmentierung in der linearen Ionenfalle erfolgt parallel zur Bestimmung der genauen *Precursor*-Massen in der Orbitrap, d.h. von jedem *Full Scan* in der Orbitrap bei 60.000 Auflösung werden die vier intensivsten Signale in der linearen Ionenfalle fragmentiert. Die beheizte Kapillare zur Desolvation besitzt eine Temperatur von 200°C. Die relative Kollisionsenergie für CID in der Ionenfalle beträgt 35%. Eine dynamische Ausschlussliste mit einer Wiederholungszahl von 1 und einem Zeitfenster von 1 min wird aktiviert.

ESI-Massenlisten werden durch die Extraktion der Xcalibur-Rohdateien mit *export_msn* (Thermo Scientific) erzeugt. Alle Standardeinstellungen werden übernommen, lediglich die Anzahl gruppierter Scans wird auf 1 gesetzt. Die erhaltenen Dateien werden mit dem Skript *merge.pl* (Matrix Science Ltd., UK) zu einer MGF-Datei zusammengefügt, welche zur Datenbanksuche verwendet wird.

Auch hier erfolgt die Datenbanksuche mit der *Mascot*-Suchmaschine. Die *Precursor*-Suchgenauigkeit beträgt bei Instrumenten-Kalibrierung der ESI-Orbitrap 5 ppm. Als MS/MS-Fragment-Toleranz wird $\pm 0,8$ Da angenommen. Die Abschätzung der Falschpositivenrate und die weiteren Auswertungen werden analog zu den MALDI-Daten durchgeführt (Kap. 3.4.1).

3.4.4 MudPIT

Zur MudPIT-Analyse wird die Peptidmischung (Tab. 3-7) auf einer dreiphasigen Kapillarsäule aufgetrennt, die mit 3 cm C18-, 4 cm SCX- und abschließend erneut mit 12 cm C18-Material gefüllt ist. Die verwendeten nLC-Geräteparameter gleichen überwiegend den Ausführungen in Fischer *et al.* (2006) und Haussmann *et al.* (2009). Die schrittweise Elution vom Kationenaustauscher erfolgt in den Stufen 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% mit einem Hochsalz-Fließmittel (1 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 5% MeCN, 0,012% HFBA). Zuletzt wird noch ein 10-minütiger Salzwaschschritt demselben Fließmittel durchgeführt. Vom der C18-Phase wird die erste Fraktion (0%) mittels einem linearen 180 min Gradienten, die restlichen Fraktionen jeweils mit 100 min langen linearen Gradienten eluiert. Die Einstellungen des ESI-Instruments und das Prozessieren der erhaltenen Daten entsprechen den Abläufen der 1D-nLC-ESI-Experimente (Kap. 3.4.3).

Tab. 3-7: MudPIT-Experimente auf der Thermo *Accela* nLC (100 bzw. 180 min-Gradient).

In der Tabelle sind die verwendeten Proben, die geladene Probenmenge pro Lauf und der zugehörige Versuch im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

Probe	Menge	Versuch	Kapitel	Tabelle
CGM1730	600 μg	Elastase-Verdau; MudPIT	4.4.3	4-5

3.4.5 *Off-gel IEF/nLC-MALDI-TOF/TOF*

Die OGE-Fraktionierung wird in dem *3100 OFFGEL™ Fractionator* der Fa. Agilent Technologies (Waldbronn) durchgeführt. Für die Variante mit 12 Fraktionen kommen 13 cm lange lineare IPG-Streifen zum Einsatz, die einen pH-Bereich von 3 bis 10 abbilden. Die zu ladenden Proben werden in einer Konzentration von 1 µg/µl verdaut und mit OGE-Puffer-Stammlösung auf 1,8 ml (12 Fraktionen à 150 µl) aufgefüllt, so dass die Endkonzentration an Ampholyten 1% (v/v) und an Methanol 20% (v/v) beträgt. Auf den Zusatz von Glycerol wird, entgegen dem Herstellerprotokoll, verzichtet. Um dennoch ein Austrocknen der äußeren Fraktionen zu verhindern, wird zu den 150 µl der Probelösung in die Fraktionen 1 und 12 zusätzlich 100 µl und in die Fraktionen 2 und 11 weitere 50 µl OGE-Puffer gegeben. Die Fokussierung findet dann bei maximal 50 mA und 2 kV pro Streifen statt, bis ein Zielwert von 20 kWh erreicht wird. Die so erhaltenen Fraktionen werden auf ein Volumen von ca. 10 µl in einer Vakuumzentrifuge eingengt und können direkt in die nLC eingespritzt werden.

Die per OGE vorfraktionierten Proben (Tab. 3-8) werden ebenfalls auf dem Agilent *HP 1100*-System aufgetrennt. Da sie eine deutlich geringere Komplexität aufweisen, kann ein kürzerer, insgesamt 72 min langer Gradient eingesetzt werden. Der Fließmittel B-Anteil steigt linear innerhalb von 55 min von 5 auf 90% an, wird für 10 min auf diesem Wert gehalten, bevor er in 5 min auf 5% zurückfällt und eine 2-minütige Spülphase folgt (Abb. 3-1). Ab hier sind sämtliche weiteren Vorgänge mit der 1D-nLC-MALDI-Analyse identisch (Kap. 3.4.1).

Tab. 3-8: Auf der Agilent *HP 1100* ausgeführte nLC-Experimente (72 min-Gradient).

In der Tabelle sind die verwendeten Proben, die geladene Probenmenge pro Lauf und der zugehörige Versuch im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

Probe	Menge	Versuch	Kapitel	Tabelle
PM	200 µg	Elastase-Verdau; OGE/nLC-2D-Trennung für MALDI	4.4.2	4-4
CGM1730	300 µg	Elastase-Verdau; OGE/nLC-2D-Trennung für MALDI	4.4.2	4-4

3.4.6 Kombination von MALDI-Orbitrap-MS und MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Die in Tab. 3-9 aufgeführten Proben werden mit der in Kap. 3.4.2 besprochenen Methode auf der Proxeon *EASY-nLC* aufgetrennt. Die Fraktionen werden entsprechend auf dem MALDI-TOF/TOF vermessen und 6 *Precursor* pro *Spot* mit bis zu 2.500 Schuss fragmentiert und MGF-Dateien aus den erhaltenen Daten erzeugt.

Tab. 3-9: Auf der Proxeon *EASY-nLC* ausgeführte nLC-Experimente (80 min-Gradient).

In der Tabelle sind die verwendeten Proben, die geladene Probenmenge pro Lauf und der zugehörige Versuch im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

Probe	Menge	Versuch	Kapitel	Tabelle
PM (99% BR)	100 µg	Elastase-Verdau; 1D Trennung für „OrbiTOF“	4.5.5	4-6
CGC1730	100 µg	Elastase-Verdau; 1D Trennung für „OrbiTOF“	4.5.5	4-6

Zur Ermittlung der akkuraten *Precursor*-Massen zu den TOF/TOF-Daten, muss die Probe nach der Fragmentierung auf den Orbitrap-Probenteller transferiert werden. Die Probenpräparationen werden in 1,5 µl Lösungsmittel (50% Acetonitril, 25% Ethanol, 0,1% TFA) mit einer Pipette rückgelöst und direkt auf einen Orbitrap-Probenteller übertragen, auf den 0,5 µl 2 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxymizsäure-Lösung vorgespottet worden ist. Die eigentliche Messung verläuft analog zu den anderen MALDI-Orbitrap-MS-Versuchen (Kap. 3.3.3).

Die Orbitrap-Daten werden durch die *Xtract*-Funktion der *Xcalibur 2.0.7 QualBrowser*TM-Software mit den folgenden Einstellungen deisotopiert: *S/R* 3, *Fit Factor* 44%, *Remainder* 35%, *Average Building Block*). Anschließend werden die TOF/TOF-*Precursor*-Massen mit den neuen Orbitrap-Werten direkt in der MGF-Datei ersetzt. Dies wird durch einen automatischen Abgleich beider Massenlisten innerhalb 100 ppm Toleranz bewerkstelligt. Mit den erzeugten hybriden MGF-Dateien werden mittels *Mascot* Datenbanksuchen durchgeführt. Als Suchgenauigkeit wird 5 ppm angenommen, die MS/MS-Fragment-Toleranz beträgt $\pm 0,3$ Da. Die Ergebnisse werden dann mit den ursprünglichen extern kalibrierten TOF/TOF-Resultaten verglichen, die mit 50 ppm *Precursor*-Genauigkeit gesucht werden. Der gesamte Ablauf ist zur besseren Übersicht in Abb. 3-2 dargestellt.

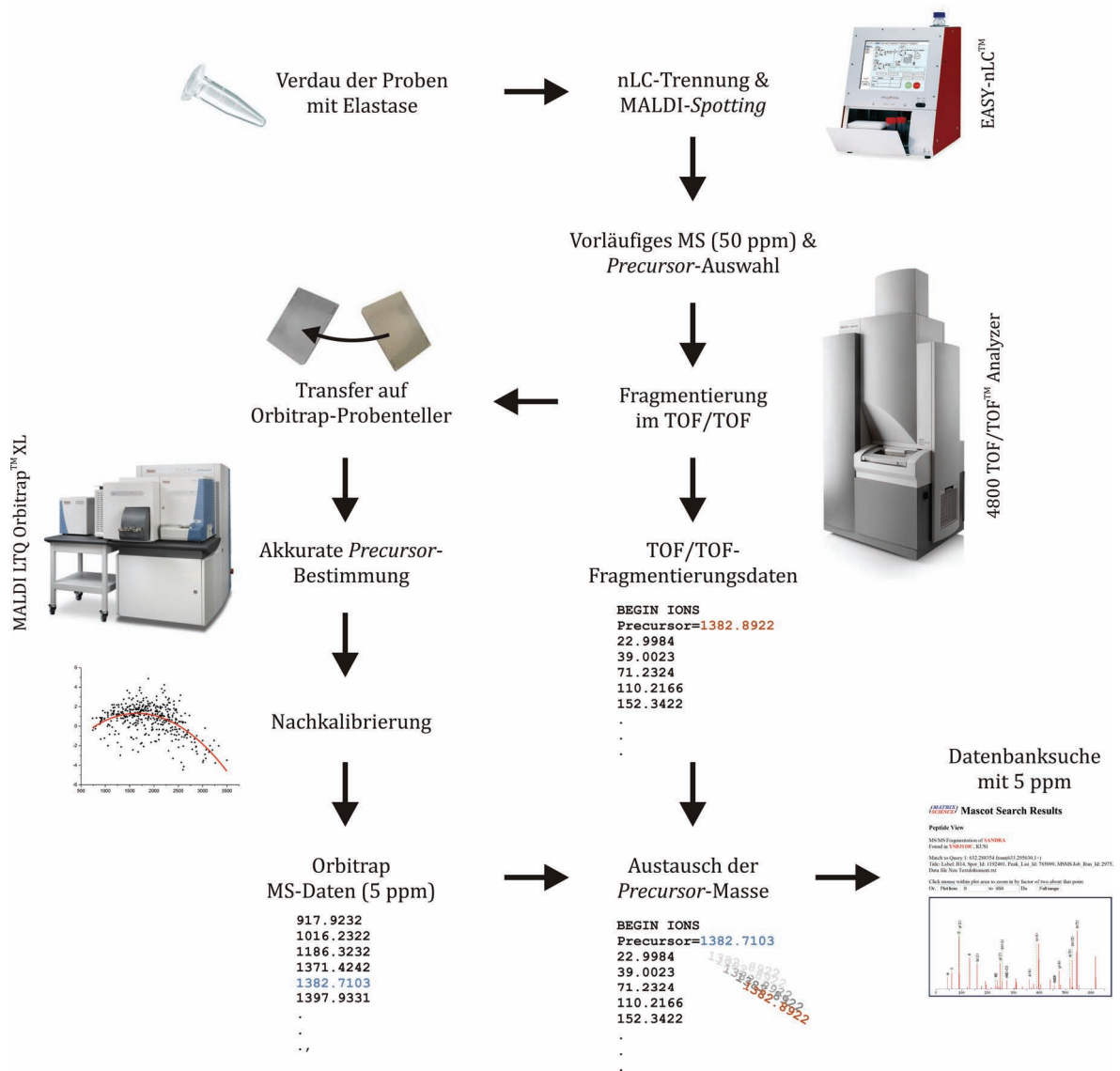


Abb. 3-2: Ablauf zur Erzeugung eines Datensatzes aus Orbitrap und TOF/TOF-Daten.

Schema der durchgeführten Schritte zur Erzeugung eines hybriden Datensatzes mit TOF/TOF-Fragmentierungsdaten und akkuraten Orbitrap-MS-Massen.

3.5 Weitere Methoden

3.5.1 Tris-Tricin-SDS-PAGE

Die 16% T/3% C-Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgele bei der Auftrennung von *Corynebacterium*-Membranen zur Aktivitätskontrolle der Elastase und zur Aufreinigung von Bacteriorhodopsin für den Verdau im Gel werden nach dem Standardprotokoll von Schägger (2006) durchgeführt.

Die Visualisierung der aufgetrennten Proteine erfolgt durch Färbung mit kolloidalem Coomassie nach Neuhoff *et al.* (1988).

3.5.2 Berechnung physikochemischer Eigenschaften

Die Hydrophobizität einzelner Peptide wird über die Berechnung des GRAVY-Scores nach Kyte und Doolittle (1982) abgeschätzt.

Zur Berechnung des isoelektrischen Punktes werden die Angaben zu einzelnen Aminosäuren aus Nelson und Cooks *Lehninger Principles of Biochemistry 3rd Ed.* (2001) herangezogen.

Transmembran-Bereiche von Proteinen werden mit dem *TMHMM 2.0*-Algorithmus (Krogh *et al.*, 2001) vorhergesagt und mit TMRPres2D (Spyropoulos *et al.*, 2004) dargestellt.

3.5.3 3D-Strukturmodelle

Sämtliche in der Arbeit dargestellten 3D-Strukturmodelle von Proteinen werden mittels dem PyMOL 0.99rc6 *Molecular Viewer*TM erzeugt (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA). Die zugrundeliegenden Strukturdaten entstammen den in Tab. 3-10 aufgeführten Publikationen.

Tab. 3-10: Verwendete 3D-Strukturdaten.

In der Tabelle sind die verwendeten PDB-Einträge (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) mit Referenz und die Abbildungen angegeben, in denen die jeweiligen Strukturmodelle verwendet werden.

Protein	PDB-Eintrag	Abbildung	Referenz
Spannungsabh. Anionenkanal 1	3EMN	1.1	Ujwal <i>et al.</i> , 2008
Cyclooxygenase 2	4COX	1.1	Kurumbail <i>et al.</i> , 1996
Cytochrom c ₁	1NTM	1.1	Gao <i>et al.</i> , 2003
Bacteriorhodopsin	2BRD	1.1, 1.3, 4.3, 4.13, 4.38	Grigorieff <i>et al.</i> , 1996
CD59 Glycoprotein	2UWR	1.1	Leath <i>et al.</i> , 2007
Trypsin	2FX6	1.2, 1.5, 1.8	McGrath <i>et al.</i> , 2006
Bacteriorhododopsin Trimer	1BRR	1.3	Essen <i>et al.</i> , 1998
Chymotrypsin	1AB9	1.5, 1.6	Kashima <i>et al.</i> , 1998
Elastase	1H9L	1.5, 1.6	Wright <i>et al.</i> , 2001
Glutamyl Endopeptidase I	2O8L	1.5	Prasad <i>et al.</i> , 2006
Proteinase K	2PKC	1.5	Müller <i>et al.</i> , 1994
Pepsin	5PEP	1.7	Cooper <i>et al.</i> , 1990

Kapitel 4

ERGEBNISSE



4. Ergebnisse

4.1 Aufbau des Ergebnisteils

In dieser Arbeit werden die dargestellten Experimente nicht zwingend in ihrer chronologischen Reihenfolge präsentiert. Um eine bessere Übersicht zu bieten, ist der Zusammenhang der einzelnen Abschnitte in Abb. 4-1 dargestellt.

In Kap. 4.2 werden verschiedene Experimente zur Charakterisierung elastatischer Verdau des Modell-Membranproteins Bacteriorhodopsin vorgestellt. Das neue Enzym wird mit dem Standard Trypsin verglichen und der Zusatz von organischen Lösungsmitteln, insbesondere Methanol, genauer untersucht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wird das verbesserte Protokoll dann, wie in Kap. 4.3 besprochen, zur Proteolyse komplexer Membranproteome verwendet. Es kommen ausschließlich nLC-MS/MS-basierte Analysen zum Einsatz, die auf den zwei instrumentellen Geräteplattformen ESI-LIT-Orbitrap und MALDI-TOF/TOF durchgeführt und verglichen werden. Die fortschreitende Entwicklung zu einer robusten auf Elastase aufbauenden nLC-MALDI-MS/MS-Methode hin, stellt das Hauptziel dieser Arbeit dar. Zwei der dabei auftretenden Einschränkungen werden weiter behandelt. Zum Einen wird in Kap. 4.4 die Trennleistung durch Etablierung einer zwei-dimensionalen Methode gesteigert. Zum Anderen kann durch die Kombination von Daten mehrerer MALDI-Instrumente die Ausbeute der Datenbanksuche gesteigert werden, worauf in Kap. 4.5 näher eingegangen wird. Da noch keine Untersuchungen zur Fragmentierung von elastatisch erzeugten Peptiden vorliegen, wird aus den gesammelten MS/MS-Daten eine umfassende Fragmentierungsstatistik erzeugt werden, die in Kap. 4.6 behandelt wird. Neben dieser ausgiebigen Versuchsreihe zum Enzym Elastase, werden in Kap. 4.7 auch andere Proteasen mit dem optimierten Verdauprotokoll evaluiert. Hierbei wird insbesondere der Verdau mit Pepsin intensiv besprochen und analysiert.

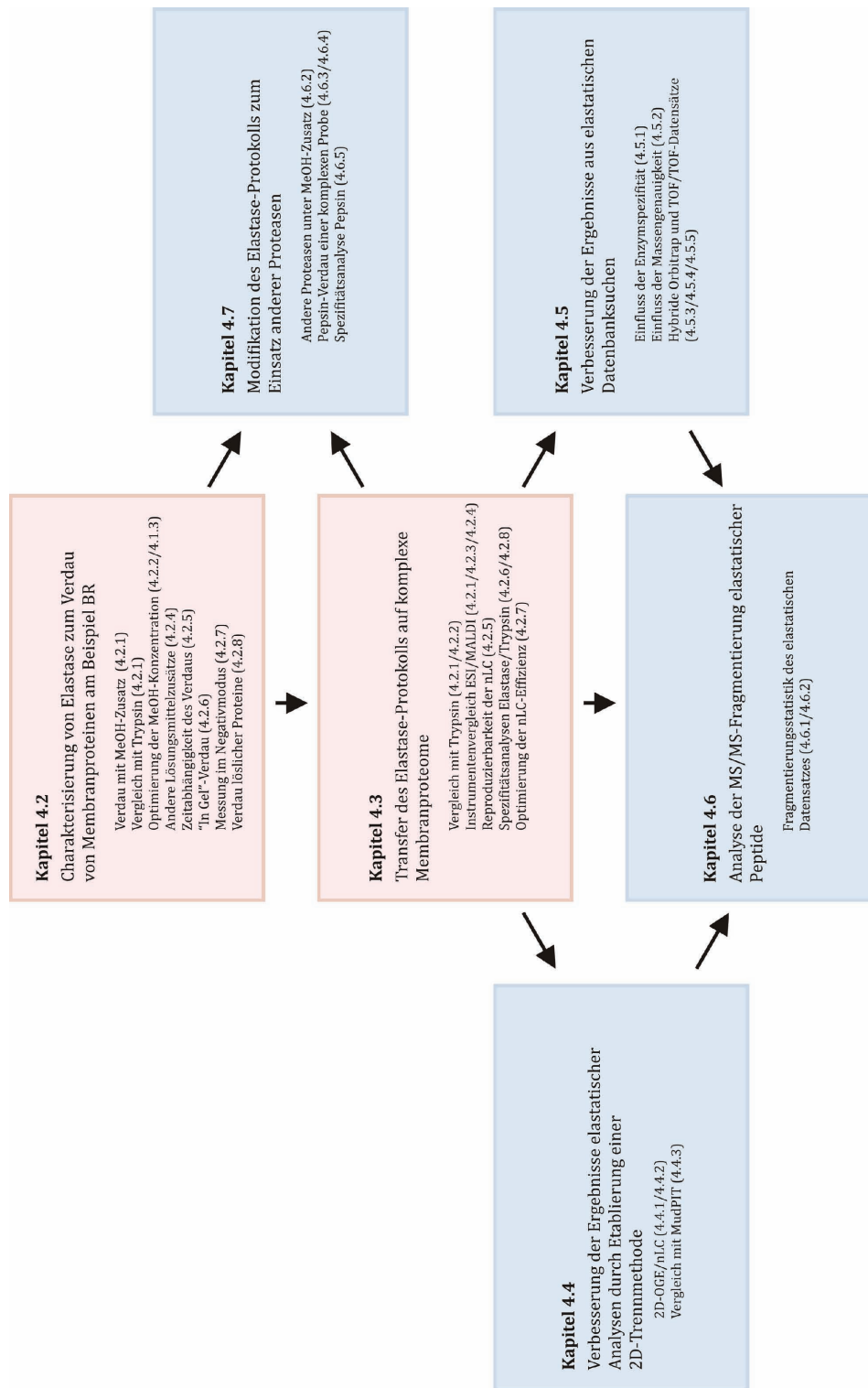


Abb. 4-1: Übersicht der vorgestellten Ergebnisse.

Die Inhalte der einzelnen Kapitel des Ergebnisteils sowie einzelne Unterpunkte sind samt ihrer zugehörigen Kapitelnummern angegeben. Die Kapitel mit der hauptsächlichen Aufgabenstellung dieser Arbeit sind rot unterlegt.

4.2 Proteolyse von Membranproteinen mittels Elastase

4.2.1 Proteolyse durch Elastase unter Zusatz von Methanol

Im Zuge der zunehmenden Einschränkungen, die sich bei der Verwendung von Trypsin zur Proteolyse von Membranproteinen ergeben, wird eine Alternative zum bestehenden Protokoll erarbeitet. Da sich Trypsin- und Chymotrypsin-Verdau in Methanol-haltigem Puffer bereits als sehr förderlich für die Analyse von Membranproteinen herausgestellt hatten, lag es nahe, diese Änderung auch auf andere Proteasesysteme zu übertragen. Die pankreatische Serinprotease Elastase-1 kam bisher nur in wenigen proteomischen Anwendungen zum Einsatz. Zur Tauglichkeitsanalyse von Elastase für den Verdau von Membranproteinen werden Purpurmembranen aus *Halobacterium salinarium* eingesetzt. Diese enthalten zu mehr als 90% die H⁺-ATPase Bacteriorhodopsin, welche im Folgenden mehrfach als Modellsystem für Membranproteine eingesetzt wird.

Die MALDI-TOF-Übersichtsspektren von tryptischen und elastatischen Purpurmembran-Verdau zeigen sehr deutlich den Einfluss des Methanols im Proteolysepuffer (Abb. 4-2). Unabhängig von der verwendeten Protease weisen die Spektren von rein wässrigen Proben eine unruhige Basislinie und nur eine geringe Signalintensität auf. Demzufolge können nur sehr wenige der auftretenden Signale via *Peptide Mass Fingerprint* dem Bacteriorhodopsin oder einer der Proteasen zugeordnet werden. Die verbleibenden nicht-zugeordneten Signale stammen überwiegend von Matrixclustern und den weniger abundanten, aber leichter zugänglichen Proteinen in der Probe. Exemplarisch steht hierfür das Peptid der Masse 1728,95 Da, welches per MS/MS eindeutig der *Halobacterium salinarium* ATP-Synthase Untereinheit K zugeordnet werden kann.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im rein wässrigen System, können bei 60% Methanol im Reaktionspuffer eindeutige Spektren aufgenommen werden. Sowohl bei der Verwendung von Trypsin als auch von Elastase werden sämtliche intensiven Signale überwiegend der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz zugeordnet. Allerdings ist deren Anzahl im elastatischen Verdau deutlich höher, denn im Gegensatz zu neun tryptischen Peptiden, können hier 27 Peptide identifiziert werden. Die Autoproteolyse der Elastase ist vernachlässigbar gering und wirkt sich in der Praxis nicht störend auf die Auswertung der Daten aus. Sämtliche Ergebnisse und Parameter dieser PMF-Versuche sind in Tab. 4-1 übersichtlich zusammengefasst.

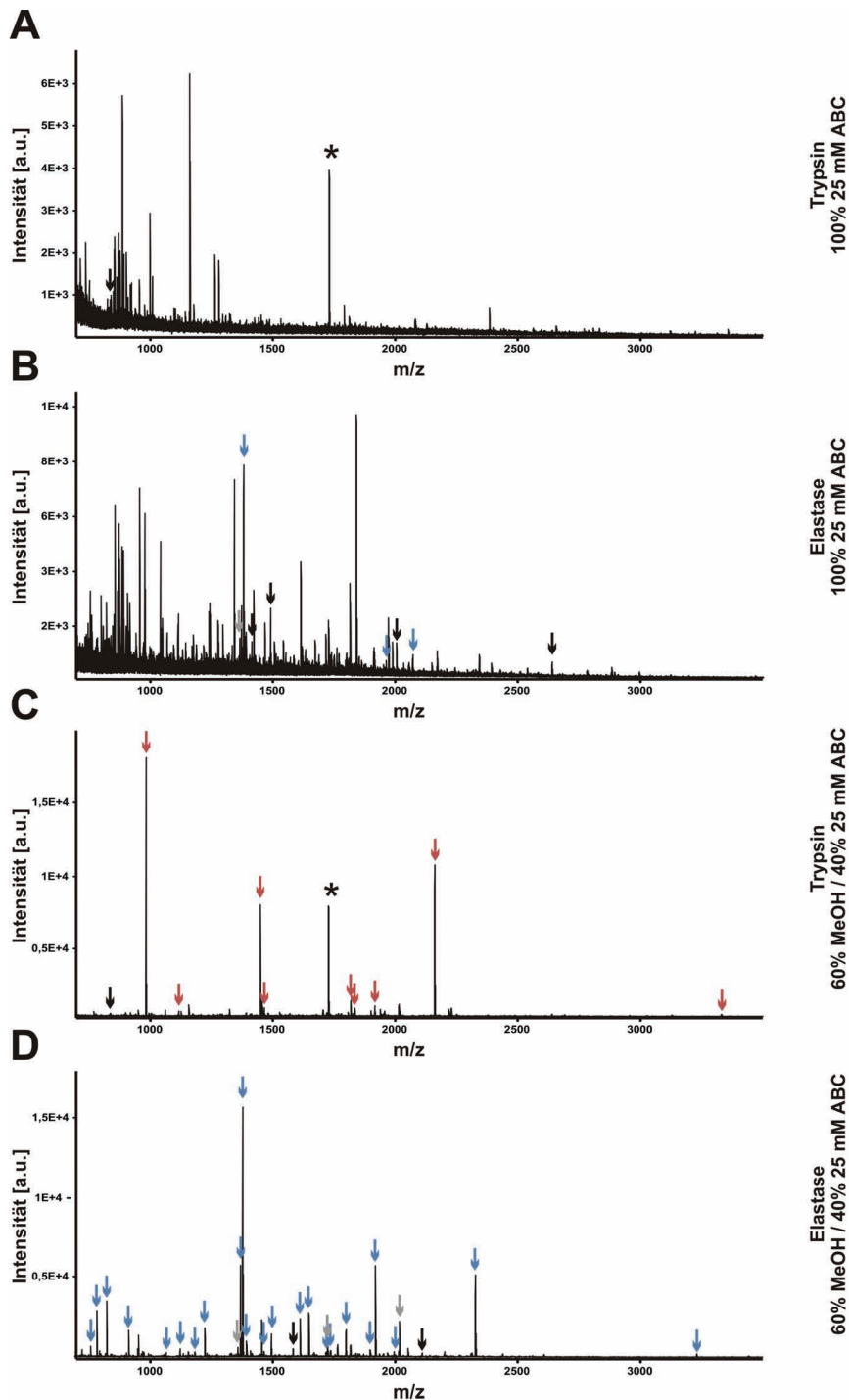


Abb. 4-2: MS-Spektren tryptisch und elastatisch verdauter Purpirmembranen.

MALDI-TOF-MS-Spektren. Die aufgetragene Probenkonzentration entspricht 1 pmol/ μ l. Spektren des tryptischen Verdauens von Purpirmembranen ohne (A) und in Anwesenheit (C) von 60% Methanol. Analoge Darstellung der MS-Spektren der elastatisch verdauten Probe (B,D). Blaue Pfeile kennzeichnen elastatische, rote Pfeile tryptische Signale, die innerhalb der verwendeten Suchgenauigkeit (Tab. 4-1) eindeutig Bacteriorhodopsin-Peptiden zugeordnet werden können. Schwarze Pfeile markieren Autoproteolysepeptide der Proteasen, graue können nicht eindeutig einer Proteinsequenz zugeordnet werden. Das mit einem Sternchen (*) markierte Signal stammt von einem Peptid der *Halobacterium salinarium* ATP-Synthase Untereinheit K. (min. S/R 10).

Tab. 4-1: Daten und Parameter zum PMF-Vergleich zwischen Trypsin und Elastase.

Die verwendete Suchspezifität und -genauigkeit ist aufgeführt, ebenso die zugeordneten Peptide und die daraus resultierende Bacteriorhodopsin-Sequenzabdeckung. Die Ermittlung der verwendeten Suchspezifität für Elastase (AVILTS) wird im Laufe dieser Arbeit diskutiert.

	Probe			
	Trypsin ABC	Elastase ABC	Trypsin MeOH/ABC	Elastase MeOH/ABC
Suchspezifität	KR	AVILTS	KR	AVILTS
Suchgenauigkeit	30 ppm	30 ppm	30 ppm	10 ppm
Eindeutige BR-Peptide	0	4	9	27
Sequenzabdeckung BR	0%	26,1%	35,9%	62,5%
Peptide Autolyse	1	5	1	5
BR-Peptidliste	-	-	Tab. 9-6A	Tab. 9-6B

Die erhöhte Anzahl an Bacteriorhodopsin-Peptiden im elastatischen Verdau schlägt sich auch in einer gesteigerten Abdeckung der Proteinsequenz nieder, die im Vergleich zu Trypsin mit 62,5% fast doppelt so hoch ausfällt. Eine genauere Betrachtung der abgedeckten Sequenzbereiche zeigt, dass in beiden Experimenten die Termini und die cytoplasmatischen Schleifen des Proteins den Proteasen sehr gut zugänglich sind (Abb. 4-3). Den größten Zuwachs an zusätzlich abgedeckter Sequenz kann bei einem Verdau mit Elastase im Inneren des Proteins erzielt werden. Insbesondere aus der Proteinregion unmittelbar vor und in Helix C (Aminosäure-Positionen 79 bis 96) stammt eine Vielzahl der gefundenen Peptide, die ausnahmslos das Arginin an Position 82 enthalten. Die Bildung von solchen sog. Peptidclustern, einer Anhäufung mehrerer Peptiden in einem bestimmten Sequenzbereich, ist typisch für elastatische Verdau. Sie sind ebenfalls ausgeprägt am Aminoterminus zu beobachten, der bei tryptischer Proteolyse nur ein relativ großes Peptid mit einer schwachen Intensität liefert (Abb. 4-3A).

A

10	20	30	40	50	60
QAQITGRPEW	IWLALGTALM	GLGTLYFLVK	GMGVSDPDAK	KFYAITTLVP	AIAFTMYLSM
70	80	90	100	110	120
LLGYGLTMVP	FGGEQNPIYW	ARYADWLFTT	PLLLLDLALL	VDADQGTILA	LVGADGIMIG
130	140	150	160	170	180
TGLVGALTKV	YSYRFVWVAI	STAAMLYILY	VLFFGFSTKA	ESMRPEVAST	FKVLRNVTVV
190	200	210	220	230	240
LWSAYPVVWL	IGSEGAGIVP	LNIEITLLFMV	LDVSAKVGFG	LILLRSRAIF	GEAEAPEPSA
250					
GDGAAATS					

B

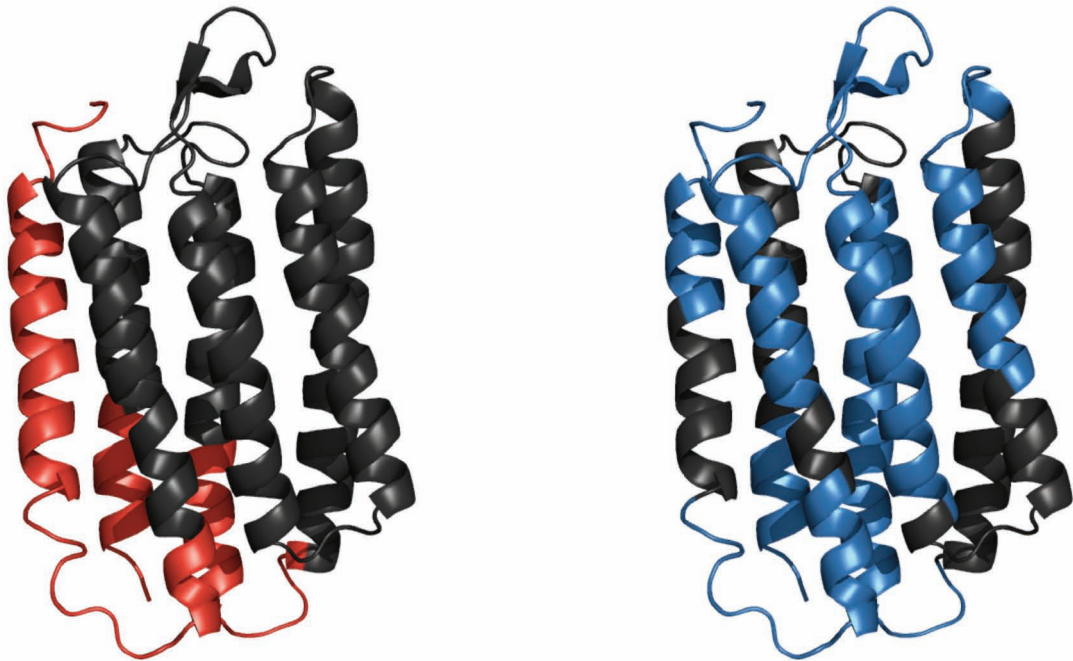


Abb. 4-3: PMF-Sequenzabdeckung von Bacteriorhodopsin mit Trypsin und Elastase.

(A) Position der per PMF zugeordneten Peptide in der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz unter Verwendung von Trypsin (rot) oder Elastase (blau). (B) 3D-Sekundärstrukturmodell von Bacteriorhodopsin. Die Bereiche, welche durch Peptide abgedeckt sind, sind farblich hervorgehoben: Trypsin (links, rot), Elastase (rechts, blau). Aus den schwarzen Proteinbereichen werden keine Peptide identifiziert (3D-Strukturmodelle siehe Tab. 3-10).

4.2.2 Einfluss der Methanolkonzentration auf die Proteolyse

Im vorangegangenen Experiment wird ein Methanol-Anteil von 60% im Reaktionspuffer eingesetzt, da sich dieser Wert bereits im tryptischen Experiment als vorteilhaft erwiesen hat. Um herauszufinden, ob es sich hierbei tatsächlich um das Optimum handelt, werden Elastase-Verdaus unter verschiedenen Konzentrationen an Methanol durchgeführt. Um Einflüsse von Fremdproteinen möglichst gering zu halten, werden in diesem Versuch speziell aufgereinigte Purpurmembranen mit einem Reinheitsgrad von mindestens 99% Bacteriorhodopsin verwendet.

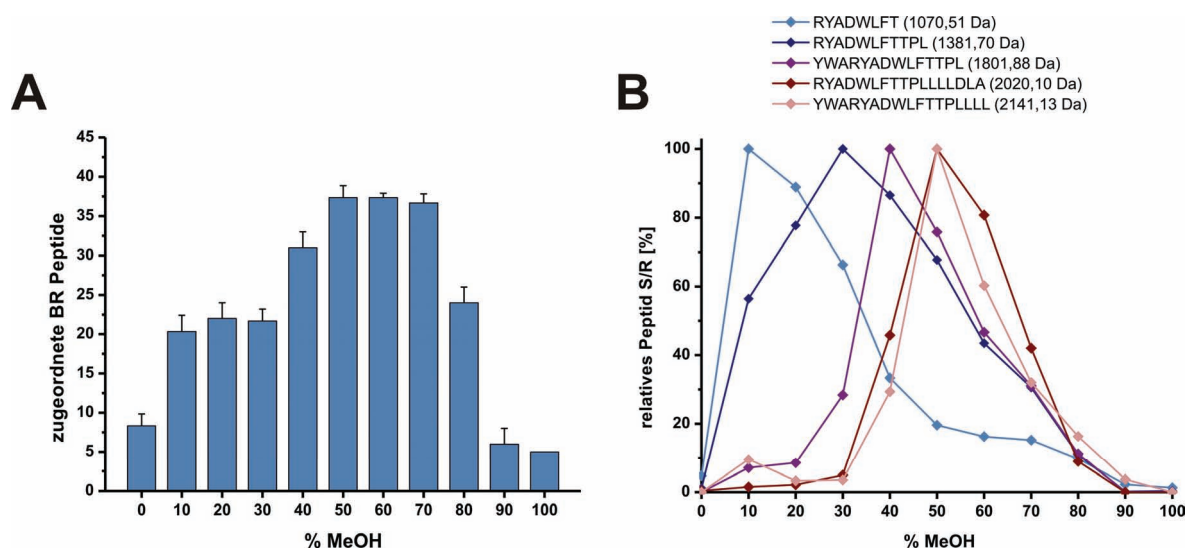


Abb. 4-4: Einfluss der Methanol-Konzentration auf den Bacteriorhodopsin-Verdau mit Elastase.

(A) Anzahl der über PMF- zugeordneten Bacteriorhodopsin-Peptide bei steigendem Gehalt an Methanol im Reaktionspuffer. (n=3, 10 ppm Suchgenauigkeit, Suchspezifität AVILTS, min. S/R 20, 2 pmol/μl BR). (B) Relatives S/R von fünf sequenzähnlichen Bacteriorhodopsin-Peptiden in den Purpurmembran-Verdaus mit verschiedenem Methanolgehalt.

Der optimale Methanolgehalt des Proteolysepuffers zur Analyse von Bacteriorhodopsin befindet sich im Bereich zwischen 50% und 70%. Dort werden jeweils ca. 37 Peptide zugeordnet (Abb. 4-4A). Außerhalb dieses Plateaus brechen die Peptidzahlen deutlich ein und erreichen in den Extrembereichen ihre Minimalwerte. Allerdings berücksichtigt diese Auswertung keine Signalintensitäten, so dass es durchaus vorkommen kann, dass außerhalb des Optimums um 60% Methanol zwar insgesamt weniger, aber deutlich intensivere Signale zu beobachten sind. Dies wird exemplarisch an dem S/R von fünf

unterschiedlich langen Peptiden demonstriert, die alle aus derselben Proteinregion um Arginin 82 stammen (Abb. 4-3A). Es ist eine Massenabhängigkeit zu beobachten, je kleiner ein Peptid, desto höhere S/R-Werte liefern geringere Methanol-Konzentrationen (Abb. 4-4B). Obwohl die kleineren Peptide ein maximales S/R bei niedrigem Methanol-Gehalt besitzen, sind höhere Konzentrationen insgesamt vorteilhafter. Hier sind größere Peptide gut zu detektieren aber auch kleine besitzen noch ausreichend S/R um nachgewiesen zu werden. Dies trifft im umgekehrten Fall nicht zu, da bei 10 bis 30% Methanol die größeren Peptide nur eine sehr geringe Signalintensität zeigen.

4.2.3 Einfluss der Methanolkonzentration bei einer komplexeren Probe

In vielen Fällen liegt bei der Proteomanalyse keine Probe mit ausschließlich einer Proteinkomponente vor. So ist zu beachten, dass es für die verschiedenen Proteine der komplexen Probe unterschiedliche optimale Bedingungen hinsichtlich des verwendeten Puffers gibt. Da sich neben Bacteriorhodopsin auch andere Proteine in der bereits verwendeten Purpormembranen-Präparation befinden, wird diese Probe analysiert. Neben dem Membranprotein Bacteriorhodopsin wird zusätzlich nach Peptiden gesucht, die der Sequenz des *Cell Surface Glycoproteins* CSG zugeordnet werden. Das im bakteriellen S-Layer lokalisierte Protein stellt ein membranverankertes, stark glykosyliertes und relativ hydrophiles Protein dar, dessen Peptide sich demzufolge in ihren physikochemischen Eigenschaften stark von denen des Bacteriorhodopsins unterscheiden. Neben den beiden Proteinen wird außerdem die Anzahl der elastatischen Autoproteolysepeptide in Abhängigkeit des Methanolgehalts im Puffer analysiert (Abb. 4-5A).

Geringe Methanol-Konzentrationen bis 20% sind vorteilhaft für die Analyse des *Cell Surface Glycoproteins*. Sowohl die absolute Anzahl an Peptiden als auch deren Intensität im Spektrum erreichen hier ihre Maximalwerte. In Bereichen höheren Methanolgehalts dominieren die Bacteriorhodopsin-Peptide und die CSG-Peptidzahl sinkt demzufolge (Abb. 4-5B). Da bei den Methanol-Angaben das Eigenvolumen der rein wässrigen Purpormembranen-Suspension nicht berücksichtigt wird, ist das Methanol-Optimum leicht in den höheren Bereich nach 70% verschoben. Wie die anderen PMF-Versuche bereits angedeutet haben, fällt der Selbstverdau des Enzyms über das gesamte Methanol-Spektrum relativ gering aus und korreliert eher mit der absolut gemessenen Intensität der Spektren.

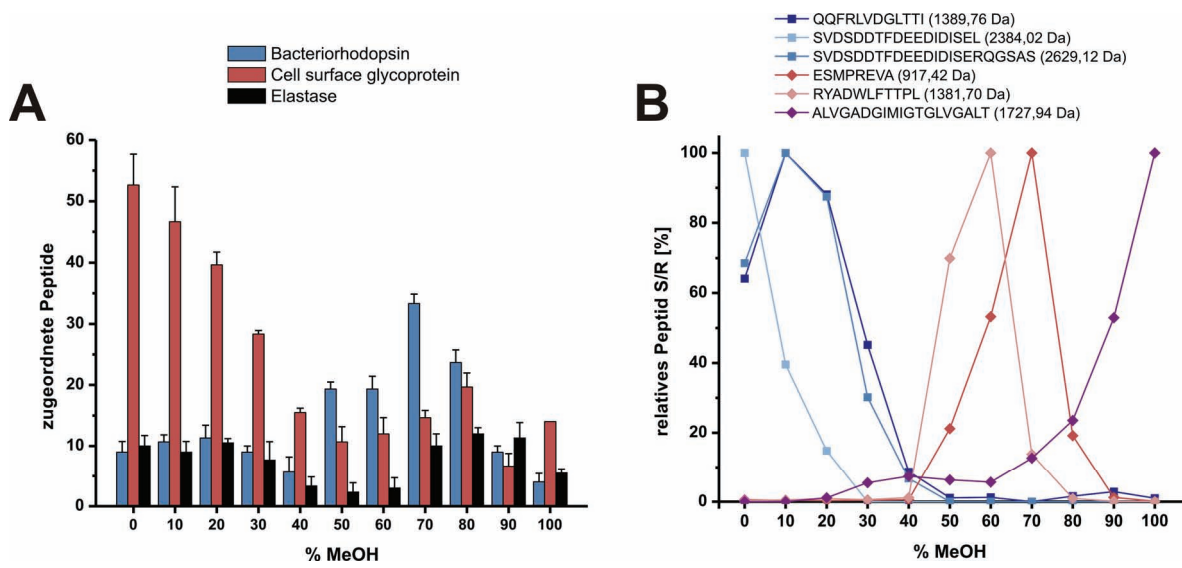


Abb. 4-5: Einfluss des Methanol-Konzentration auf den Purpirmembranen-Verdau mit Elastase.

(A) Anzahl der über PMF zugeordneten Peptide bei steigendem Gehalt an Methanol im Reaktionspuffer. (n=3, 10 ppm Suchgenauigkeit, Suchspezifität AVILTS, min. S/R 20, 1 pmol/μl BR). (B) Relatives S/R von 3 CSG- (blau) und 3 Bacteriorhodopsin-Peptiden (rot) in elastatischen Verdau mit unterschiedlichem Methanol-Anteil im Puffer.

4.2.4 Proteolyse in verschiedenen Lösungsmittelsystemen

Nicht nur durch die Zugabe von Methanol können verbesserte Löslichkeitsbedingungen für die hydrophoben Peptide geschaffen werden, welche bei der Spaltung von Membranproteinen entstehen. Als vielversprechende Ansätze sind Zusätze von MS-kompatiblen nicht-ionischen Detergenzien wie Octylglucosid oder Dodecylmaltosid, sowie der Einsatz alternativer organischer Lösungsmittelsysteme anzusehen. Die Detergenzien werden hierzu üblicherweise in der doppelten kritisch mizellaren Konzentration dem Proteolyseansatz zugesetzt. Ohne weitere Zugabe eines organischen Lösungsmittels trägt nur Octylglucosid zu einer Verbesserung der Ergebnisse bei, sie liegen jedoch deutlich unter denen des Referenzverdaus in 60% Methanol (Abb. 4-6). Die Kombination von 60% Methanol und den Detergenzien erzeugt ebenfalls keinen Vorteil, hier ist der Octylglucosid-Zusatz sogar leicht hinderlich. Von weiteren Experimenten mit einer Evaluierung verschiedener Detergenz-Konzentrationen wird abgesehen, da die bisher erhaltenen durchweg positiven Resultate dieser Arbeit den Fokus auf den Zusatz von organischen Lösungsmitteln zu den Elastase-Verdaus gelegt haben.

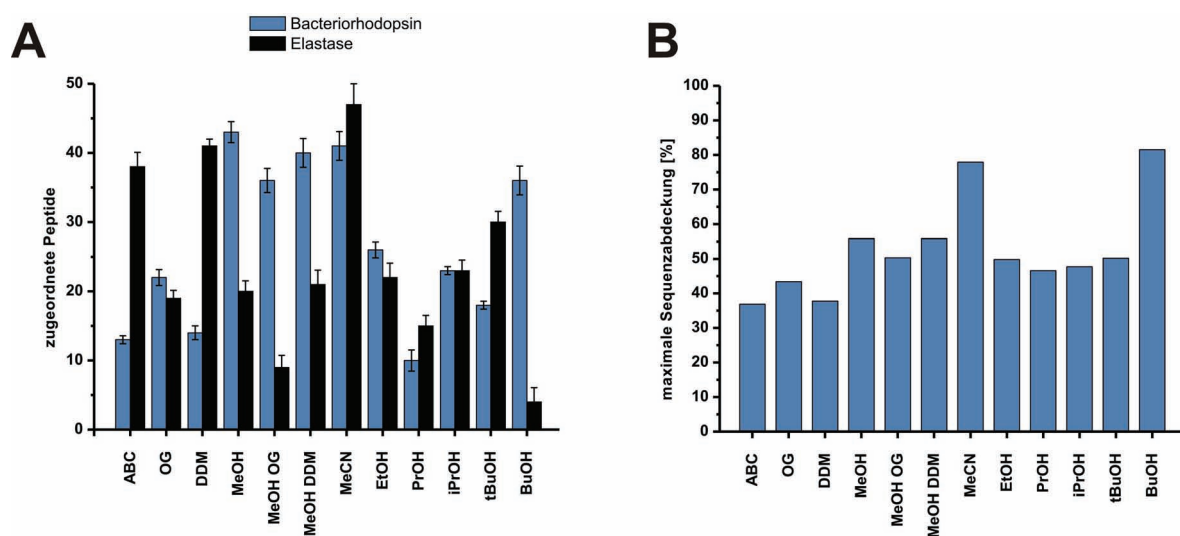


Abb. 4-6: Elastase-Verdau von Purpormembranen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen.

Anzahl der über PMF zugeordneten Peptide (A) und maximal erreichbare Bacteriorhodopsin-Sequenzabdeckung (B) in den unterschiedlichen Puffersystemen. (n=3, 20 ppm Suchgenauigkeit, Suchspezifität AVILTS, min. S/R 20, 2 pmol/μl BR).

Als Zusatz an organischen Lösungsmitteln kommen Acetonitril, Ethanol, *n*-Propanol, Isopropanol, *n*-Butanol und *tert*-Butanol als jeweils 60%-iger Bestandteil der Reaktionslösung zum Einsatz. Mit einer Ausnahme sind alle unbegrenzt mit Wasser mischbar, nur *n*-Butanol bildet ein Zwei-Phasen-System aus. Hier wird die organische Oberphase zur weiteren Messung verwendet, in der sich im Vergleich zu allen anderen Experimenten viele relativ große Peptide befinden (Abb. 4-7A), deren Identifikation aber gerade deshalb erschwert ist. Die *n*-Butanol-haltigen Präparationen bilden auf dem MALDI-Probenteller große konzentrische Ringe aus. In diesen sind ausschließlich Peptide der Probe, jedoch keine der größeren zugesetzten Standardpeptide zu messen. Diese sind zur Kalibrierung zwingend notwendig, da von den großen Bacteriorhodopsin-Peptiden keine verwertbaren MS/MS-Fragmentspektren erhalten werden. Aus diesem Grund ist auch die hohe erhaltene Sequenzabdeckung von 81,5% unter Vorbehalt zu betrachten, da sie leicht durch falschpositive Zuordnungen entstanden sein könnte (Abb. 4-6B).

Mit der Verwendung anderer Lösungsmittel werden durchweg schlechtere Ergebnisse als mit der methanolischen Referenz erzielt, lediglich Acetonitril liefert eine vergleichbare Peptidzahl und sogar die bessere Sequenzabdeckung des Proteins. Da es als Lösungsmittel standardmäßig zur MALDI-Probenpräparation verwendet wird, treten keine Kompatibilitätsprobleme mit der Messung auf. Allerdings besitzen die Verdau in Acetonitril im Vergleich zu Methanol einen deutlichen Nachteil, denn der Eigenverdau der Elastase ist um einiges ausgeprägter. Viele der autoproteolytischen Signale besitzen eine sehr hohe Intensität im Spektrum, so dass die zahlreichen Doppelzuordnungen nur mit MS/MS-Experimenten zu klären sind (Abb. 4-7B). Bei einer geringeren Rate an Selbstverdau wäre eine Zuordnung dieser Signale zum mengenmäßig überwiegenden Bacteriorhodopsin sicherlich die zutreffendste Option.

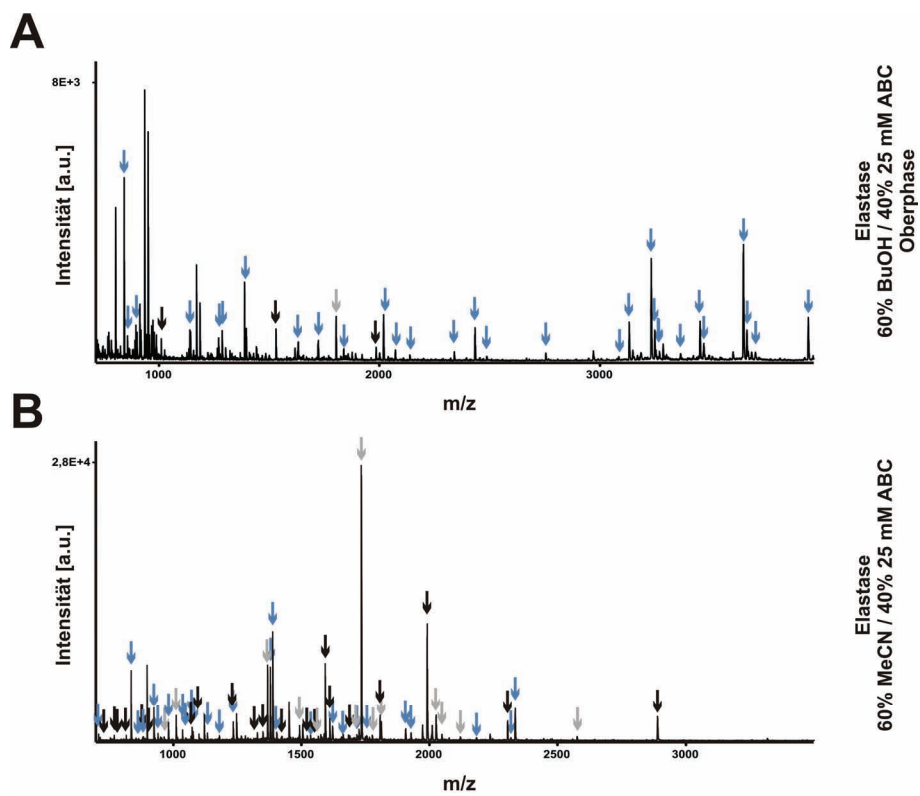


Abb. 4-7: Spektren der Elastase-Verdau von Purpormembranen in *n*-Butanol und Acetonitril.

MALDI-TOF-MS-Spektren. Verdau in 60% *n*-Butanol (**A**) oder 60% Acetonitril (**B**). Für eine Erklärung der Farbkodierung der markierten Signale siehe Abb. 4-1. Die identifizierten Peptide sind in den Tabellen 9-7A und 9-7B aufgeführt.

4.2.5 Einfluss der Proteolysedauer

Die Dauer des Proteolyseschlittes trägt maßgeblich zum Erfolg eines Verdauexperimentes bei. Ein unvollständiger Verdau ist hierbei ebenso unerwünscht, wie die komplette Proteolyse in zu kurze Produktpeptide, die außerhalb des Messbereichs liegen. Da verschiedene Proteasen eine unterschiedliche Aktivität besitzen und sich selbst durch Autoproteolyse inaktivieren können, wird der zeitliche Verlauf eines Bacteriorhodopsin-Verdaus mit Elastase charakterisiert. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wird ein Maximum an zugeordneten Peptiden erreicht, auch weisen die Signale im Spektrum zu diesem Zeitpunkt maximale Intensität auf (Abb. 4-8). Bei noch längerer Inkubationsdauer wird keine signifikante Änderung der gemessenen Spektren mehr beobachtet, so dass davon auszugehen ist, dass die Protease ihre Aktivität eingebüßt hat. Kürzere Proteolysezeiten als 16 h sind ebenfalls nicht zu empfehlen, weil hierdurch Information verloren geht.

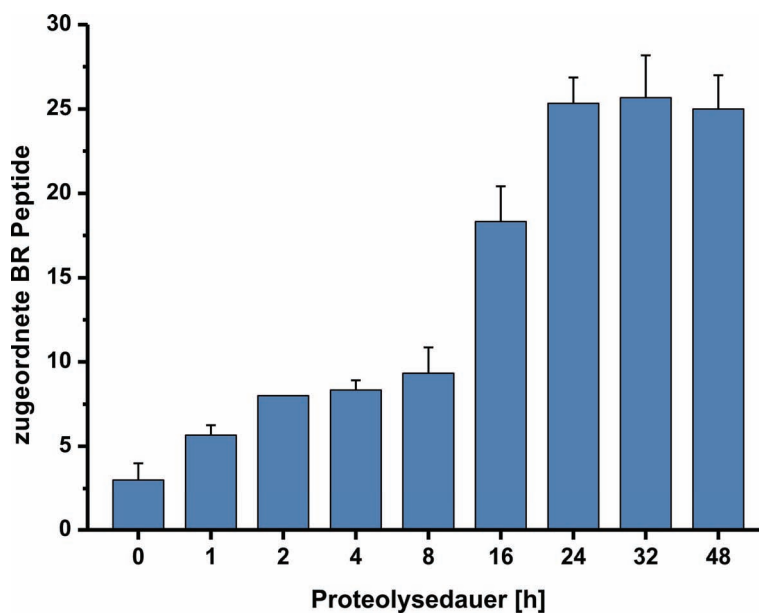


Abb. 4-8: Zeitlicher Verlauf eines Elastase-Verdaus von Bacteriorhodopsin.

Die Proben werden jeweils nach den angegebenen Zeiten aus den identischen Reaktionsgefäßen entnommen. (n=3, 10 ppm Suchgenauigkeit, Suchspezifität AVILTS, min. S/R 20, 1 pmol/µl BR).

4.2.6 Verdau von BR in einem Polyacrylamidgel

Bei allen bisher vorgestellten Ergebnissen handelt es sich um Lösungsverdau, d.h. die Proteine werden, während sie in einem wässrigen Medium gelöst vorliegen, gespalten. Da sich gelelektrophoretische Methoden größter Beliebtheit in der Proteinanalytik erfreuen, soll kurz der Einsatz von Elastase in einem „in Gel“-Verdau evaluiert werden. Bei diesem Verdautyp ist insbesondere auf das Auftreten von Autoproteolyse zu achten, da generell höhere Enzymmengen vorliegen und der Zugang zum Substrat durch die Gelmatrix erschwert ist.

Eine Bande mit 2 pmol Bacteriorhodopsin aus gelelektrophoretisch aufgetrennten Purpurmembranen wird hierzu ausgeschnitten, entfärbt und mit 31,25 ng Elastase über Nacht inkubiert. Diese Enzymmenge hat sich in Vorversuchen als optimal für den Verdau dieser Proteinmenge herausgestellt. Aus dem erhaltenen MS-Spektrum werden 28 Peptide der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz zugewiesen, die eine Sequenzabdeckung von 66,3% ergeben (Abb. 4-9). Unterhalb von 850 m/z ist keine eindeutige Zuordnung der Signale möglich, da das Spektrum dort störende Hintergrundsignale aufweist, die wahrscheinlich auf das Polyacrylamid-Gel und die verwendeten Pufferlösungen zurückzuführen sind. Das Aussehen der Spektren aus Lösungs- und Gelexperimenten ähnelt sich, es werden überwiegend identische Peptide identifiziert und auch die Sequenzabdeckung ist vergleichbar. Lediglich hinsichtlich der einzelnen Peptidintensitäten gibt es einige Unterschiede, die aber auch auf die verschiedenen verwendeten Puffersysteme zurückzuführen sind. Insbesondere zeigen einige Peptide des Carboxyterminus im gelbasierten Experiment sehr intensive Signale (z.B. 1372,66 Da; 1615,70 Da).

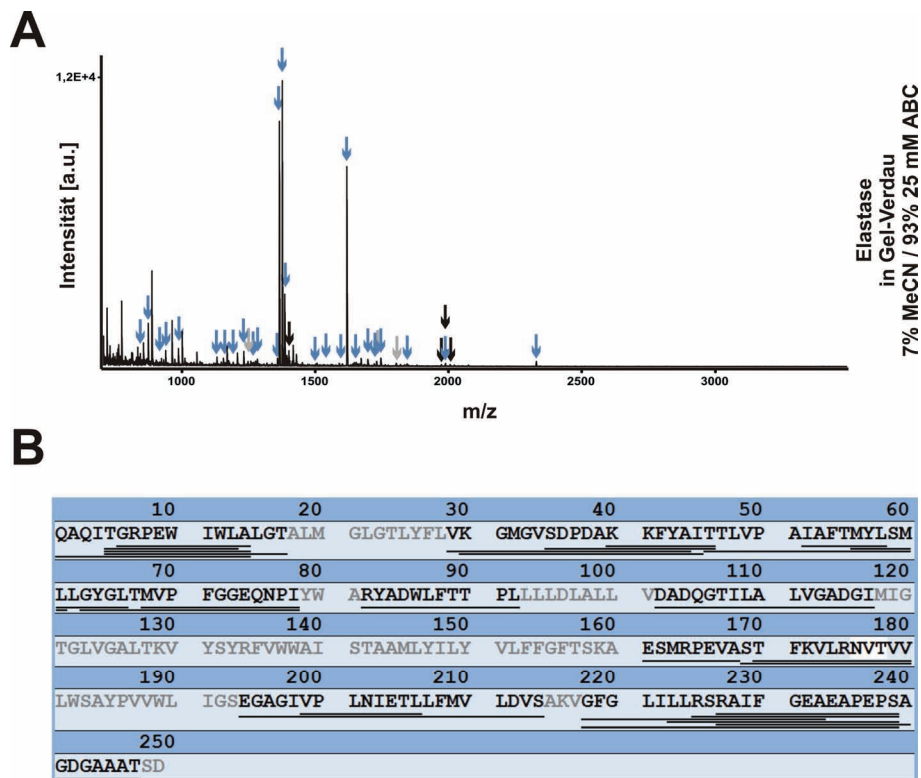


Abb. 4-9: „In Gel“-Verdau von Bacteriorhodopsin mit Elastase.

(A) MALDI-TOF-MS-Spektrum. Eindeutig zugeordnete Signale sind blau markiert. Für die weitere Erklärung der Farbkodierung der markierten Signale siehe Abb. 4-1. (B) Position der durch PMF zugeordneten Peptide in der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz unter Verwendung von Elastase als Protease. (10 ppm Suchgenauigkeit, Suchspezifität AVILTS, min. S/R 10, 2 pmol/μl BR). Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 9-8 aufgeführt.

4.2.7 Messung des BR-Elastase-Verdaus im negativen Reflektormodus

Alle bisher gezeigten Messungen sind im positiven Ionenmodus des MALDI-TOF-Instruments durchgeführt worden. Da es sich bei Bacteriorhodopsin mit einem pI von 4,76 um ein relativ saures Protein handelt, sollten jedoch überwiegend saure Peptide entstehen. Deren freie Carboxylgruppen besitzen eine geringe Protonenaffinität und sollten somit im Negativmodus besser zu detektieren sein. In dieser Analyse wird eine eins-zu-eins-Matrixmischung aus CHCA und CFCA verwendet, welche sich für Messungen in beiden Ionenmodi mit der identischen Probenpräparation als besonders geeignet herausgestellt hat. Auf die Vergleichsmessung im positiven Ionenmodus wird nicht näher eingegangen, sie entspricht weitgehend der in Kap. 4.2.1 dargestellten Methode.

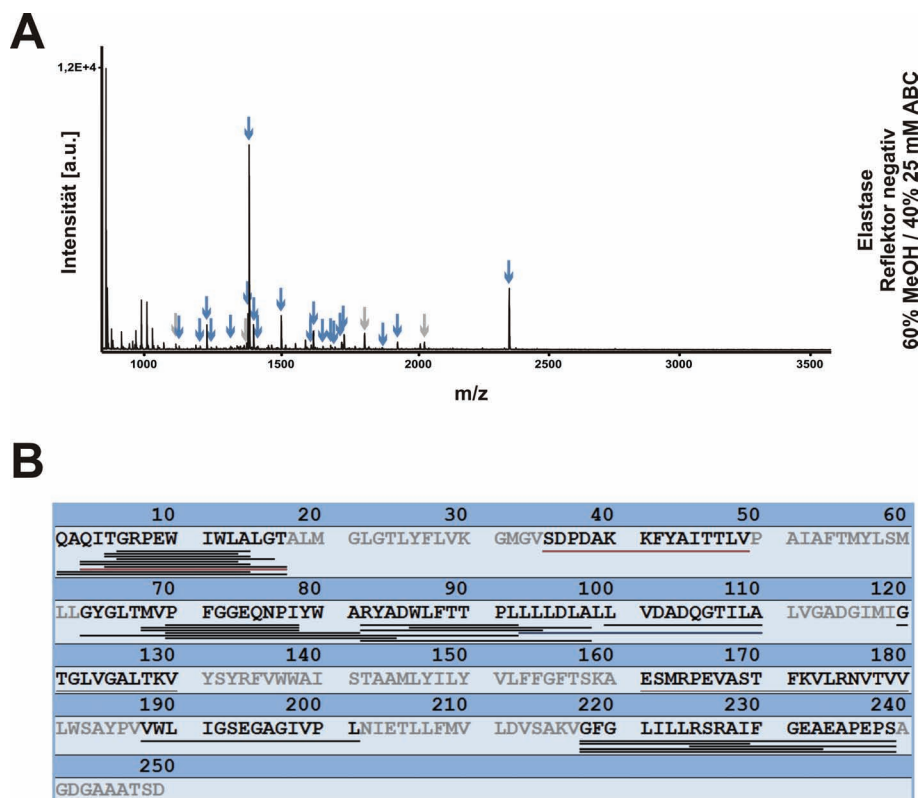


Abb.4-10: Elastase-Verdau von BR bei Detektion im negativen MALDI-TOF-Reflektormodus.

(A) MALDI-TOF-MS-Spektrum im negativen Ionenmodus mit automatischer Signelzuordnung innerhalb 20 ppm. Eindeutig zugeordnete Signale sind blau markiert. Für die weitere Erklärung der Farbkodierung der markierten Signale siehe Abb. 4-1. (B) Position der manuell zugeordneten Peptide in der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz. Schwarze Balken kennzeichnen Peptide die in beiden Reflektormodi, blaue nur im negativen, rote nur im positiven Reflektormodus zu detektieren sind (min. S/R 20, 2 pmol/μl BR). Die identifizierten Peptide im negativen Reflektormodus sind in Tabelle 9-9 aufgeführt.

Aufgrund des Auftretens starker Matrixcluster und der eingeschränkten MS/MS-Fragmentierungsmöglichkeit im negativen Reflektormodus, kann keine ausreichende Kalibration für den Massenbereich unter 1.100 m/z erstellt werden. Es kann keine automatische Zuordnung der Signale zur Proteinsequenz erfolgen, weshalb sie in diesem Versuch komplett manuell vorgenommen wird.

Bei dem Vergleich zwischen den Messungen in beiden Ionenmodi zeigen sich viele Gemeinsamkeiten. Beide Termini sind gut durch Peptidcluster abgedeckt, ebenso der bereits erwähnte Bereich um Arginin 82 (Abb. 4-10). Im Negativmodus tritt ein zusätzliches Peptid auf, dessen Sequenzbereich jedoch auch durch andere Peptide im Positivmodus abgedeckt wird. Folglich wird kein Nettogewinn an Sequenzabdeckung erzielt. Allerdings sind drei Peptide, die bei Messung positiver Ionen deutliche Signale ergeben, negativ nicht nachzuweisen. Es ergibt sich also trotz des überwiegend sauren Substrats kein direkter Vorteil für die Analyse von Bacteriorhodopsin durch die zusätzliche Durchführung einer Messung im negativen Ionenmodus.

4.2.8 Elastase für den Verdau von Nicht-Membranproteinen

Elastase muss nicht zwangsläufig zur Proteolyse von Membranproteinen eingesetzt werden. Auch andere Proteintypen können unter gewissen Voraussetzungen nicht gut für tryptische Verdaus zugänglich sein, so dass der Einsatz von alternativen Enzymen lohnenswert ist. Um dies für Elastase zu evaluieren wird eine Proteolyse des löslichen Proteins Rinderserumalbumin (BSA) mit ihr durchgeführt. Es wird ein übersichtliches MS-Spektrum erhalten, welches deutlich mehr Signale als ein tryptisches Vergleichsspektrum aufweist. Im Sequenzabgleich werden 72 Peptide eindeutig zugeordnet, die 77,7% der BSA-Sequenz entsprechen (Abb. 4-11). Diese hohe Peptidzahl korreliert mit der BSA-Proteingröße von ca. 67 kDa, denn auch bei anderen nicht gezeigten Proteinen beträgt die Peptidzahl bei elastatischer Proteolyse ca. 1 Peptid pro kDa.

Die höchsten Signale im BSA-Spektrum stammen von Peptiden, die zwei oder mehr basische Aminosäuren enthalten (z.B. 1560,82 Da). Wie auch beim Bacteriorhodopsin bilden sich um Bereiche der Proteinsequenz, an denen gehäuft basische Aminosäuren auftreten, bevorzugt Peptidcluster aus. Beispielsweise liefert ein vier basische Aminosäuren enthaltender Bereich am N-Terminus des Proteins zwölf identifizierte Peptide. Eine solche Anhäufung basischer Aminosäuren tritt unter normalen Umständen in tryptischen Verdaus nicht auf, da diese Proteinbereiche zu sehr hydrolysiert werden. So ergeben sich neue Anwendungsmöglichkeiten für Elastase z.B. bei extrem basischen Proteinen.

Trotz der guten Sequenzabdeckung des elastatischen Verdaus sei hier jedoch erwähnt, dass mit Trypsin ein äquivalentes Ergebnis bei einem deutlich weniger komplexen Spektrum erreicht wird. Die Zunahme der Komplexität elastatischer Proben mag bei einem Protein als Substrat noch kein Problem darstellen, wird jedoch bei umfangreicheren Proben offensichtlich.

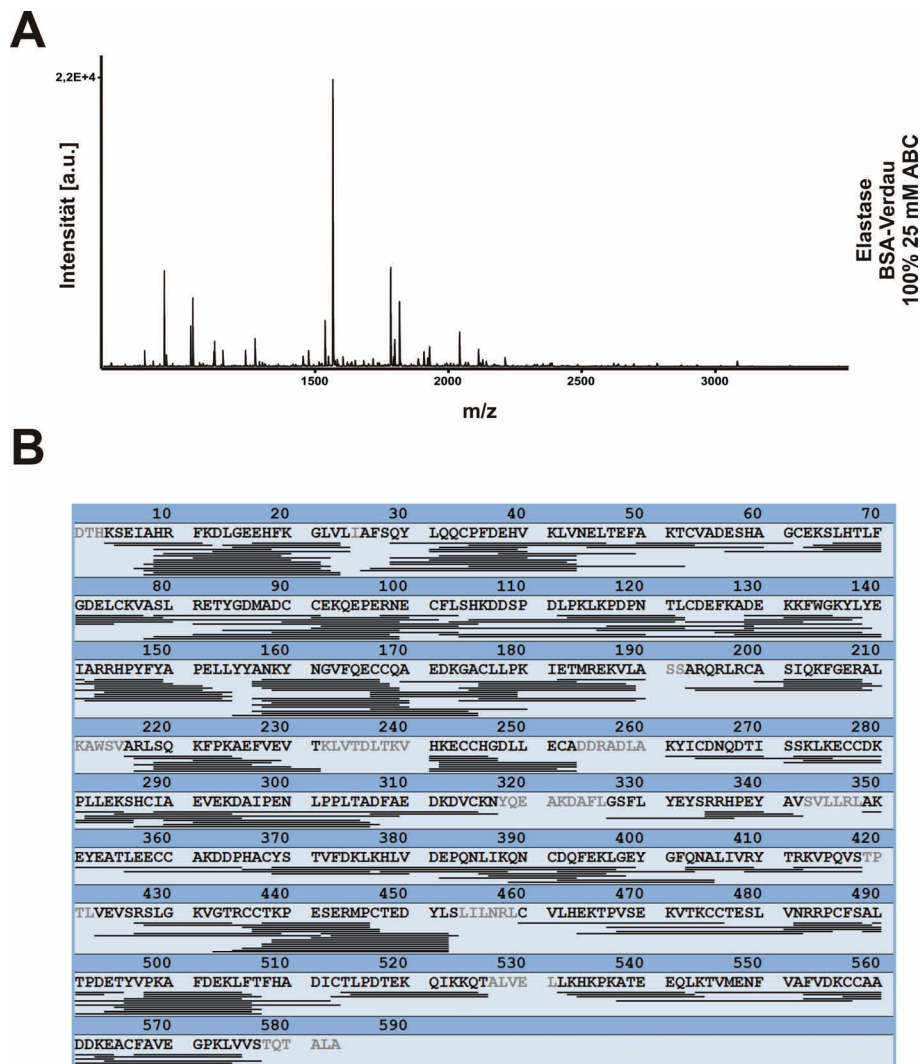


Abb.4-11: Verdau von Rinderserumalbumin mit Elastase.

(A) MALDI-TOF-MS-Spektrum. (B) Position der per PMF zugeordneten Peptide in der BSA-Proteinsequenz unter Verwendung von Elastase als Protease. (20 ppm Suchgenauigkeit, Suchspezifität AVILTS, min. S/R 10, 1 pmol/μl BSA). Auf eine Auswertung des Elastase-Selbstverdaus und die Markierung sämtlicher zugeordneter Signale im Spektrum wird in diesem Versuch aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 9-10 aufgeführt.

4.3 LC/MS-Analyse elastatisch verdauter Membranproteome

4.3.1 1D-nLC-MS/MS

Aus den bisherigen Experimenten zur Charakterisierung der Elastase-Verdaus ist ersichtlich geworden, dass sie aufgrund der verminderten Schnittspezifität im Vergleich zu Trypsin bei identischem Substrat eine deutlich erhöhte Komplexität aufweisen. Um dem entgegen zu kommen, wird eine flüssigchromatographische Trennung auf einer nLC vorgeschaltet.

Zur Etablierung eines nLC-MS/MS-Protokolls werden zwei Membranproteome analysiert, die bereits mehrfach behandelten Purpormembranen und eine Membranfraktion von *Corynebacterium glutamicum*, deren lösliche Anteile bereits durch einen Vorverdau mit Elastase entfernt werden. Die Proben werden auf einem nLC-System aufgetrennt und dann entweder *online* mit ESI vermessen oder für eine nachfolgende *offline*-Messung auf einen MALDI-Probenhalter gespottet. Die MALDI-Messung wird auf einem TOF/TOF-Instrument durchgeführt, für ESI wird ein Orbitrap-Hybridmassenspektrometer verwendet. Um eine Vergleichbarkeit beider Plattformen zu gewährleisten, wird in der Datenbanksuche unabhängig von der erhaltenen Rate an falsch-positiven Identifikationen konstant eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Die Möglichkeit einer Normalisierung auf eine definierte Falschpositivenrate (FPR) wird später diskutiert. Tab. 4-2 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse und Parameter der durchgeführten 1D-nLC-MS/MS-Versuche.

Tab. 4-2: Zusammenfassung der 1D-nLC-MS/MS-Daten.

Aufgeführt sind diverse experimentelle Parameter sowie die Resultate auf Peptid- und Proteinebene.

	Probe				
	PM Trypsin MALDI	PM Elastase MALDI	CGM1698 Elastase MALDI	PM Elastase ESI	CGM1698 Elastase ESI
Technische Replikate	4	6	4	4	3
nLC-Aufbau / Gradient	Agilent HP 1100 / 135 min			Thermo Acc. / 150 min	
Suchspezifität	KR	keine	keine	keine	keine
Datenbank	SP07	SP07	CG07	SP07	CG07
Probenmenge	25 µg	25 µg	200 µg	25 µg	200 µg
Precursor-Genauigkeit	30 ppm	30 ppm	30 ppm	5 ppm	5 ppm
Fragment-Genauigkeit	0,3 Da	0,3 Da	0,3 Da	0,8 Da	0,8 Da
Identity Threshold (Mittelw.)	13,7	32,8	34,2	24,3	25,6
Peptide (Mittelw. ± σ) / Lauf	145 ± 40	229 ± 49	521 ± 100	808 ± 182	1205 ± 143
Peptide gesamt	264	673	1443	1675	2786
davon Transmembranpeptide	20	174	149	604	749
Falschpositivenrate	10,6%	3,3%	2,1%	13,8%	11,9%
Proteine (Mittelw. ± σ) / Lauf	98 ± 19	58 ± 13	155 ± 40	225 ± 38	449 ± 57
Proteine gesamt (min. 1/2 Peptide)	160 / 52	165 / 56	339 / 154	451 / 148	820 / 358
Proteine mit exakt 1 Peptid	108	109	185	303	462
davon mit Peptid kleiner 700 Da	-	-	-	146	190
Decoy DB-Treffer kleiner 700 Da	-	-	-	33,9%	34,4%
BR Mascot Protein Hit Nr.	20	1	-	1	-
BR-Peptide	4	120	-	295	-
BR-Sequenzabdeckung	18,5%	75,1%	-	93,2%	-
BR-Peptidliste	Tab. 9-11A	Tab. 9-11B	-	Tab. 9-11C	-
Proteinliste	Tab. 9-1A	Tab. 9-1B	Tab. 9-1C	Tab. 9-1D	Tab. 9-1E

4.3.2 Vergleich zwischen Trypsin und Elastase am Beispiel PM

Als erstes wird ein Vergleich zwischen Trypsin und Elastase hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit zur Untersuchung von Membranproteomen vorgenommen. Hierzu werden Purpirmembranen mit den Proteasen behandelt und die erhaltene Peptidmischung per nLC-MALDI-MS/MS analysiert. Wegen der erhöhten Komplexität bei einem Verdau mit Elastase werden sechs kumulierte elastatische mit vier tryptischen nLC-Läufen verglichen, um vergleichbare Werte bezüglich der Gesamtzahl identifizierter Proteine zu erhalten. Insgesamt werden in allen Läufen 52 (Trypsin) bzw. 56 (Elastase) unterschiedliche Proteine aus den Purpirmembranen identifiziert, denen mindestens zwei signifikante Peptide zugeordnet werden. Zusätzlich enthält die Probe in beiden Fällen ungefähr die doppelte Menge an Proteinen mit exakt einem zugeordnetem Peptid. Die Zahl dieser sogenannten *One-hit Wonder* ist also in beiden Datensätzen vergleichbar. Beide Enzyme liefern komplementäre Proteindaten, etwa ein Drittel der insgesamt identifizierten Proteine finden sich in beiden Ansätzen wieder. Werden die *One-hit Wonder* in die Auswertung mit einbezogen fällt der überlappende Anteil geringfügig kleiner aus (Abb. 4-12).

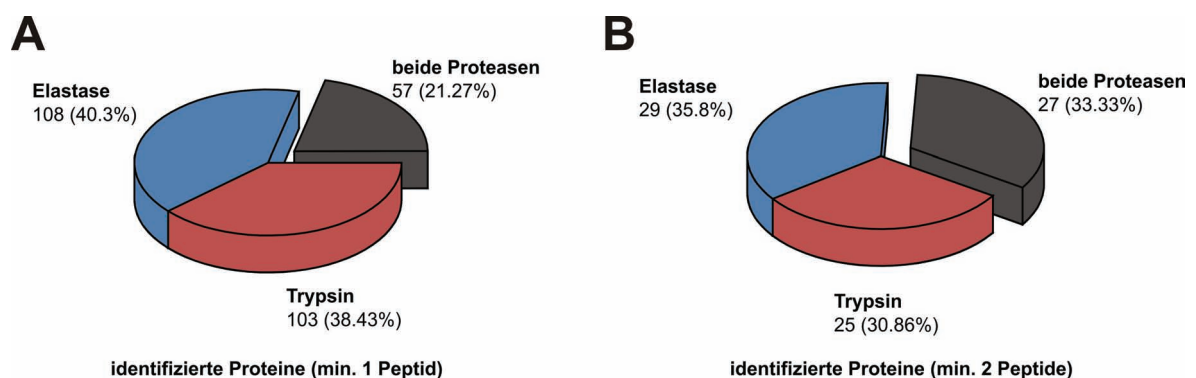


Abb. 4-12: Schnittmengen identifizierter PM-Proteine bei Analyse mit Trypsin und Elastase.

Übersicht der nLC-MALDI-TOF/TOF-Ergebnisse der Purpirmembran-Analyse auf Proteinebene. (A) berücksichtigt alle identifizierten Proteine, (B) nur solche, denen mindestens 2 signifikante Peptide zugeordnet werden.

Auf Peptidebene zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Proteasen, da sich bei vergleichbarer Proteinzahl deutlich mehr Peptide in der elastatischen Probe identifizieren lassen. Der daraus resultierende gesteigerte Peptid-pro-Protein-Quotient stellt ein deutliches Plus an Information dar. Dieser Effekt ist bei hoch abundanten Proteinen am auffälligsten, so werden im Elastase-Verdau 54 Peptide der Dipeptid-bindenden Untereinheit des ABC-Transporters DppA identifiziert. Im tryptischen Verdau sind es nur acht Peptide, die in diesem Fall sogar den Maximalwert für die einem Protein zugeordneten Peptide darstellen. Es ergeben sich somit durch Elastase bessere Charakterisierungsmöglichkeiten für die betreffenden Proteine.

Neben der generell gesteigerten Peptidzahl weist der Elastase-Verdau auch einen deutlich erhöhten Anteil an Peptiden auf, die aus den vorhergesagten Transmembranbereichen von Membranproteinen stammen. Dadurch wird deren Identifizierung erleichtert, da nun aus dem gesamten Sequenzbereich des Proteins Peptidinformation generiert werden kann. Dies sei exemplarisch am Modellprotein Bacteriorhodopsin verdeutlicht. Da es eindeutiger Hauptbestandteil der Purpurmembranen ist, sollte es bei einer Datenbanksuche den ersten Platz in der Proteinrangliste innehaben. Bei der tryptischen Analyse der Probe ist dies jedoch nicht der Fall, hier findet sich Bacteriorhodopsin nur an Position 20 wieder. Es werden lediglich vier tryptische Peptide identifiziert, die zusammen in 18,5% Sequenzabdeckung resultieren. Sie stammen alle aus den hydrophilen Schleifenregionen des Proteins und ragen nur zu sehr geringem Teil in die Transmembranbereiche hinein (Abb. 4-13).

A

10	20	30	40	50	60
QAQITGRPEW	IWLALGTALM	GLGTLYFLVK	GMGVSDPDAK	KFYAITTLVP	AIAFTMYLSM
70	80	90	100	110	120
LLGYGLTMVP	FGGEQNPIYW	ARYADWLFTT	PLLLDLALL	VDADQGTILA	LVGADGIMIG
130	140	150	160	170	180
TGLVGALTKV	YSYRFVWAI	STAAMLYILY	VLEFFGFTSKA	<u>ESMRPEVAST</u>	<u>FKVLRNVTVV</u>
190	200	210	220	230	240
LWSAYPVVWL	IGSEGAGIVP	LNIEITLLEFMV	LDVSARVGF	LILLRSRAIF	GEAEAPEPSA
250					
<u>GDGAAATSD</u>					



B

10	20	30	40	50	60
QAQITGRPEW	IWLALGTALM	GLGTLYFLVK	GMGVSDPDAK	KFYAITTLVP	AIAFTMYLSM
70	80	90	100	110	120
LLGYGLTMVP	FGGEQNPIYW	ARYADWLFTT	PLLLDLALL	VDADQGTILA	LVGADGIMIG
130	140	150	160	170	180
TGLVGALTKV	YSYRFVWAI	STAAMLYILY	VLEFFGFTSKA	<u>ESMRPEVAST</u>	<u>FKVLRNVTVV</u>
190	200	210	220	230	240
LWSAYPVVWL	IGSEGAGIVP	LNIEITLLEFMV	LDVSARVGF	LILLRSRAIF	GEAEAPEPSA
250					
<u>GDGAAATSD</u>					

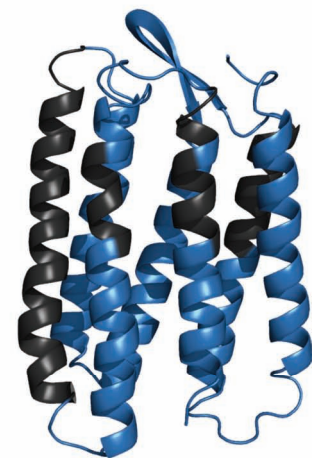


Abb. 4-13: Sequenzabdeckung von BR im nLC-MS/MS-Vergleich zwischen Trypsin und Elastase.

Position der identifizierten Peptide in der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz unter Verwendung von Trypsin (A) oder Elastase (B) als Protease. Zusätzlich sind die Peptidbereiche in den 3D-Sekundärstrukturmodellen für Trypsin (rot) und Elastase (blau) hervorgehoben. Das Modell ist zur besseren Übersicht im Vergleich zu Abb. 4-2 um 180° gedreht (3D-Strukturmodelle siehe Tab. 3-10).

Im Gegensatz zu Trypsin erfolgt mit Elastase ein umfassender Verdau des Proteins. Es werden 120 elastatische Peptide detektiert, die von 75,1% der Proteinsequenz stammen. Lediglich von Helix E (Aminosäure-Positionen 135-154) sind keine Peptide nachzuweisen, ansonsten sind von allen anderen Helices größere Sequenzabschnitte durch Peptide abgedeckt. Analog zu den PMF-Experimenten (Kap. 4.2.1) ist auch bei MS/MS-basierter Analyse verstärkt die Bildung von Peptidclustern zu sehen. Neben den Termini und dem bereits erwähnten Bereich um Arginin 82 treten auch weitere kleinere Peptidgruppen auf, so z.B. in der cytoplasmatischen Schleife zwischen den Helices A und B (Aminosäure-Positionen 30-43). Während sich die vorgeschaltete nLC-Trennung also durchaus positiv auf die erhaltenen Elastase-Ergebnisse auswirkt, gilt dies nicht für das tryptische Experiment. Hier sind nur vier signifikante Bacteriorhodopsin-Peptide vorhanden, während im PMF-Experiment noch neun Signale zugeordnet worden sind. Dies entspräche auch in etwa dem theoretisch maximal zu erwartenden Wert, da unter Annahme tryptischer Spezifität bei maximal zwei überlesenen Schnittstellen in den Massenbereich zwischen 700 und 3.500 Da genau elf Bacteriorhodopsin-Peptide fallen. Daran wird noch einmal ein Hauptproblem tryptischer Analysen bei Membranproteinen deutlich. Zu wenig potentielle Schnittstellen führen zu überlangen, schwer detektierbaren Peptiden.

4.3.3 Membranproteomanalyse mittels nLC-MALDI- und nLC-ESI-MS/MS

Neben dem Vergleich der beiden Proteasen steht die nLC-MS/MS-Analyse zweier Membranproteome, den Membranfraktionen von *Halobacterium salinarium* und *Corynebacterium glutamicum* im Vordergrund. Da mit den *Corynebacterium*-Membranen erstmals eine Membranprobe mit einer komplexen Proteinverteilung per Elastase-Verdau analysiert wird, findet zunächst eine grobe Überprüfung der enzymatischen Aktivität über den gewählten Verdauzeitraum statt. Die Probe wird hierzu nach mehreren Inkubationszeitpunkten gelelektrophoretisch aufgetrennt und überprüft, ob sich das Proteinmuster noch proteolysebedingt ändert (Abb. 4-14). Der Verdau ist nach 24 h abgeschlossen, somit decken sich die Ergebnisse mit der PMF-basierten Analyse der Verdauzeit (Kap. 4.2.5). Nach diesem Zeitraum liegen fast keine hochmolekularen Komponenten mehr vor und der Großteil der Probe besteht aus Peptiden, die kleiner als 10 kDa sind. Eine Verdauzeit von mindestens 24 h ist zwingend notwendig, da der Verdau bei früheren Probenentnahmen noch sehr unvollständig erscheint.

Die massenspektrometrische Messung der Proben geschieht auf zwei unterschiedlichen Systemen, einem *online* nLC-gekoppelten ESI-Orbitrap-Instrument sowie *offline* über MALDI-*Spotting*. Das ESI-Gerät zeichnet grundsätzlich mehr MS/MS-Spektren als das MALDI-TOF/TOF auf, allerdings führen nur 12,8% der ESI-Spektren zu einer signifikanten Peptid-Identifikation. Auf der MALDI-Plattform fällt dieser Anteil höher aus und beträgt 27,9%. Trotz der geringeren Spektrenausbeute werden allerdings deutlich mehr Peptide und Proteine vom ESI-Aufbau identifiziert, obwohl bei der Gesamtanalyse beider Proben sogar weniger Einzelläufe zur Auswertung herangezogen werden (Tab. 4-2). Auch bei der Betrachtung einzelner nLC-Läufe liefert ESI durchweg um den Faktor 2 bis 3 höhere Werte.

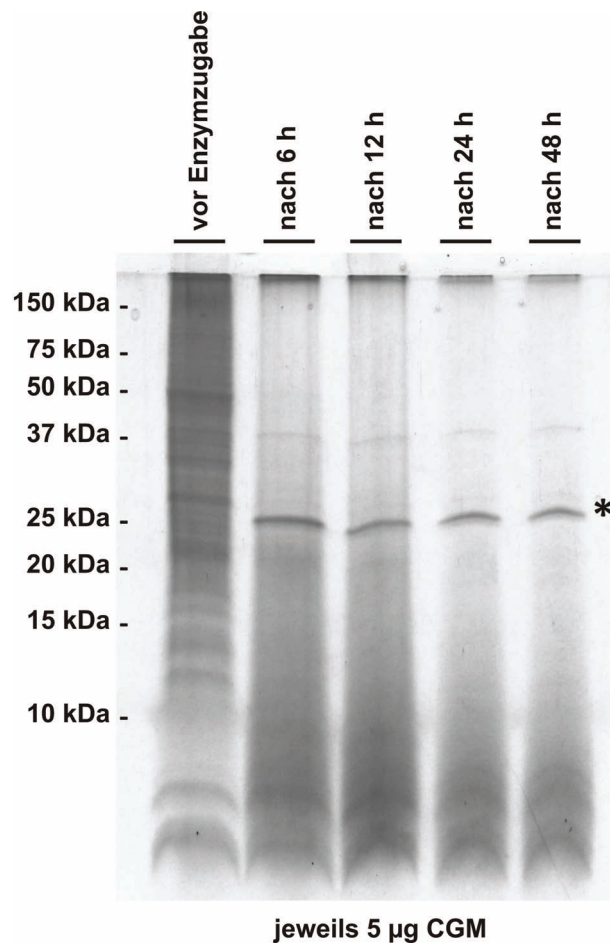


Abb. 4-14: Darstellung des zeitlichen Verlaufs eines elastatischen CGM-Verdaus im Gel.

Tris-Tricin-Gel 16%T, 3%C mit 5 µg CGM1698 pro Spur, kolloidale Coomassiefärbung. Darstellung der Probe vor Enzymzugabe und nach jeweils 6, 12, 24 und 48 Stunden Verdauezeit. Die Elastase-Proteinbande ist mit einem Sternchen (*) markiert.

Viele ESI-Peptide liegen im Massenbereich unter 700 Da, der unter Normalbedingungen nicht mit MALDI untersucht wird. Allein die Hälfte aller *One-hit Wonder* wird durch solche kleinen Peptide verursacht. (Tab. 4-2). Weiterhin zeigt sich, dass die ESI-Experimente bei gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit in der Datenbanksuche deutlich mehr Treffer beim Abgleich gegen die *Decoy*-Datenbank erzeugen. Auch hierfür sind größtenteils die kleinen Peptide verantwortlich. Neben den kleinen Peptiden führen auch die verhältnismäßig geringen Anforderungen an die MS/MS-Fragmentspektren-Qualität bei ESI-Orbitrap-Datenbanksuchen zu höheren Peptid- und Proteinzahlen. Die hohe *Precursor*-Genauigkeit des Orbitrap-Massenanalysators führt bei vielen recht überschaubaren ESI-Fragmentspektren zu signifikanten Treffern, während entsprechende MALDI-Spektren hierfür deutlich hochwertigere Informationen liefern müssen.

Eine Anpassung der Irrtumswahrscheinlichkeit durch die Normalisierung beider Datensätze auf eine identische Falschpositivenrate lässt den Vorsprung der ESI-Plattform schrumpfen. Durch diese häufig angewandte Maßnahme sinken die Peptid- und Proteinzahlen in der Analyse der Purpurmembranen auf 742/49 (MALDI: 673/56) und für die *Corynebacterium*-Membranen auf 1279/136 (MALDI: 1443/154). Die mit MALDI und ESI erzielbaren Resultate befinden sich dann auf einem vergleichbaren Niveau.

Hinsichtlich der Komplementarität der Protein-Ergebnisse beider Plattformen ergibt sich ein Bild ähnlich dem Protease-Vergleich. Bei beiden untersuchten Proben ist der Anteil an Proteinen, die mit beiden Instrumenten identifiziert werden, mit ca. 20% eher gering, gleichgültig ob *One-hit Wonder* berücksichtigt werden oder nicht (Abb. 4-15). Trotz der generell besseren ESI-Ergebnisse liefert der MALDI-Ansatz also ausreichend zusätzliche Informationen über die untersuchte Probe.

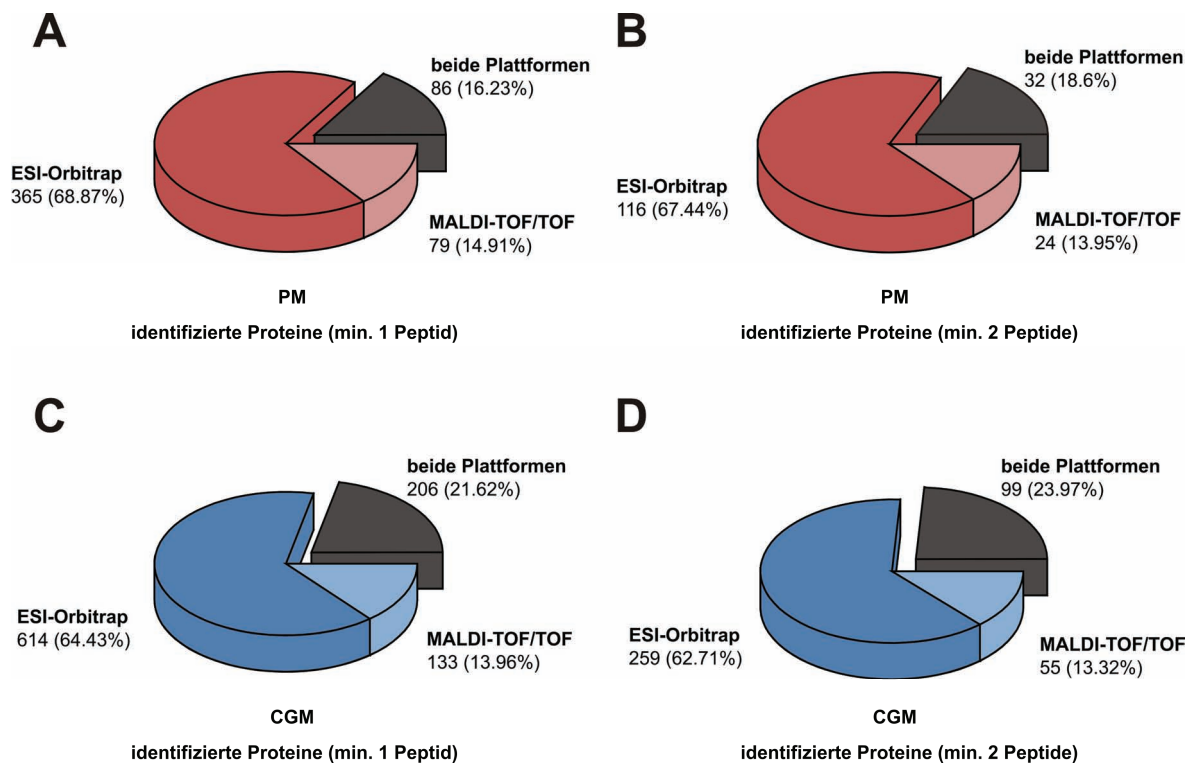


Abb. 4-15: Schnittmengen identifizierter PM- und CGM-Proteine bei Analyse mit ESI und MALDI.

Übersicht der nLC-MS/MS-Ergebnisse auf Proteinebene bei der Analyse von Purpormembranen (A,B) und der *Corynebacterium glutamicum*-Membranen (C,D). (A) und (C) berücksichtigen alle identifizierten Proteine, (B) und (D) nur solche, denen mindestens zwei signifikante Peptide zugeordnet werden können.

Auch vom Modell-Membranprotein Bacteriorhodopsin werden durch die Verwendung von nLC-ESI mehr Peptide identifiziert. Insgesamt 295 ESI-Peptide decken 93,2% der Proteinsequenz ab (Abb. 4-16). Es sind sogar einige Peptide aus Helix E nachzuweisen, von der im entsprechenden MALDI-Experiment keine Peptide detektierbar sind. Allerdings stammen aus diesem Bereich des Proteins mit Abstand die wenigsten Peptide, was immer noch auf die schwere Zugänglichkeit dieser Region für die verwendeten analytischen Methoden hindeutet. Der einzige Sequenzbereich, der exklusiv mit MALDI und nicht mit ESI abgedeckt werden kann, umfasst die letzten neun Aminosäuren des Proteins. Neben Bacteriorhodopsin werden in den elastischen Verdaus der Purpormembranen noch weitere Membranproteine identifiziert. Auf eine detailliertere Beschreibung der zusätzlich nachgewiesenen Proteine wird innerhalb der Ergebnisse weitgehend verzichtet, weitere Informationen sind übersichtlich aus den Tabellen des Anhangs zu entnehmen (Tab. 9-1A-E).

10	20	30	40	50	60
QAQITGRPEW	IWLALGTALM	GLGTLYFLVK	GMGVSDPDAK	KFYAITTLVP	AIAFTMYLSM
70	80	90	100	110	120
LLGYGLTMVP	FGGEQNPIYW	ARYADWLFTT	PLLLLDLALL	VDADQGTILA	LVGADGIMIG
130	140	150	160	170	180
TGLVGALTKV	YSYRFVWVAI	STAAMLYILY	VLFFGFSTKA	ESMRPEVAST	FKVLRNVTVV
190	200	210	220	230	240
LWSAYPVVWL	IGSEGAGIVP	LNIE TL LFMV	LDVSAKVGFG	LILLRSRAIF	GEAEPEPSA
250	GDGAAATSD				

Abb.4-16: Sequenzabdeckung von Bacteriorhodopsin mit nLC-ESI-Orbitrap-MS/MS.

Position der identifizierten nLC-ESI-Peptide in der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz bei der Verwendung von Elastase als proteolytisches Enzym. Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 9-11C aufgeführt.

4.3.4 Physikochemischer Vergleich von MALDI-TOF/TOF und ESI-Orbitrap

Der pI und der GRAVY-Score stellen gängige Charakteristika zur physikochemischen Analyse von Peptiden dar. Da mit ESI und MALDI zwei verschiedene Ionisationsprozesse vorliegen führt dies zwangsläufig zur Detektion unterschiedlicher Peptide. Auf den ersten Blick zeigt sich bei der Betrachtung der Hydrophobizitätsplots, dass im ESI-Experiment deutlich mehr, überwiegend kleine, stark hydrophobe Peptide identifiziert werden (Abb. 4-17AB, Abb. 4-18B). Dies liegt zum Teil am bereits erwähnten erweiterten Massenbereich des ESI-Instruments, aber nicht ausschließlich, da auch im Bereich über 700 Da zahlreiche stark hydrophobe Peptide vorliegen. In den hydrophileren Bereichen sind hingegen keine größeren Unterschiede auszumachen, hier befinden sich ähnlich viele Peptide.

Hinsichtlich der pI-Verteilung unterscheiden sich beide Ionisationstechniken deutlich. Am alkalischen Ende des pI-Spektrums findet eine Diskriminierung zugunsten von MALDI statt. Basische Peptide machen hier einen nahezu doppelt so großen Anteil aus. Im Falle tryptischer Proteolyse liegt er, bedingt durch den obligatorisch basischen Carboxyterminus der Peptide, sogar noch höher (Abb. 4-18C). ESI hingegen bevorzugt stark saure Peptide mit einem pI kleiner als 3 (Abb. 4-17CD). Diese sind überwiegend im mittleren Massenbereich angesiedelt, so dass die Einschränkung des MALDI-Massenbereiches hierfür keine Rolle spielt. Der Gesamtanteil an sauren Peptiden ist allerdings für beide Instrumente mit ca. 45% nahezu identisch (Abb. 4-18C). Den auffälligsten Unterschied gibt es bei den Neutralpeptiden, welche sich noch einmal in zwei Untergruppen einordnen lassen. Die erste Gruppe umfasst Neutralpeptide, die eine ausgeglichene Anzahl an sauren und basischen Seitenketten enthalten und dadurch in Summe nach außen hin als neutral erscheinen. Neben diesen Neutralpeptiden existieren aber auch weitere, die ausschließlich aus aliphatischen und ungeladenen Aminosäuren bestehen und keine zusätzlichen protonierbaren Funktionen besitzen. Gerade diese sind in den elastatischen MALDI-Experimenten signifikant unterrepräsentiert (Abb. 4-18C). In tryptischen Verdaus können solche Peptide nur in Ausnahmefällen, durch die Freisetzung eines aliphatischen C-Terminus entstehen.

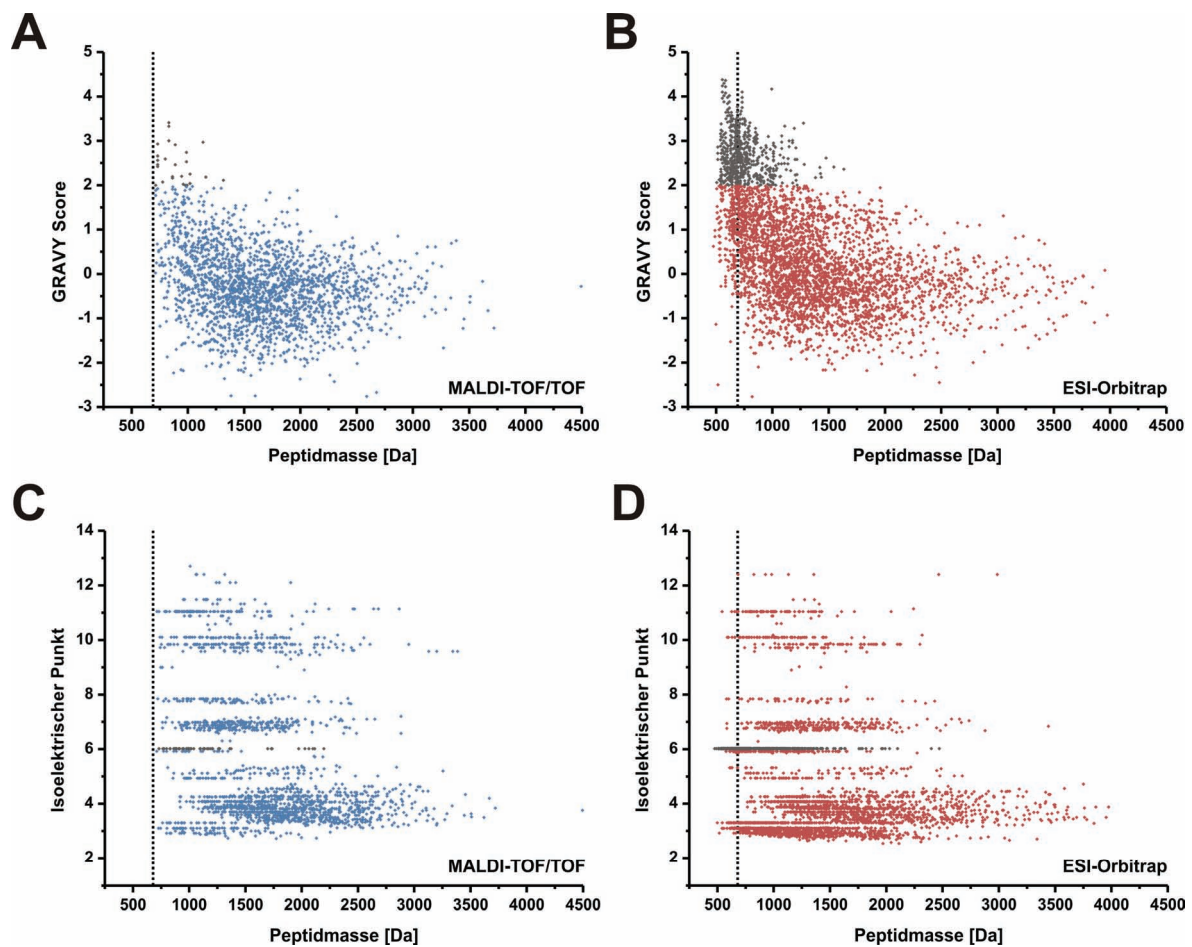


Abb.4-17: GRAVY und pI-Verteilung elastatischer Purpurmembran und *C. glutamicum*-Peptide.

Hydrophobizitätsplot über den Massenbereich für die elastatischen nLC-MALDI- (A) und nLC-ESI-MS/MS-Experimente (B). Stark hydrophobe Peptide mit einem GRAVY-Score größer als 2 sind schwarz gekennzeichnet. Analoge Übersicht der isoelektrischen Punkte der MALDI- (C) und ESI-Peptide (D). Strikt aliphatische Peptide ohne geladene Seitenketten sind grau hervorgehoben. Die 700 Da-Grenze wird durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Bedingt durch ihre hydrophobe Natur sind es aber gerade diese aliphatischen Neutralpeptide, die einen Großteil der potentiellen Transmembran-Peptide ausmachen. Fast drei Viertel der mit ESI identifizierten Transmembran-Peptide fallen in diese Gruppe (Abb. 4-18D). Bei MALDI machen sie nur einen Bruchteil aus, dementsprechend niedriger fällt auch die Gesamtzahl gefundener Transmembran-Peptide aus. Trypsische Proben stellen hier das Extrem dar, denn in ihnen befinden sich keine aliphatischen Neutralpeptide und folglich nahezu keine Peptide aus den Helixregionen. Aus der minimalen Helixlänge

von 17 Aminosäuren und den erhaltenen Längen elastischer Transmembran-Peptide lässt sich ableiten, dass zumindest eine teilweise Zugänglichkeit des Enzyms zu den Membranhelices der Proteine vorliegen muss. An der gesteigerten Zahl identifizierter Transmembran-Peptide in den ESI-Experimenten ist erneut der erweiterte Massenbereich mit verantwortlich. Während sich insgesamt nur ca. 20% der Peptide im Massenintervall zwischen 500 und 700 Da befinden, machen sie einen höheren Prozentsatz innerhalb der Transmembran-Peptide aus (Abb. 4-18AE). Die hydrophoben Helixbereiche besitzen vermehrt elastische Schnittmöglichkeiten, was im Vergleich zu den hydrophileren Bereichen zu kürzeren Peptiden aus diesen Regionen führt.

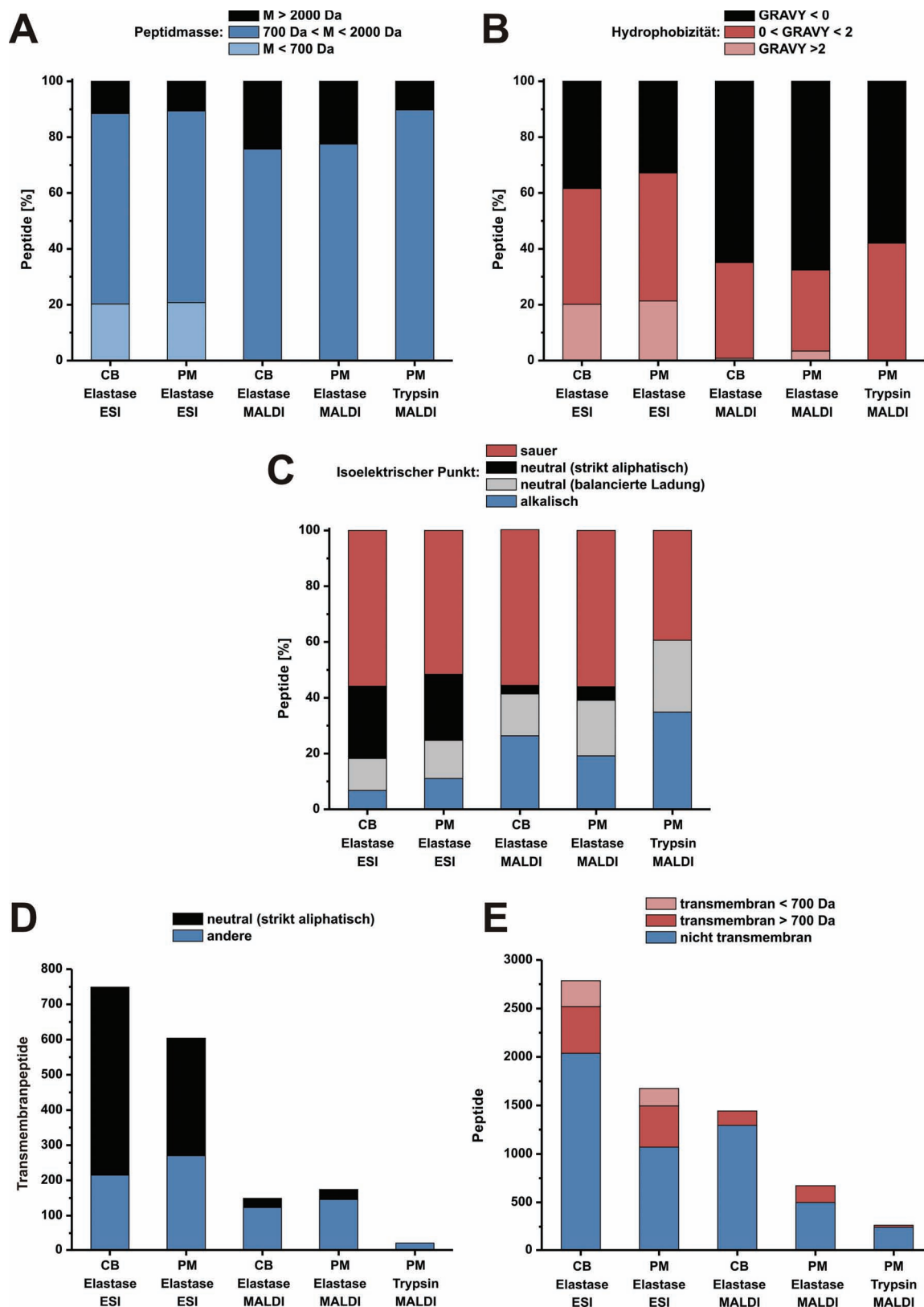


Abb.4-18: Physikochemische Statistik der elastatischen nLC-MS/MS-Experimente.

Relative Zugehörigkeit der Peptide in drei Massenbereiche (A), GRAVY-Score-Intervalle (B) und pI-Bereiche (C). Hier erfolgt eine zusätzliche Unterteilung der Neutralpeptide. (D) Anteil der Neutralpeptide an den Transmembranpeptiden. (E) Anteil der Transmembranpeptide an der Gesamtpeptidzahl mit Unterscheidung größer/kleiner 700 Da.

Welchen Vorteil die Möglichkeit der Identifikation eines Proteins über die Helixbereiche haben kann, wird nicht nur bei der Charakterisierung des Bacteriorhodopsins deutlich (Kap. 4.3.2). Bei vielen Membranproteinen machen die Helices einen großen Anteil der Proteinsequenz aus und gerade diese waren mit den bisherigen Methoden nur schwer zu analysieren. Bei der *Corynebacterium* Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 1 (COX1) sind 45,2% der Proteinsequenz vorhergesagte Transmembran-Helices. Von den insgesamt 21 signifikant identifizierten Peptiden des Proteins bei der nLC-MALDI-Analyse überlappen 13 mit den Transmembran-Bereichen und das überwiegend mit größeren Sequenzanteilen (Abb. 4-19). Ohne diese Peptide wäre die erhaltene Information über ein so großes Protein relativ gering, obwohl es sich bei COX1 mit großer Wahrscheinlichkeit um eines der abundanteren Proteine in der Probe handelt.

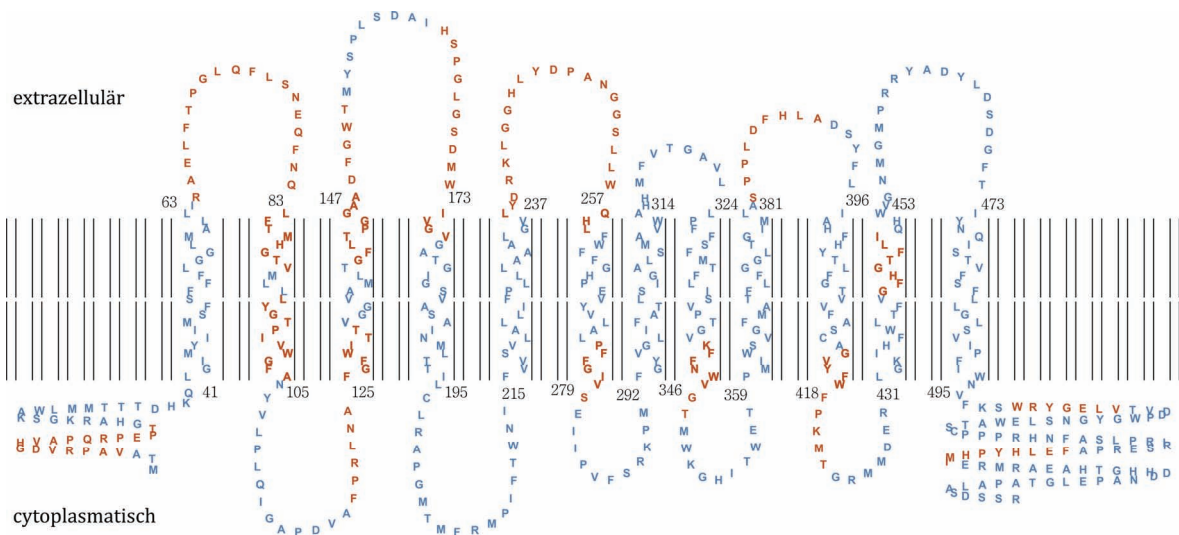


Abb.4-19: Vorhergesagtes Sekundärstruktur-Modell der *C. glutamicum* Cytochrom c-Oxidase I.

Die Proteinsequenz mit den Aminosäuren und ihrer Lokalisation in der Membran ist schematisch dargestellt. Aus den roten Bereichen der Sequenz werden Peptide identifiziert, in den Transmembran-Regionen sind sie zusätzlich fett hervorgehoben. Eine Übersicht der einzelnen Peptide liefert Tabelle 9-12.

4.3.5 Reproduzierbarkeit der nLC-Versuche

Da für ein Experiment jeweils mehrere technische Replikate angefertigt werden, muss sichergestellt sein, dass die Reproduzierbarkeit des analytischen Verfahrens gegeben ist. Dies kann durch einen Vergleich der *Base Peak*-Chromatogramme (BPC) geschehen, in welchen die maximale Spektrenintensität gegen die Fraktionsnummer aufgetragen ist. Vergleicht man zwei nLC-Einzelläufe, die am gleichen Tag durchgeführt werden, so zeigen beide Chromatogramme einen fast identischen Verlauf (Abb. 4-20A). Dies schlägt sich auch in den aus entsprechenden Datenbanksuchen erhaltenen Peptid- und Proteinzahlen nieder, die nahezu identisch sind.

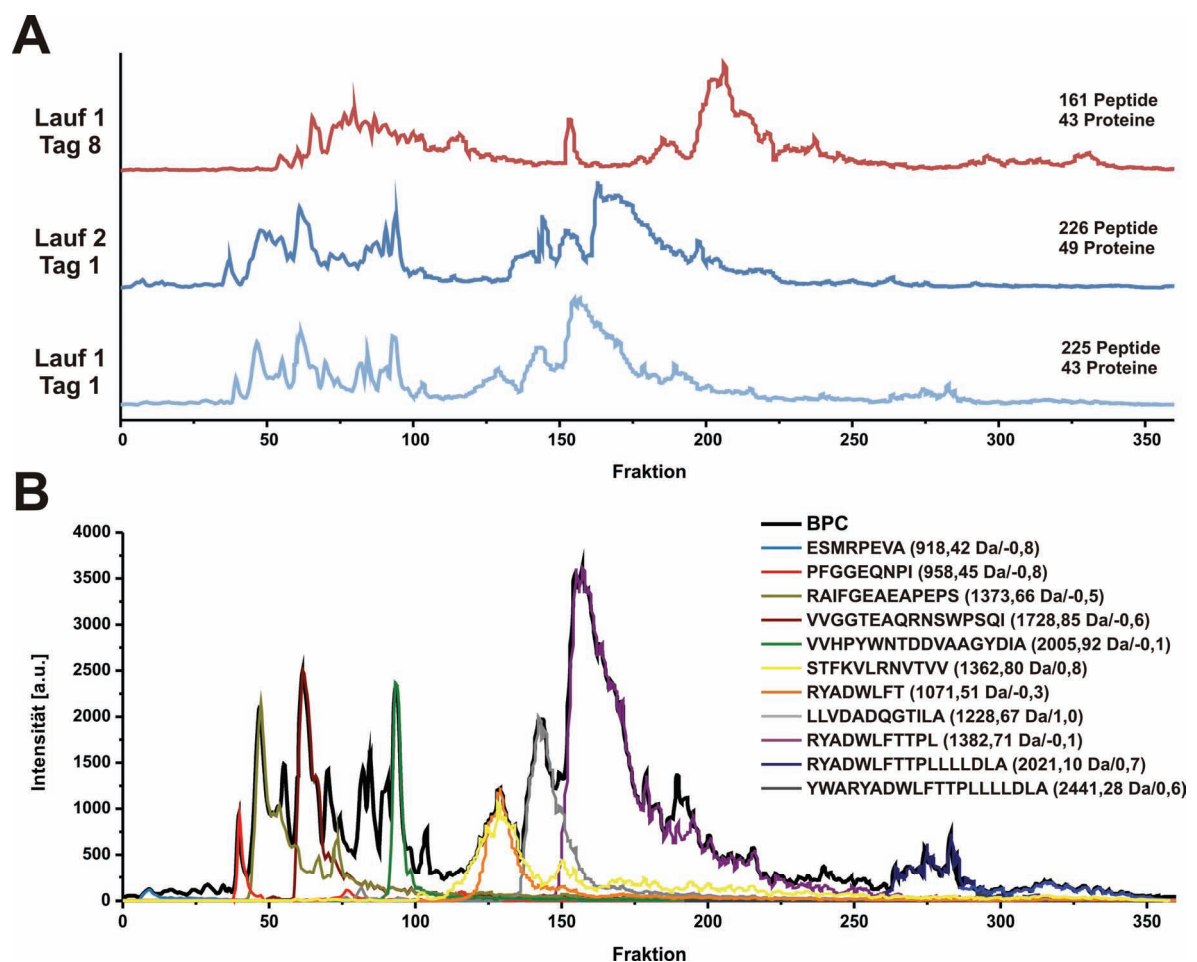


Abb.4-20: Chromatogramme der nLC-Auftrennung.

(A) *Base Peak*-Chromatogramme dreier nLC-Einzelläufe und die jeweils zugehörigen Peptid- und Proteinzahlen. (B) *Base Peak*-Chromatogramm plus *Extracted Ion*-Chromatogramme (XIC) von neun Bacteriorhodopsin- und zwei Elastase-Peptiden (1728,85 Da und 2005,92 Da) aus Lauf 1 des ersten Tages. Neben den Peptidsequenzen und –massen sind auch die GRAVY-Scores angegeben.

Ein sieben Tage später durchgeführter Lauf zeigt deutliche Alterungserscheinungen des chromatographischen Systems. Die Retentionszeiten sind erhöht und der Chromatographieverlauf erscheint gedehnt. Auch die Gesamtperformance auf Peptidebene ist deutlich geringer, obgleich sich die Zahl identifizierter Proteine nicht maßgeblich ändert. Bei einer genaueren Betrachtung der Elution einiger Peptide fällt auf, dass sie ein unterschiedliches Verhalten zeigen, welches durch ihre physikochemischen Eigenschaften bestimmt wird. Hydrophobe Peptide mit positiven GRAVY-Scores neigen zu exzessivem *Tailing*, bei manchen werden auch *Fronting*-Effekte beobachtet (Abb. 4-20B). Da solche „problematischen“ Peptide vornehmlich bei höheren Acetonitril-Konzentrationen eluieren, ergibt sich für den Anfangsverlauf des Gradienten das Bild einer scharfen Trennung, während sie später unsauberer verläuft. Neben den hydrophoben Peptiden neigen auch die hochabundanten Peptide aus dem Bereich um Arginin 82 (Abb.4-3A) zu *Tailing*, was aber eher auf ein Überladen der Säule zurückzuführen ist.

4.3.6 Spezifitätsanalyse pankreatischer Elastase

Insgesamt werden bei den nLC-MALDI- und nLC-ESI-MS/MS-Analysen 6.577 elastatische Peptide signifikant in beiden Proben identifiziert. Die Auswertung sämtlicher aufgetretener Schnitte ergibt, dass Elastase zu ca. 82% nach den kleinen hydrophoben Aminosäuren Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, sowie den kleinen polaren Aminosäuren Threonin und Serin schneidet (Abb. 4-21AB). Eventuell sind auch die Schnitte nach Glycin zur elastatischen Spezifität hinzuzurechnen, da hier zwar insgesamt weniger, aber deutlich häufiger als nach allen anderen Aminosäuren gespalten wird. Wird zusätzlich die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Aminosäuren in beiden untersuchten Organismen berücksichtigt, sinkt der Prozentsatz für spezifische Schnitte auf 69%, da es sich bei Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Threonin und Serin um relativ abundante Aminosäuren handelt.

Erweiterte Spezifitätsanalysen, die neben der AS direkt vor der Schnittstelle (P_1) auch die nachfolgende (P_1') oder zweitletzte (P_2) einbeziehen, zeigen weitere Merkmale elastatischer Spezifität (Abb. 4-21C-F). So wird, wie auch von anderen Proteasen bekannt, nahezu nie ein Peptid freigesetzt, wenn sich Prolin unmittelbar nach der zu hydrolysierenden Bindung befindet. Allerdings scheint die starre Prolin-Struktur für Spaltungen förderlich zu sein, wenn diese zwei Aminosäure-Positionen später erfolgen. Histidin, Asparaginsäure und Cystein zeigen ein spaltungshemmendes Verhalten in P_2 -Stellung, wobei Cystein sogar in jeder der drei untersuchten Aminosäure-Positionen einen Schnitt verhindert. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass Cystein mit Abstand die seltenste Aminosäure in den untersuchten Proteinen darstellt und somit diese Daten nicht vollständig statistisch abgesichert sind.

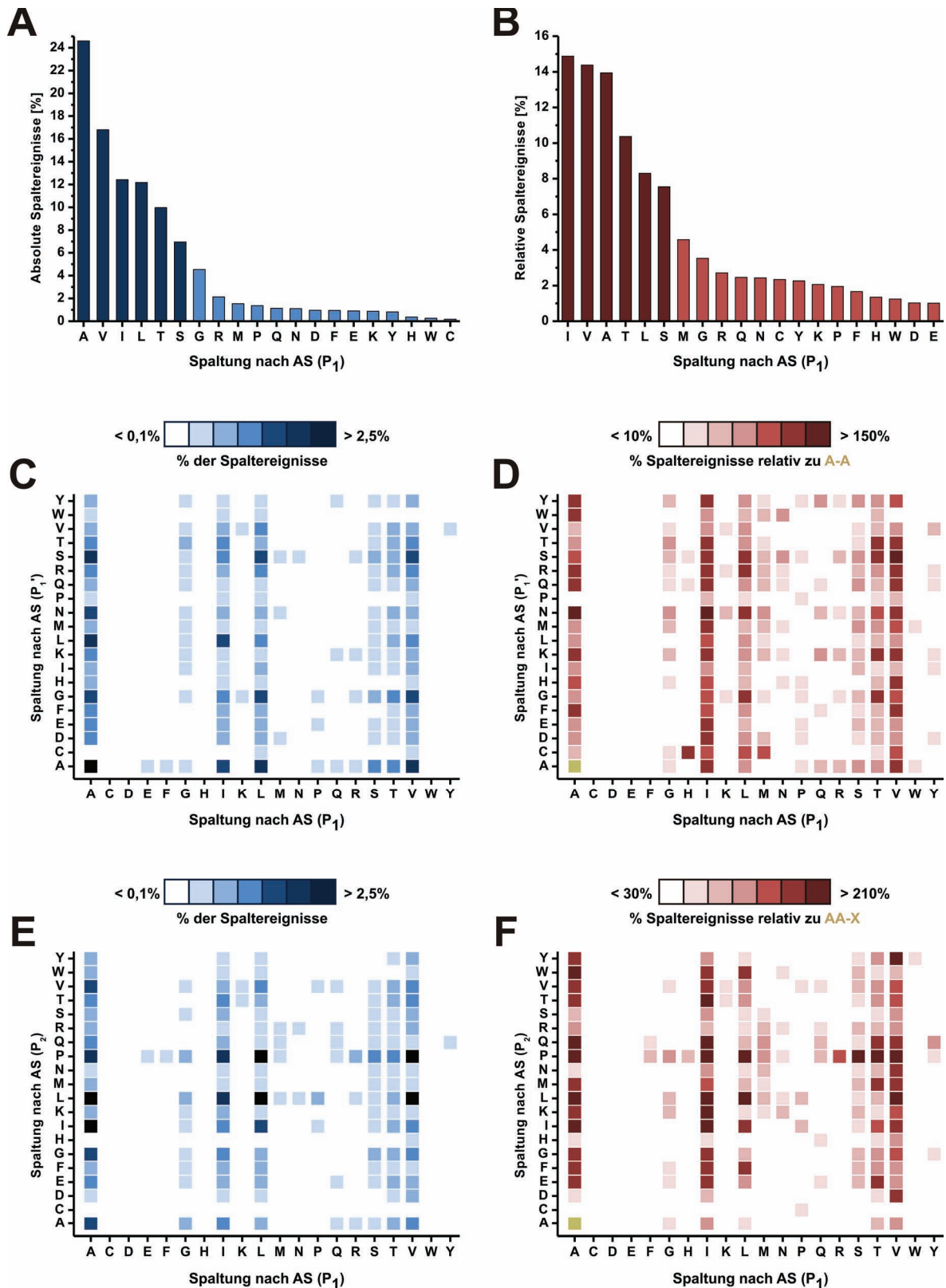


Abb.4-21: Statistik der elastatischen Spezifität basierend auf 6.577 ausgewerteten Peptiden.

Absolute (A) Schnitthäufigkeit nach bestimmten Aminosäuren. 2D-Spezifitätsplots, die absolut die Schnittfrequenz zwischen zwei Aminosäuren (C) oder die Spezifität eines Schnittes nach einer bestimmten Aminosäure-Kombination (E) angeben. (B,D,F) berücksichtigen die Aminosäure-Statistik der Organismen und sind auf Ala-Ala- bzw. AlaAla-Xxx-Schnitte normalisiert, deren Symbol gelblich hervorgehoben ist.

4.3.7 1D-nLC-MS/MS mit verkürztem Gradienten

Alle bisher vorgestellten MALDI-Resultate sind auf einer Agilent 1100 nLC unter Verwendung eines 135-minütigen Acetonitril-Gradienten durchgeführt worden. Das bestehende Protokoll soll zusätzlich auf einem zweiten System, der Proxeon *EASY-nLC*, etabliert werden. Des Weiteren soll eine Verkürzung und Optimierung des Lösungsmittelgradienten erfolgen, um die Analysezeit zu reduzieren und höhere Probendurchsätze zu ermöglichen. Als Testsystem kommen *Corynebacterium* DM1730-Membranen zum Einsatz, deren lösliche Anteile allerdings im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten nicht vorher proteolytisch entfernt werden. Der Gradient wird auf insgesamt 80 Minuten verkürzt, zusätzlich wird nur über das Intervall MALDI-gespottet, in dem auch Peptide eluieren. Anschließend werden die mit Elastase bzw. Trypsin verdauten Membranproteome jeweils einmal spezifisch und einmal unspezifisch gegen die Datenbank gesucht und verglichen, um weitere Aussagen über die Spezifität der Enzyme zu treffen. Eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse ist in Tab. 4-3 dargestellt.

Tab. 4-3: Zusammenfassung sämtlicher Proxeon *EASY-nLC*-MALDI-MS/MS Daten.

Angegeben sind diverse experimentelle Parameter sowie die Resultate auf Peptid- und Proteinebene.

	Probe			
	CGM1730	CGM1730	CGM1730	CGM1730
	Kein Vorverdau der Membranen			
	Elastase	Elastase	Trypsin	Trypsin
	MALDI	MALDI	MALDI	MALDI
Technische Replikate	3			
nLC-Aufbau / Gradient	Proxeon <i>EASY-nLC</i> / 80 min			
Suchspezifität	keine	AVILTS	keine	KR
Datenbank	NCBI08			
Probenmenge	150 µg			
Precursor-Genauigkeit	30 ppm			
Fragment-Genauigkeit	0,3 Da			
Identity Threshold (Mittelwert)	40,8	32,9	41,4	19,9
Spezifische Schnitte	84,4%	97,4%	84,5%	95,5%
Voll spezifische Peptide	76,7%	100%	77,4%	100%
Peptide (Mittelw. ± σ) / Lauf	262 ± 33	252 ± 44	294 ± 65	371 ± 76
Peptide gesamt	408	383	470	592
Falschpositivenrate	0,25%	0,52%	0,79%	1,60%
Proteine (Mittelw. ± σ) / Lauf	102 ± 7	108 ± 10	151 ± 33	192 ± 32
Proteine gesamt (min. 1/2 Peptide)	138 / 65	141 / 66	215 / 91	271 / 114
Proteine mit exakt 1 Peptid	73	75	124	157
Proteinliste	Tab. 9-2A	-	Tab. 9-2B	-

Bei der Auswertung der Peptid- und Proteindaten bestätigen sich beim Vergleich beider Enzyme die bereits gewonnenen Fakten. Mittels Elastase lassen sich bei gleichbleibender Zahl an technischen Replikaten zwar insgesamt weniger unterschiedliche Proteine identifizieren, dafür besitzen diese jedoch durchschnittlich eine höhere Zahl an zugeordneten Peptiden. Die tryptische Spezifität erlaubt Datenbanksuchen mit geringen Signifikanzkriterien für MS/MS-Fragmentspektren, ähnlich der hohen *Precursor*-Genauigkeit bei Verwendung der ESI-Orbitrap. Während eine unspezifische Suche die tryptischen Resultate deutlich schmälert, werden Elastase-Suchen dadurch nahezu nicht beeinflusst. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass eine AVILTS-Suche beinahe als unspezifisch anzusehen ist, da es sich um sehr häufige Schnittstellen handelt. Der Gewinn durch die hinzugekommene Spezifität ist also mit dem Verlust durch die Nichtberücksichtigung unspezifischer Schnitte vergleichbar.

4.3.8 Vergleich der tryptischen und elastatischen Spezifität

Die Spezifität eines proteolytischen Enzyms beträgt niemals 100%, da seine Bindetasche immer auch unspezifische Substrate binden kann, wenn auch nur in geringem Ausmaß. Da viele Suchalgorithmen die Enzymdefinition als eine Alles-oder-Nichts-Einstellung ansehen, kann bei ausgeprägt unspezifischem Verhalten eine nicht unerhebliche Menge an Information verloren gehen. Zusätzlich entstehen auch aus beiden Proteintermini zumindest semispezifische Peptide, die auch berücksichtigt werden müssen.

Beim direkten Spezifitätsvergleich zwischen Trypsin und Elastase fällt auf, dass beide Enzyme nur zu ca. 84,5% spezifische Schnitte verursachen (Tab. 4-3). Dadurch erhalten 24% der Peptide beider Datensätze mindestens einen unspezifischen Schnitt. Für diese Berechnung werden Met-Hydrolysen am Beginn der Proteinsequenz nicht mit einbezogen, da diese meistens nicht durch die Protease vermittelt, sondern bei der Reifung des Proteins durchgeführt werden. Beide Proteasen zeigen einen vergleichbaren Grad an Spezifität, aber das Muster der unspezifischen Schnitte erscheint im Falle von Trypsin disperser als bei Elastase (Abb. 4-22). Hier scheint es eine größere Diskriminierung bei proteolytischen Spaltungen außerhalb der postulierten Spezifität zu geben. Ein Beispiel hierfür wäre die bevorzugte Spaltung nach Glycin, da die Hydrolyse von Gly-Gly-Bindungen den mit Abstand am häufigsten beobachteten unspezifischen Schnitt bei Elastase darstellt.

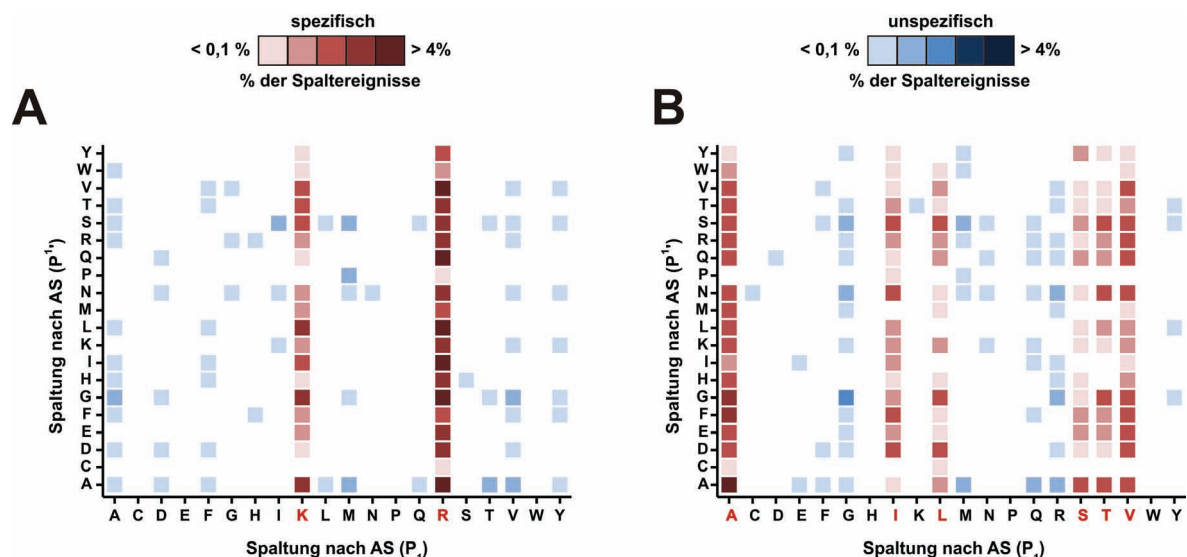


Abb.4-22: Vergleich der tryptischen und elastatischen Spezifität.

Das Schaubild zeigt für beide Proteasen die 2D-Spezifitätsplots aus unspezifischen Datenbanksuchen, die absolut die Schnittfrequenz zwischen zwei Aminosäuren angeben. Spezifische Schnitte sind in Rot-, unspezifische in Blautönen dargestellt. Verwendete Protease: Trypsin (A) Elastase (B).

4.4 Off-Gel IEF/nLC elastatisch verdauter Membranproteome

4.4.1 Off-Gel IEF mit Membranproteom-Proben

Obwohl in dieser Arbeit ausschließlich prokaryontische Proben untersucht werden, ist die Komplexität der Elastase-Verdaus im Vergleich zu konventionellen spezifischen Analysen erhöht. Da mittlerweile mehrere Geräte zur lösungsbasierten isoelektrischen Fokussierung von Peptiden verfügbar sind, wird eine Kopplung aus OGE und RP18-nLC als 2D-Trennmethode eingesetzt. Beide Techniken zeigen eine entsprechende Orthogonalität zueinander und sollten daher eine gute Trennperformance aufweisen. Um ein möglichst breites pI-Spektrum der aufgetrennten Peptide abzudecken werden IPG-Streifen mit einem relativ breiten pI-Bereich von 3 bis 10 verwendet. Die OGE besitzt einen entscheidenden Vorteil gegenüber der klassischen Gel-basierten Peptid-IEF. Die separierten Peptide befinden sich nach erfolgter Trennung in Lösung und sind nicht mehr in eine Gelmatrix eingebettet. Dies ermöglicht prinzipiell eine direkte Weiterverarbeitung der Probe ohne umständliche Extraktionsschritte. Im Herstellerprotokoll wird dem OGE-Puffer standardmäßig 10% Glycerol zugesetzt, um das Austrocknen der äußeren Fraktionen aufgrund des elektroosmotischen Wassertransports zu verhindern. Dadurch erlangt die Lösung allerdings eine zähflüssige Konsistenz, die ein direktes Einspritzen in die nLC verbietet. Um dennoch eine direkte Injektion ohne zusätzlichen Reinigungsschritt zu ermöglichen, wird ein modifiziertes IEF-Puffersystem ohne Glycerol verwendet. Das Austrocknen der äußeren Fraktionen wird zum Einen durch zusätzliches Auffüllen mit Puffer verhindert. Zum Anderen wirkt die Anwesenheit von 20% Methanol im Puffer dem Austrocknungsvorgang entgegen. Der Methanolgehalt geht komplett aus der Verdünnung der ursprünglichen Verdaulösung mit OGE-Puffer hervor und ist elektroosmotisch weniger aktiv. Zusätzlich wird dadurch die Löslichkeit der hydrophoben Peptide des Membranproteolysats im Puffer gesteigert.

Beide Proben verhalten sich in der OGE ähnlich, mit der Ausnahme, dass in den sauren Fraktionen der Purpormembranen-Fokussierung im Verhältnis deutlich mehr Peptide identifiziert werden (Abb. 4-23A). Dies ist nicht verwunderlich, da beide untersuchten Organismen relativ saure Proteome besitzen. Bei den *Corynebacterium*-Membranen sind die löslichen Proteinkomponenten, welche den überwiegenden Anteil an geladenen Aminosäuren enthalten, aber bereits vor der Analyse entfernt worden und fehlen dementsprechend.

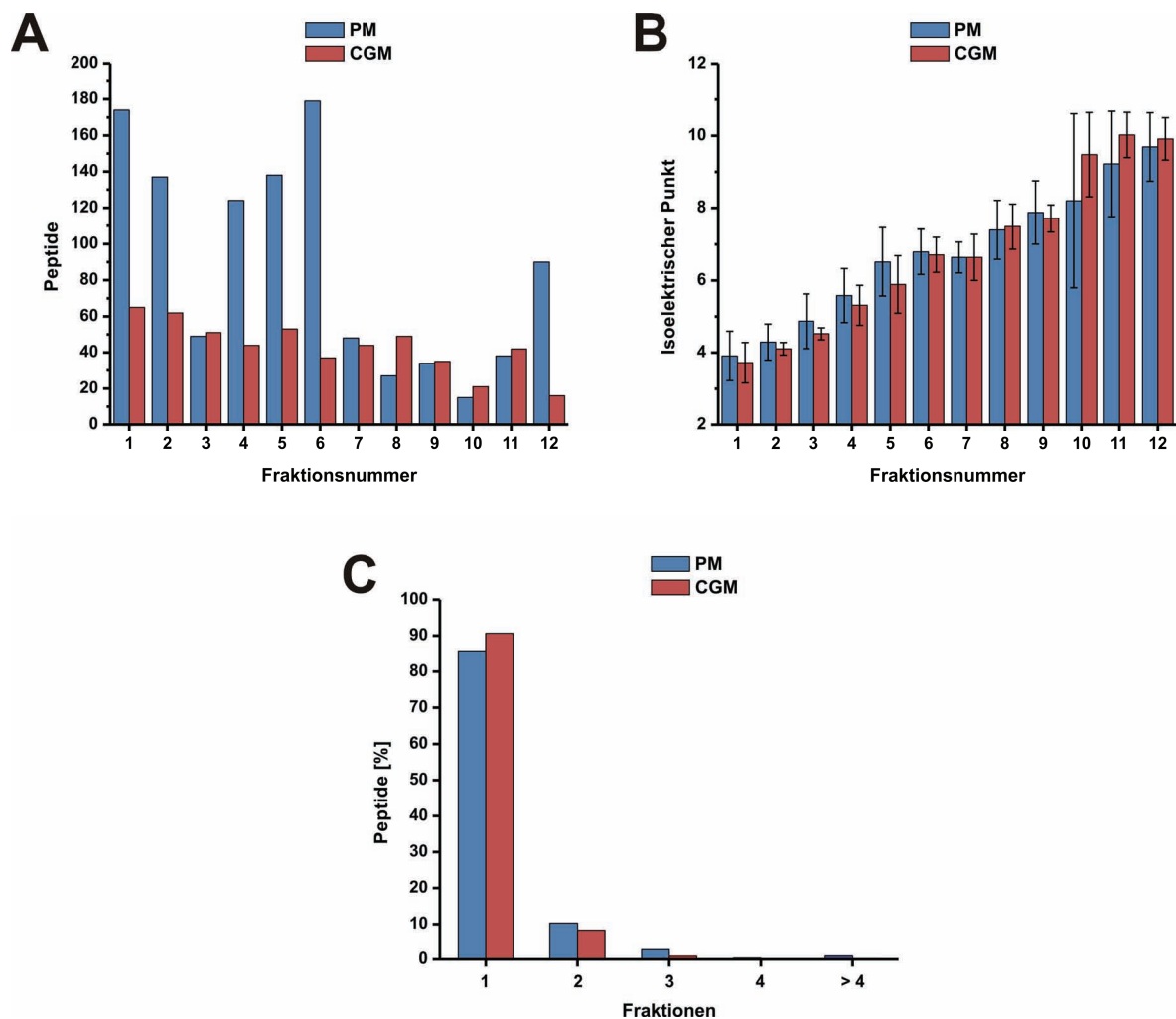


Abb. 4-23: Darstellung der *Off-Gel* IEF-Fraktionierungs-Ergebnisse.

(A) Absolute Anzahl an signifikanten Peptiden in den jeweiligen OGE-Fractionen. (B) Durchschnittlicher pI aller Peptide innerhalb einer Fraktion. (C) Prozentsatz der Peptide, die in genau einer definierten Anzahl von Fractionen auftreten. Alle Statistiken werden getrennt für beide untersuchten Proben erstellt.

Von Fraktion zu Fraktion ist eine stetige Zunahme des durchschnittlichen pI festzustellen (Abb. 4-23B). Lediglich im neutralen Bereich zwischen den Fractionen 6 und 7 ist keine deutliche Differenz zu erkennen. Dies ist durch das allgemein schlechte Fokussierverhalten von neutralen Peptiden zu erklären. Aliphatische Peptide ohne dissoziierbare Seitenkettenfunktionen weisen im pH-Intervall zwischen 2,4 und 9,6 keine Nettoladung auf und fokussieren dementsprechend schlecht. Trotzdem verläuft die OGE überwiegend vollständig, denn in beiden Experimenten sind ca. 85% der Peptide ausschließlich in einer Fraktion zu finden (Abb. 4-23C). Nur sehr wenige verteilen sich über mehrere Fractionen.

Im Falle der verdauten Purpurchromatogramme sind es acht Peptide, die alle von den abundantesten Proteinen in der Probe, Bacteriorhodopsin und Elastase, stammen. So handelt es sich bei deren unzureichender Fokussierung wahrscheinlich um eine Überladung der OGE. Außerdem weisen 7 der 8 Peptide eine ausgeglichene Anzahl positiv und negativ geladener Aminosäuren auf und haben ebenfalls in einem breiteren pI-Bereich eine Nettoladung von Null. Im schwach alkalischen pI-Bereich zwischen 8 und 9 gibt es kaum Peptide, da diese entweder eine extreme Länge oder unrealistische Aminosäure-Kombinationen besitzen müssen. Deswegen wird die geringste Anzahl an Peptiden in der 10. Fraktion beider Proben identifiziert. Die Trennung der Peptide erfolgt im Basischen allgemein nicht so scharf wie im sauren Bereich. Sämtliche stark alkalischen Peptide sind in den letzten beiden Fraktionen anzutreffen, da das pI-Maximum der verwendeten *Strips* lediglich 10 beträgt und nicht weiter ins Basische reicht.

4.4.2 Vergleich zwischen 1D-nLC und 2D-Offgel IEF/nLC

Letztendlich stellt sich bei jeder aufwendigeren Technik die Frage, ob der Zuwachs an Ergebnissen den erhöhten Aufwand rechtfertigt. Hierzu werden die erhaltenen OGE/nLC-Resultate mit regulären 1D-nLC-Analysen der identischen Proben verglichen (Tab. 4-4). Die neu aufgenommenen Ergebnisse der 1D-Purpormembran-Analyse decken sich weitgehend mit denen in Tab. 4-2 bereits vorgestellten Daten und bestätigen erneut die Robustheit der verwendeten Methode.

Tab. 4-4: Vergleich von 1D-nLC und 2D-OGE/nLC.

Angegeben sind diverse experimentelle Parameter sowie die Resultate auf Peptid- und Proteinebene.

	Probe			
	PM Elastase 1D MALDI	CGM1730 Elastase 1D MALDI	PM Elastase 2D MALDI	CGM1730 Elastase 2D MALDI
nLC-Aufbau / Gradient	Agilent 1100 / 135 min		Agilent 1100 / 72 min	
Suchspezifität	Keine			
Datenbank	NCBI08	CG07	NCBI08	CG07
Probenmenge	25 µg	100 µg	200 µg	300 µg
Precursor-Genauigkeit	30 ppm			
Fragment-Genauigkeit	0,3 Da			
Peptide gesamt	225	180	866	470
Falschpositivenrate	1,47%	1,57%	0,81%	0,77%
Proteine gesamt (min. 1/2 Peptide)	42 / 24	53 / 24	147 / 83	149 / 56
Proteine mit exakt 1 Peptid	18	29	64	87
BR-Peptide	39	-	81	-
BR-Sequenzabdeckung	45,0%	-	71,5%	-
BR-Peptidliste	Tab. 9-13A	-	Tab. 9-13B	.
Proteinliste	Tab. 9-3A	Tab. 9-3B	Tab. 9-3C	Tab. 9-3D

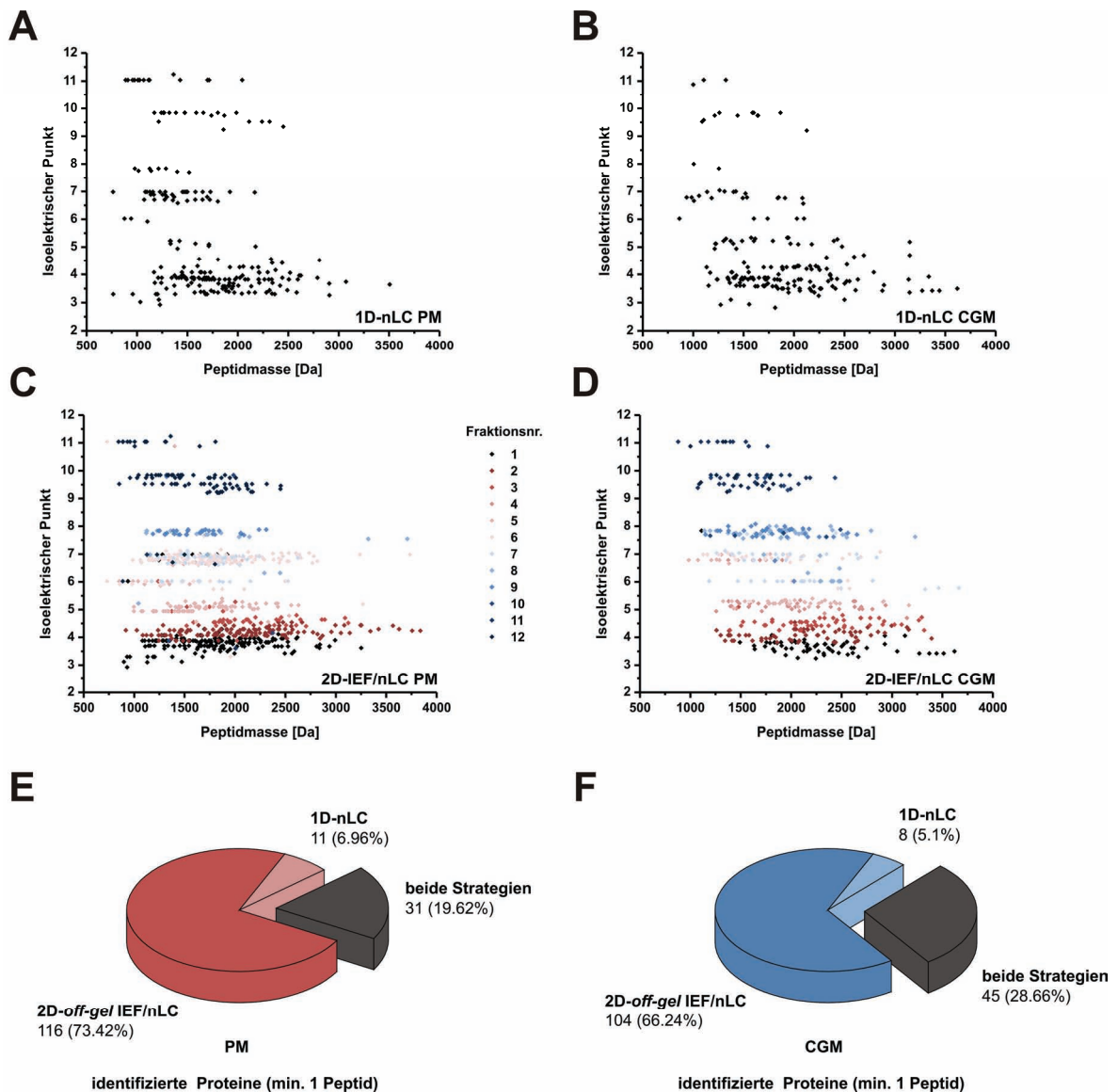


Abb.4-24: Vergleich der Ergebnisse von 1D-nLC und 2D-off-gel IEF/nLC.

Die isoelektrischen Punkte sämtlicher identifizierten Peptide sind gegen die Peptidmasse aufgetragen. 1D-nLC der Purpurmembran- (A) und *Corynebacterium*-Membran-Proben (B). 2D-OGE/nLC der identischen Proben (C,D). Bei den 2D-Ergebnissen sind die einzelnen Fraktionen durch unterschiedliche Farbtöne gekennzeichnet. Übersicht des Vergleichs auf Proteinebene beider Methoden für beide Proben (E,F).

Durch die zusätzlich vorgeschaltete OGE können probenabhängig 2- bis 4- mal mehr Peptide und Proteine identifiziert werden. Grundsätzlich ist hier jedoch anzumerken, dass bei der 2D-Methode Probenmengen geladen werden können, die weit über der Kapazität der 1D-nLC-Anwendung liegen. Der Zuwachs an identifizierten Peptiden ist also immer

eine Kombination aus erhöhter Probenmenge und deren verbesserter Auftrennung. In den verschiedenen pI-Bereichen fällt die Zunahme an detektierten Peptiden unterschiedlich stark aus (Abb. 4-24A-D). In den 2D-Experimenten sind deutlich mehr Peptide im pI-Bereich zwischen 7,5 und 8,0 zu finden, während die Zahl stark basischer Peptide, insbesondere aus den Purpurmembranen kaum zunimmt. Auch die Charakterisierung des Modellproteins Bacteriorhodopsin profitiert von der gesteigerten Trennleistung, denn es wird ungefähr die doppelte Anzahl Peptide identifiziert (Tab. 4-4). Die damit erhaltene Sequenzabdeckung von 71,5% spiegelt momentan wohl den maximalen Wert dar, der mit einer Protease und einem MALDI-MS/MS-Experiment erreicht werden kann (Abb. 4-25). Nur ein Sequenzbereich (Aminosäure-Positionen 98-110) des Bacteriorhodopsins wird exklusiv im 1D-nLC-Versuch identifiziert, allerdings auch nur durch ein Peptid mit eher moderatem *Ions Score* von 41.

10	20	30	40	50	60
QAQITGRPEW	IWLALGTALM	GLGTLYFLVK	GMGVSDPPDAK	KFYAITTLVP	AIAFTMYLSM
70	80	90	100	110	120
LLGYGLTMVP	FGGEQNPIYW	ARYADWLFTT	PLLLLDLALL	VDADQGTILA	LVGADGIMIG
130	140	150	160	170	180
TGLVGALTKV	YSYRFVWWAI	STAAMLYILY	VLFPGFTSKA	ESMRPEVAST	FKVLRNVTVV
190	200	210	220	230	240
LWSAYPVVWL	IGSEGAGIVP	LNIEITLLFMV	LDVSAKVGFG	LILLRSRAIF	GEAEAPEPSA
250					
GDGAAATSD					

Abb.4-25: BR-Sequenzabdeckung bei 2D-off-gel IEF/nLC-MALDI-MS/MS-Analyse

Position der identifizierten OGE/nLC-MALDI-Peptide in der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz bei der Verwendung von Elastase als proteolytisches Enzym. Der Sequenzbereich, der nur bei der 1D-nLC und nicht bei der 2D-OGE/nLC-Analyse identifiziert wird, ist rot hervorgehoben. Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 9-13B aufgeführt.

Auch die anderen in der Probe befindlichen Proteine zeigen erhöhte Peptidzahlen. Vier Proteine der Purpurmembranen haben mehr als 40 zusätzlich identifizierte Peptide in der OGE/nLC-Analyse im Vergleich zur 1D-Trennung. Solche Verbesserungen stellen allerdings Ausnahmen dar, denn für die meisten Proteine liegt der Zuwachs im Bereich von einem bis zu drei zusätzlichen Peptiden. Neben Proteinen mit erhöhter Peptidzahl treten auch grundsätzlich neue Proteinidentifikationen auf, die ungefähr zur Hälfte aus *One-hit*

Wonders bestehen. Der umgekehrte Fall, dass ein Protein ausschließlich mit der eindimensionalen Technik gefunden wird, ist relativ selten und nur vereinzelt anzutreffen (Abb. 4-24EF). Der Vergleich beider Trennmethode n anhand der *Corynebacterium*-Membranen verläuft ähnlich. Abundante Proteine zeigen teilweise starke Peptidzugewinne, zahlreiche neue Proteine werden identifiziert und fast alle mit 1D-nLC gefundenen Proteine sind auch im 2D-Experiment vorhanden (Abb. 4-24EF). Neben dem bereits besprochenen Bacteriorhodopsin, profitieren auch andere schwer zugängliche Membranproteine von der Präfraktionierung. So nimmt z.B. die Peptidzahl des Cytochrom b, einem schwer zugänglichen Membranprotein, von eins auf sieben zu. Das modifizierte OGE/nLC- System ist somit grundsätzlich für die Untersuchung von Membranproteinen geeignet und unterliegt keinen offensichtlichen Einschränkungen.

4.4.3 Kurzer Vergleich mit MudPIT

Die *Corynebacterium*-Probe wird zu Vergleichszwecken mit dem MudPIT-Verfahren auf der nLC-ESI-LIT-Plattform untersucht. Um die bestmögliche Vergleichbarkeit beider relativ umfangreichen Methoden zu gewährleisten, wird auf eine ähnliche Rate an Falschpositiven normalisiert. MudPIT präsentiert sich zur Analyse der *Corynebacterium*-Membranen als potenter als die OGE/nLC-Kombination, denn es können deutlich mehr Peptide und Proteine identifiziert werden (Tab. 4-5). Allerdings ist die hier vorgenommene Gegenüberstellung ähnlich der Situation zwischen 1D- und 2D-Trennung, nicht hundertprozentig fair, da unterschiedliche Probenmengen und Gradienten vorliegen.

Bei der genaueren Betrachtung der MudPIT-Daten stellt sich jedoch die Frage, ob diese Methode speziell für die Analyse von Membranproben geeignet ist. Ein Großteil der Peptide (ca. 40%) bindet erst gar nicht an das SCX-Material und wird direkt mit dem ersten Gradienten auf der C18-Säule aufgetrennt (Abb. 4-26A). In dieser Fraktion befinden sich fast alle hydrophoben Membranpeptide, was sich in vielen Peptiden mit einem positiven GRAVY-Score niederschlägt (Abb. 4-26B). Mit wenigen Ausnahmen beinhalten die restlichen Fraktionen überwiegend hydrophilere Peptide, die sicherlich nicht das Ziel einer Membranproteinanalyse darstellen. Wie bereits gezeigt worden ist, weist die OGE im Gegensatz hierzu eine geeignetere Orthogonalität für solche Proben auf. (Abb. 4-23A).

Tab. 4-5: Vergleich von MudPIT und OGE/nLC.

Angegeben sind diverse experimentelle Parameter sowie die Resultate auf Peptid- und Proteinebene.

	Probe	
	CGM1730 Elastase ESI MudPIT	CGM1730 Elastase MALDI OGE/nLC
nLC-Aufbau / Gradient	Thermo / 100 u. 180 min	Agilent 1100 / 72 min
Suchspezifität		keine
Datenbank		CG07
Probenmenge	600 µg	300 µg
Precursor-Genauigkeit	5 ppm	30 ppm
Fragment-Genauigkeit	0,8 Da	0,3 Da
Peptide gesamt	1448	470
Falschpositivenrate	0,78%	0,77%
Proteine gesamt (min. 1/2 Peptide)	544/285	149/56
Proteine mit exakt 1 Peptid	259	87

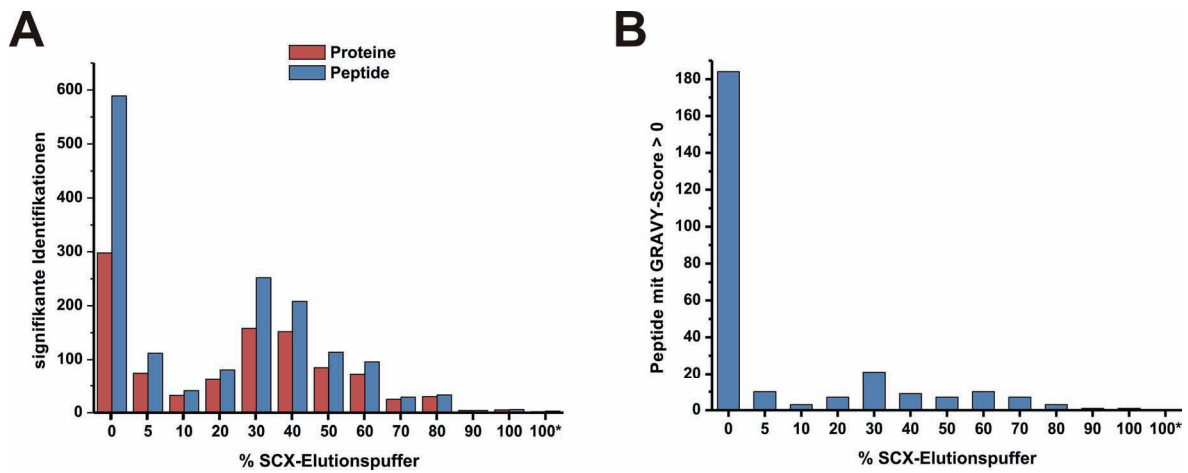


Abb. 4-26: Darstellung der MudPIT-Fraktionierung.

(A) Absolute Anzahl an signifikanten Peptiden in den jeweiligen Fraktionen der MudPIT-Analyse. (B) Absolute Anzahl der hydrophoben Peptide mit GRAVY-Scores größer Null in jeder Fraktion. Jeweilige Prozentangaben zum Anteil des SCX-Elutionspuffers im Fließmittel. „0“ bezeichnet die Fraktion vor aktiver Elution des SCX-Materials, „100*“ den letzten Salz-Waschschritt.

4.5 Datenbanksuchen mit weniger spezifischen Datensätzen

4.5.1 Einfluss der elastatischen Spezifität auf PMF- und MS/MS-Suchen

Bei vielen weniger spezifischen Enzymen gibt es keine eindeutig definierte Grenze zwischen einem spezifischen und einem unspezifischen Schnitt, vielmehr tritt eine graduelle Abnahme der Wahrscheinlichkeit für die Spaltung nach einer bestimmten Aminosäure auf. So stellt sich im Falle von Elastase die Frage, ob es sich bei der Proteolyse nach Gly noch um eine richtige spezifische Reaktion handelt (Kap. 4.3.6) und ob diese Information einer Datenbanksuche zuträglich ist. Hierzu werden PMF-Suchen mit 54 Massen eines Bacteriorhodopsin-Spektrums ausgeführt und diese unter Annahme verschiedener Spezifitätsdefinitionen gegen die korrekte Bacteriorhodopsin-Sequenz und zwei ähnlich lange Nonsensesequenzen gesucht. Je mehr Schnittstellen hierbei berücksichtigt werden, desto mehr Peptide werden der richtigen Sequenz zugeordnet (Abb. 4-27A). AVIL und AVILS sind zu eingeschränkte Suchdefinitionen, AVILTS und AVILTSG erscheinen zutreffend. Der weitere Einbezug von M in die Definition ist nicht nötig, und ohne jegliche Spezifität steigt der Anteil an falschen Zuordnungen überproportional. Allerdings muss immer ein Kompromiss zwischen der Zahl zugeordneter Peptide und der Vergrößerung des Suchraums geschlossen werden. Da bereits beim Suchen gegen kleinere Datenbanken die vorhandenen Algorithmen bei mehr als sechs verschiedenen Schnittstellen an ihre Grenzen stoßen, ist der Erhalt von Treffern bei den weiten Suchdefinitionen eher Zufall. Aus diesem Grund ist AVILTS die in dieser Arbeit vorgeschlagene und verwendete Suchdefinition für PMF-Abfragen. Selbst mit ihr ist eine hohe Massengenauigkeit für Suchen gegen kleinere Datenbanken nötig. Wird nur gegen eine Proteinsequenz gesucht, kann auch die Schnittstelle G mit einbezogen werden.

Auf MS/MS-Ebene wird die empfohlene Suchspezifität bestätigt, bei Suche der Ergebnisse eines nLC-MALDI-PM-Laufs (Tab. 4-3) wird so die maximale Ausbeute hinsichtlich identifizierter Peptide und Proteine erzielt (Abb. 4-27B). Erweiterte Suchdefinitionen bringen weder Gewinn noch Verlust, die nun zusätzlich berücksichtigten Peptide und der größere Suchraum gleichen sich nahezu exakt aus. Somit kann für MS/MS-basierte Experimente sogar die Suche ohne Spezifität empfohlen werden, wenn es auf eine möglichst umfassende Charakterisierung der Proteine ankommt.

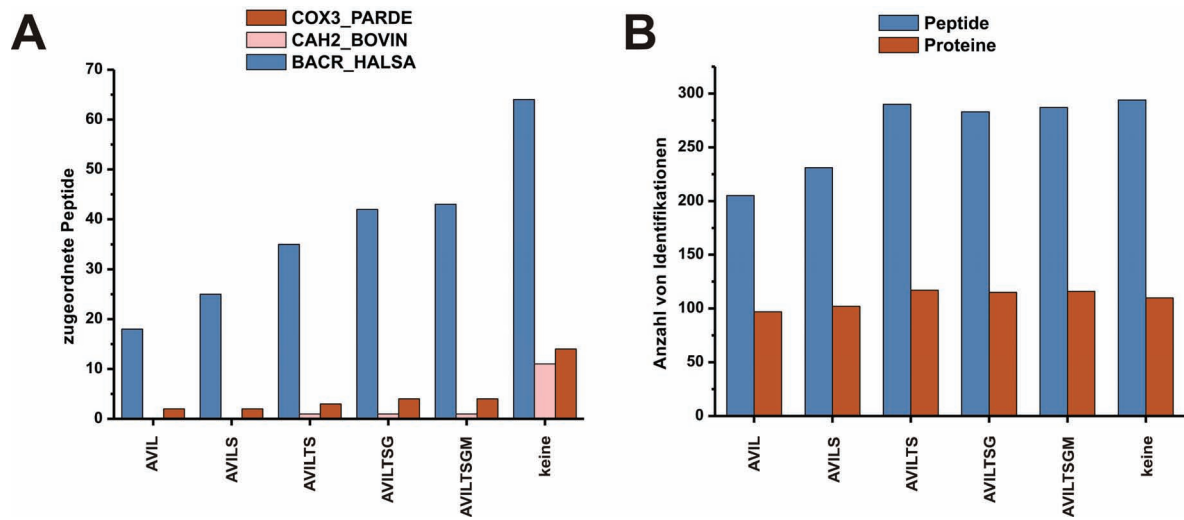


Abb.4-27: Elastasespezifität bei PMF- und MS/MS-Datenbanksuchen.

(A) Zugeordnete Peptide bei der PMF-Suche von 54 Massen gegen die Bacteriorhodopsin-Sequenz (blau) und zwei Nonsensesequenzen (rot) mit mehreren Suchdefinitionen. (10 ppm Suchgenauigkeit)
 (B) Identifizierte Peptide und Proteine einer MS/MS-Suche mit den verwendeten Suchspezifitäten. (30 ppm Precursor-Genauigkeit, 0,3 Da Fragment-Genauigkeit).

4.5.2 Einfluss der Suchgenauigkeit auf PMF- und MS/MS-Suchen

Neben der Verwendung einer optimalen Enzymspezifität kann eine Verbesserung der Suchergebnisse von unspezifisch verdauten Proben auch über eine bessere Massengenauigkeit erzielt werden. Durch eine hohe Massengenauigkeit wird die Menge potentiell in Frage kommender Peptide reduziert, und somit weniger Information nötig, um einen signifikanten Treffer zu erzielen.

Wird versucht innerhalb verschiedener Massentoleranzen 81 tatsächliche Bacteriorhodopsin-Peptidmassen gegen die Bacteriorhodopsin- und die bereits im vorigen Abschnitt verwendeten falschen Proteinsequenzen zuzuordnen, zeigt sich, dass unterhalb 5 ppm Genauigkeit fast keine falsch-positiven Zuordnungen mehr erfolgen (Abb. 4-28A). Auch ist bei dieser Toleranz die Zahl von Doppelzuordnungen gering, weniger als 10% der gesuchten Massen werden mehr als einem Peptid zugeordnet. Bei einer für MALDI-TOF-Instrumente üblichen Genauigkeit von 30 ppm treten hingegen noch ca. 50% Mehrfachzuordnungen auf, welche die genaue Untersuchung eines Proteins per PMF erschweren

Für MS/MS-Experimente ergibt sich ein Bild analog zum Einfluss der Spezifität, denn die Datenbanksuchen sind deutlich toleranter gegenüber ungenauen Messungen (Abb. 4-28B). Egal ob mit 200, 30 oder 12 ppm gesucht wird, die erhaltenen Protein- und Peptidzahlen variieren kaum. Lediglich unter 12 ppm Genauigkeit erfolgt eine Verschlechterung der Resultate. Der verwendete Datensatz besitzt eine Streuung der *Precursor*-Massengenauigkeit von ± 10 ppm, wodurch der beobachtete Einbruch zu erklären ist. Die in Fachkreisen empfohlene Suchgenauigkeit vom 3-fachen der Standardabweichung beträgt ca. 30 ppm und wird in dieser Arbeit durchgängig für intern kalibrierte MALDI-TOF/TOF-Messungen verwendet.

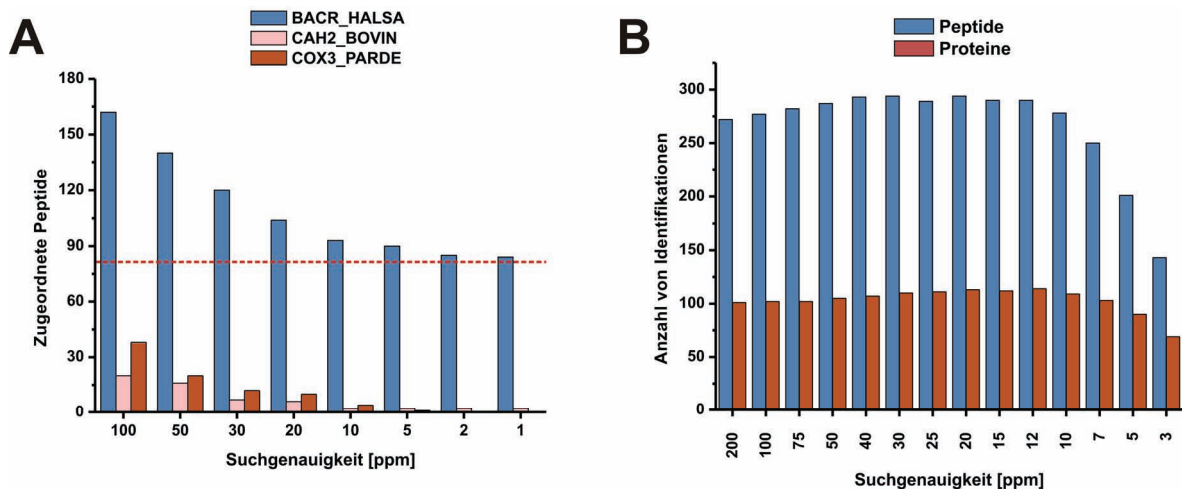


Abb. 4-28: Suchgenauigkeit bei unspezifischen PMF- und MS/MS-Datenbanksuchen.

(A) Zugeordnete Peptide bei der PMF-Suche von 81 Bacteriorhodopsin-Massen gegen Bacteriorhodopsin (blau) und zwei Nonsensesequenzen (rot) mit zunehmender Suchgenauigkeit. Die rote gestrichelte Linie kennzeichnet den Sollwert von 81 Peptiden. (B) Identifizierte Peptide und Proteine einer MS/MS-Suche mit den verwendeten Suchgenauigkeiten. (Suchen ohne Enzymdefinition; 0,3 Da Fragment-Genauigkeit).

4.5.3 Berechnete Auswirkung einer verbesserten Massengenauigkeit

Beim Vergleich elastatischer Proben, die mit den zwei instrumentellen Plattformen ESI-Orbitrap und MALDI-TOF/TOF untersucht worden sind, hat sich herausgestellt, dass größtenteils die hohe Massengenauigkeit des Orbitrap-Analysators der Grund für die besseren Resultate gewesen ist. Um zu bestimmen wie groß der Zuwachs an signifikanten Datenbanktreffern durch eine Verbesserung der Massengenauigkeit ausfällt, wird eine Statistik über die insgesamt 30.470 MS/MS-Suchen erstellt, die für den Erhalt der in Tab. 4-2 dargestellten elastatischen MALDI-Ergebnisse verantwortlich sind (Abb. 4-29A). Mithilfe einer Zerfallsfunktion 2. Ordnung ($f(x)=ae^{-x/m}+be^{-x/n}+c$) und anschließender Integration kann die Menge zusätzlicher signifikanter Peptididentifikationen bestimmt werden, die bei Verbesserung der Massengenauigkeit von 50 auf 5 ppm auftreten würden (Abb. 4-29B). Diese Werte werden gewählt, da sie übliche Größen für extern kalibrierte Spektren darstellen, die mit den beiden Massenanalysatoren erreicht werden. Für die zur Analyse von *Halobacterium*- und *Corynebacterium*-Proben verwendeten Datenbanken liegen die berechneten Gewinne im Bereich von 40-50% (Tab. 4-6).

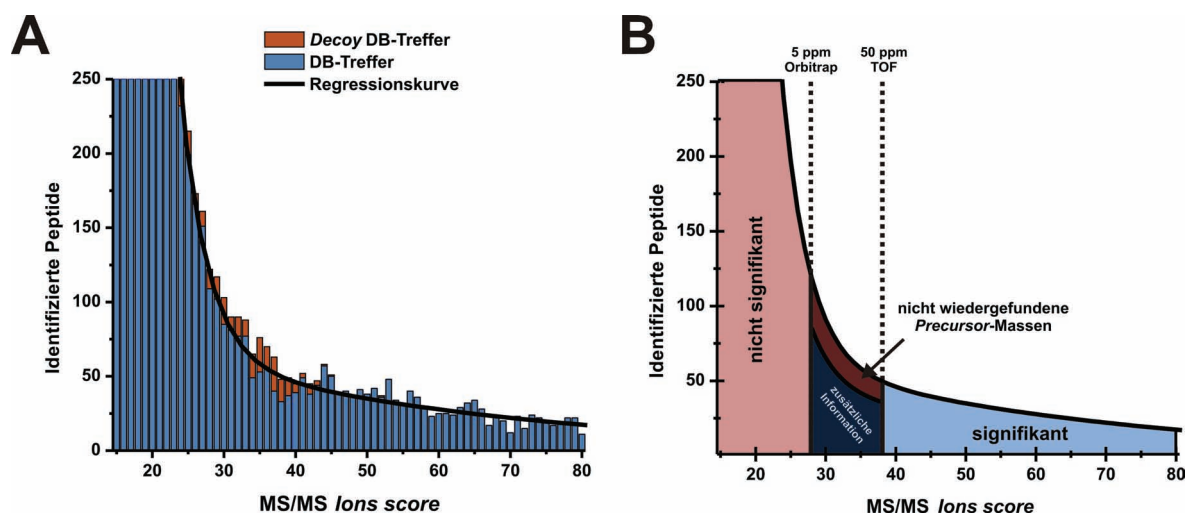


Abb.4-29: Darstellung des Ergebniszuwachses durch bessere Suchgenauigkeit.

(A) MS/MS Ions Score-Verteilung von 30.470 elastatischen MS/MS-Queries. Decoy-Datenbank-Treffer der gleichen Suche werden zur Abschätzung der Falschpositivenrate subtrahiert. Regressionskurve: $f(x)=95742,8e^{-x/3,2}+105,3e^{-x/48,6}-2,9$. (B) Theoretische Berechnung der zusätzlichen Peptididentifikationen (Summe aus dunkelroter und dunkelblauer Fläche). Die gekennzeichneten Flächen repräsentieren Proportionen signifikanter, nicht-signifikanter und zusätzlicher Datenbank-Treffer.

4.5.4 Probentransfer von MALDI-Orbitrap zu MALDI-TOF/TOF

Mit einem MALDI-LIT-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer ist es möglich, akkurate Massenbestimmungen mit einer Genauigkeit von ± 5 ppm durchzuführen. Allerdings sind dessen Fragmentierungsmöglichkeiten im Vergleich zu TOF/TOF-Geräten bei einfach geladenen Ionen eher bescheiden. Aus diesem Grund soll eine Kombination aus nLC-MALDI-Daten mit Orbitrap-MS-Genauigkeit plus entsprechende TOF/TOF-Fragmentspektren eine Verbesserung im Vergleich zu auf den Einzelgeräten aufgenommenen Daten darstellen. Da momentan keine Hardwarekompatibilität zwischen beiden Instrumenten vorliegt, wird die Probe vom Probensteller des einen Gerätes auf den des anderen möglichst verlustfrei transferiert. Hierfür werden zuerst vorläufige *Precursor*-Massen auf dem MALDI-TOF/TOF gemessen und die zugehörigen Fragmentspektren aufgenommen. Dann wird die Probenpräparation vom Probensteller rückgelöst und anschließend unter Matrixzusatz auf dem Orbitrap-Probensteller neu präpariert. Dort wird dann letztendlich die exakte *Precursor*-Masse bestimmt.

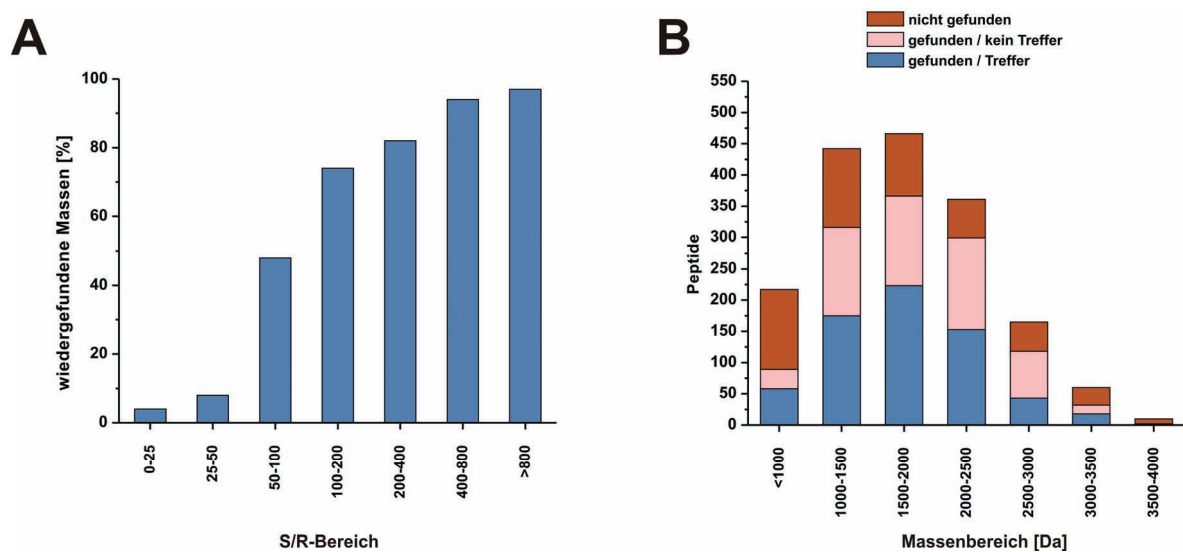


Abb.4-30: Wiederfindung von *Precursor*-Massen nach Rücklösen und Umspotten.

(A) Wiederfindungsrate der *Precursor*-Massen in Abhängigkeit ihres S/R (B) Darstellung der *Precursor*-Wiederfindung in verschiedenen Massenintervallen. Zusätzlich sind noch die Anteile der wiedergefundene Massen gezeigt, die zu signifikanten DB-Treffern führen.

Werden die MS-Spektren der einzelnen nLC-MALDI-Fractionen zweier Proben, den Purpurmembranen (Reinheitsgrad >99% BR) und *Corynebacterium* DM1730-Cytosol, auf beiden Geräten verglichen, fällt auf, dass ab einem bestimmten S/R nahezu alle Massen nach Fragmentierung und Umspotten wieder zu detektieren sind (Abb. 4-30A). Ab einem S/R von 100 beträgt die Wiederfindungsrate über 75%, ab einem S/R von 400 ist sie nahezu perfekt. Ebenso zeigt sich, dass mit Ausnahme sehr kleiner und sehr großer Peptide so gut wie keine Massenabhängigkeit festzustellen ist (Abb. 4-30B). Auch liefern die besonders kleinen und großen Peptide weitaus seltener signifikante Treffer in der Datenbanksuche. Während im mittleren Massenbereich nahezu jedes zweite aufgenommene und mit einer genauen *Precursor*-Masse versehene MS/MS-Spektrum einen signifikanten Treffer zur Folge hat, ist dies bei Peptiden unter 1.000 bzw. über 3.000 Da nur ca. bei jedem fünften der Fall. Beispielhaft für die Wiederfindung sind die zwei Spektren einer nLC-Fraktion gezeigt, die mit beiden Instrumenten vermessen wird (Abb. 4-31). Sämtliche markanten Signale sind in beiden Spektren zu sehen, Unterschiede treten lediglich bei Signalen auf, die nur wenig über die Basislinie herausragen.

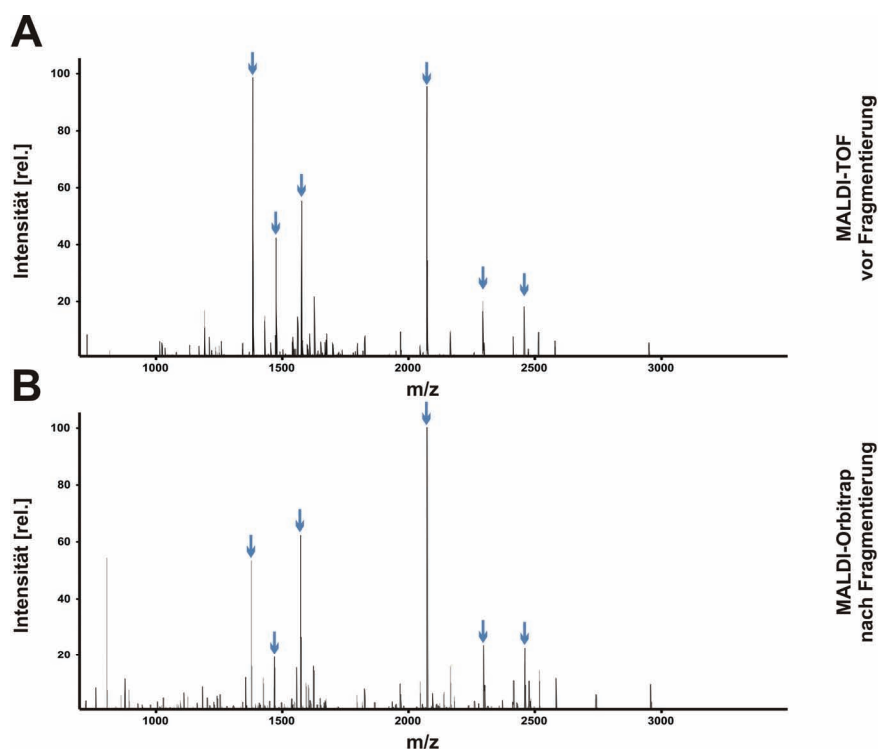


Abb.4-31: Beeinflussung der Spektren durch das Umspotten der Probe.

(A) MALDI-TOF-MS-Spektrum eines *Spots* vor der Fragmentierung (B) MALDI-Orbitrap-MS-Spektrum nach der Fragmentierung. Die sechs in diesem Beispielspektrum für MS/MS selektierten Peptide sind mit **blauen** Pfeilen gekennzeichnet.

Insgesamt belaufen sich die Werte für sämtliche zur Fragmentierung ausgewählten Massen beider Proben auf 72,0 bzw. 69,3% (Tab. 4-6). Die meisten der nicht wiedergefundenen Signale sind von schwacher Intensität und haben entsprechend qualitativ schlechte Tochter-Fragmentspektren. Ein signifikanter DB-Treffer ist so selbst mit einer akkuraten Masse eher unwahrscheinlich. Werden die ausgelassenen *Precursor*-Massen der ursprünglichen Berechnungen des theoretischen Zuwachses an signifikanten Identifikationen berücksichtigt, werden korrigierte Werte von 36,4% bei den Purpurmembranen und 29,2% bei der cytosolischen *Corynebacterium*-Probe erhalten.

4.5.5 Kombinierte Suche von Orbitrap-MS und TOF/TOF-MS/MS-Daten

In den zur Datenbanksuche verwendeten MGF-Dateien werden die TOF/TOF-*Precursor*-Massen durch akkurate Orbitrap-Massen ersetzt und mit der entstandenen Hybriddatei die Suche durchgeführt („OrbiTOF“). Als Referenz dienen die Suchergebnisse, die aus einer vergleichbaren Suche mit der ursprünglichen MALDI-TOF/TOF-Datei hervorgehen, bei der kein Massenaustausch vorgenommen worden ist (Tab. 4-6).

Die Menge an zusätzlich erhaltenen signifikanten Peptiden fällt sogar noch ein wenig höher aus als theoretisch berechnet. Insgesamt stellen die erreichten 48,0% (Purpormembranen) bzw. 33,8% (*Corynebacterium glutamicum* DM1730) deutliche Gewinne für Experimente dar, deren Fokus auf Proteinidentifikation liegt. Hier liegen die kombinierten Ergebnisse aus beiden Suchen zugrunde, denn schließlich sind signifikante Peptide aus dem TOF/TOF-Experiment nicht zu verwerfen, nur weil ihre Masse in der Orbitrap-Messung nicht bestimmt werden kann. Hierfür ist zum Teil auch die Orbitrap-Software zur Verantwortung zu ziehen, die bei einigen Peptiden dazu neigt falsch zu deisotopieren. Es ist auch kein Zufall, dass viele der nicht wiedergefundenen *Precursor*-Massen größer als 2.700 Da sind. In diesem Massenbereich lässt die Sensitivität der MALDI-Orbitrap deutlich nach und reicht möglicherweise nicht mehr aus, um schwächer konzentrierte Peptide nachzuweisen.

Die zusätzlichen Peptide verteilen sich nicht gleichmäßig über die bereits im TOF/TOF-Versuch detektierten Proteine, der Zuwachs variiert von Protein zu Protein. Auch die neu hinzugekommenen Proteine profitieren nicht alle gleichermaßen. Die meisten von ihnen sind *One-hit Wonder*, allerdings gibt es auch einige Ausnahmen. So wird z.B. die kurzkettige *Halobacterium* Isoprenyl-Diphosphat-Synthase über drei neue signifikante Peptide identifiziert.

Tab. 4-6: Vergleich von reinen TOF/TOF und den erzeugten Hybrid-Daten.

Angegeben sind diverse experimentelle Parameter sowie die Resultate auf Peptid- und Proteinebene.

	Probe	
	PM Elastase MALDI	CGC1730 Elastase MALDI
nLC-Aufbau / Gradient	Proxeon <i>EASY-nLC</i> / 80 min	
Suchspezifität	keine	
Datenbank	SP07	CG07
Probenmenge	100 µg	
Precursor-Genauigkeit (TOF / Orbitrap)	50 ppm / 5 ppm	
Fragment-Genauigkeit (TOF / Orbitrap)	0,3 Da	
Durchschnittlicher Identity Threshold (TOF / Orbitrap)	35 / 25	38 / 28
Berechneter Zuwachs an signifikanten Peptiden	50,6%	42,1%
Precursor-Wiederfindungsrate	72,0%	69,3%
Korrigierter Zuwachs an signifikanten Peptiden	36,6%	29,2%
Peptide TOF/TOF-MGF	152	337
Peptide hybrides MGF	217	433
kombiniert	226	451
Proteine TOF/TOF-MGF	56	143
Proteine hybrides MGF	70	163
kombiniert	74	173
Tatsächl. Zuwachs an signifikanten Peptiden	48,7%	33,8%
Proteinliste	Tab. 9-4A	Tab. 9-4B

4.6 MS/MS-Fragmentierungsstatistik elastatischer Peptide

4.6.1 Allgemeine Statistik der entstehenden Fragment-Ionen

Das Fragmentierungsverhalten von Peptiden wurde bereits mehrfach evaluiert. Es gab umfassende Untersuchungen von tryptischen und unspezifischen Datensätzen die per *low-energy* CID in ESI-IT-Instrumenten erzeugt wurden. Eine nähere Betrachtung der Fragmentierung durch *high-energy* CID-unterstütztes MALDI-PSD wurde allerdings bisher nur für tryptische Peptide durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an MS/MS-Daten elastatischer Peptide, die in dieser Arbeit aufgenommen worden sind, ist es möglich eine umfassende Auswertung des Fragmentierungsverhaltens von weniger spezifisch geschnittenen Peptiden zu erhalten.

Zur Erhebung einer Statistik über alle gebildeten Fragment-Ionen werden alle bisher besprochenen elastatischen MALDI-MS/MS-Experimente verwendet. Jedes *Precursor*-Peptid wird nur einmal berücksichtigt, auch wenn es mehrmals in verschiedenen Experimenten fragmentiert worden ist. In der Auswertung werden die prominentesten MALDI-PSD-Ionentypen a , b , b^0 , b^* , y , y^0 , y^* , i , int , int^0 , int^* und int^\dagger berücksichtigt (Erklärung der Bezeichnungen in Tab. 4-7). Insgesamt sind es 7.689 verschiedene Peptide, denen 445.909 Fragment-Ionen zugeordnet werden können. 344.486 Signale der MS/MS-Spektren verursachen keinen Treffer bei der Datenbanksuche, so dass der Anteil nutzbarer Signale 56,4% beträgt. Dieser Prozentsatz variiert stark mit dem gewählten minimalen S/R zur Signal-Erkennung bei der Extraktion der Daten. Da hierfür ein relativ niedriger Schwellenwert von S/R 5 verwendet wird, ist die Zahl nicht verwertbarer Signale dementsprechend hoch. Fast ein Drittel der entstandenen Ionen gehört zur Gruppe der internen Fragmente und ihrer zugehörigen Neutralverluste. Ionen des N-terminalen Typs (b , b^0 , b^* , a) sind durch die elastatische Spezifität begründet, etwas häufiger zu beobachten als C-terminale Ionen (y , y^0 , y^*). Die spezifische Bindetasche des Enzyms verhindert die Bildung von Peptiden mit basischen C-Termini, die wie tryptische Peptide eine gerichtete Fragmentierung zu y -Ionen hin aufweisen. Der elastatische Verdau ist folglich nicht komplett zufällig, für eine umfassende Analyse von Fragmentierungsmustern müssten somit noch tryptische Peptide zum Datensatz hinzugefügt werden. Die verbleibenden zugeordneten Fragmente sind Immonium-Ionen, die relativ häufig auftreten, aber so gut wie keine Sequenzinformation beinhalten. Eine Übersicht über sämtliche auftretenden Ionen zeigt Tab. 4-7.

Tab. 4-7: Übersicht über die entstehenden Fragment-Ionen.

Angegeben sind die absolute Anzahl der entstandenen Fragment-Ion-Typen, die Zahl nicht zugeordneter Signale in den Spektren, sowie die prozentualen Anteile. ⁰,* und † kennzeichnen den jeweiligen Ionentyp mit Neutralverlusten von H₂O, NH₃ oder CO.

Fragment-Ionen-Typ	Anzahl	%
b-Ion	46.969	5,9
b⁰-Ion (Neutralverlust von H₂O)	11.968	1,5
b*-Ion (Neutralverlust von NH₃)	13.227	1,7
a-Ion (Neutralverlust von CO)	26.818	3,4
y-Ion	38.695	4,9
y⁰-Ion (Neutralverlust von H₂O)	12.083	1,5
y*-Ion (Neutralverlust von NH₃)	13.203	1,7
i-Ion (Immonium-Ion)	52.575	6,7
int-Ion (Internes Fragment-Ion)	95.193	12,0
int⁰-Ion (Neutralverlust von H₂O)	37.297	4,7
int*-Ion (Neutralverlust von NH₃)	39.606	5,0
int† (Neutralverlust von CO)	58.275	7,4
nicht zugeordnet	344.486	43,6
Summe	790.395	100

4.6.2 Bruchstatistik in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz

Nicht alle Bindungen zwischen zwei Aminosäuren neigen gleichermaßen zur Fragmentierung, was zu einem erhöhten Auftreten bestimmter Brüche in einem MS/MS-Experiment führt. Die Auswertung der 445.909 Fragment-Ionen ergibt eine 623.705 Bruchstellen umfassende Statistik. Diese beiden Zahlen unterscheiden sich, da jedes interne Fragment die doppelte Menge an Daten liefert und Immonium-Ionen aufgrund der fehlenden Eindeutigkeit ihrer Sequenzzuordnung nicht berücksichtigt werden.

Bedingt durch die Bevorzugung bestimmter Bruchmuster, treten amino- und carboxyterminale Spaltungen an einer definierten Aminosäure nicht gleichverteilt auf (Abb. 4-32). Insbesondere das Prolin zeigt hierbei eine deutliche Diskriminierung der Bruchtendenz an carboxyterminaler Seite, wo nur 39% der Bindungsbrüche stattfinden. Eine Aminosäure mit einer vergleichbaren Präferenz für einen carboxyterminalen Bindungsbruch existiert hingegen nicht. Generell wird beobachtet, dass unpolare Aminosäuren vermehrt die aminoterminaler Fragmentierung fördern, während geladene und polare Seitenketten höhere Anzahlen carboxyterminaler Brüche aufweisen.

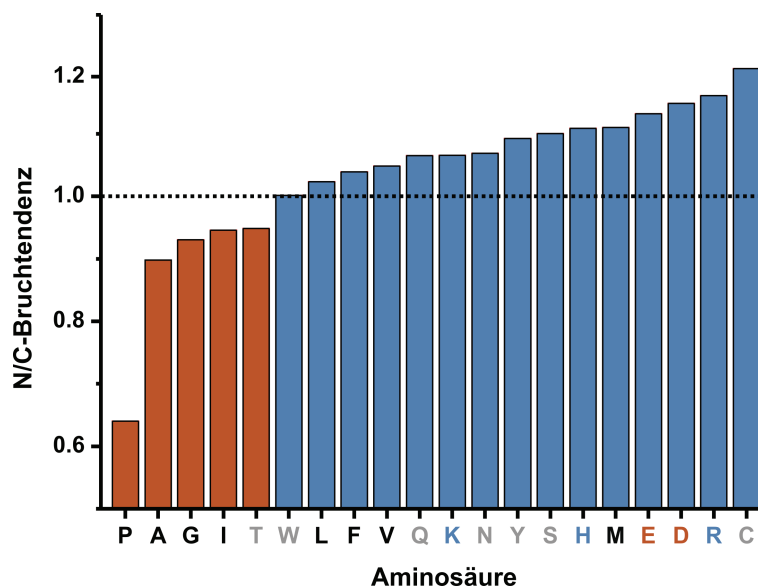


Abb. 4-32: Tendenz des Auftretens amino- und carboxyterminaler Brüche.

Quotient aus der absoluten Anzahl aminoterminaler und carboxyterminaler Brüche um eine definierte Aminosäure. Unpolare Aminosäuren sind schwarz, polare grau, basische blau und saure rot markiert.

Ein generell gehäuftes Auftreten von Brüchen ist zwischen zwei ubiquitären Aminosäuren zu verzeichnen. Neben der bereits erwähnten gerichteten Fragmentierung an Prolin, sind viele Fragment-Ionen zu sehen, für deren Entstehung Spaltungen vor oder nach Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin oder Leucin Voraussetzung sind (Abb. 4-33A).

Wird das Vorkommen der einzelnen Aminosäuren in den Peptiden des verwendeten Datensatzes berücksichtigt, können die verschiedenen Spaltereignisse besser miteinander verglichen werden (Abb. 4-33B). Es ist deutlich zu sehen, dass die Xxx-Pro-Brüche, insbesondere His-Pro, dominieren und das gesteigerte Auftreten der Fragmentierung an häufig vorkommenden Aminosäuren relativiert wird. Auch andere Aminosäure-Motive bevorzugt gespalten, die Abfolgen Tyr-Trp, His-Asn, Trp-Asn und Val-His erscheinen besonders labil.

Neben der absoluten Häufigkeit eines Bruchs kann auch eine Analyse des jeweils intensivsten Signals im MS/MS-Spektrum Aufschluss über eine Bevorzugung bestimmter Aminosäure-Kombinationen geben. Die Fragmente der bereits erwähnten Xxx-Pro-Brüche stellen in vielen Spektren die intensivsten Signale dar, aber auch sämtliche Fragmente, die durch Asp-Xxx-Spaltung entstehen sind oft sehr dominant (Abb. 4-30C). Ansonsten gibt es keine weiteren Aminosäure-Dupletts, die hervorstechend an der Entstehung des *Base Peaks* beteiligt sind.

A

Aminosäure nach Bruchstelle

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
A	4290	0	3237	2991	1238	4519	968	2651	946	3514	218	935	6817	2642	1325	708	1608	2591	420	1314	42932
C	0	0	0	0	77	0	0	0	0	18	0	120	0	0	0	0	127	0	11	353	
D	4036	0	3770	2637	3049	4790	966	2570	1737	3596	458	1810	3692	2179	2321	1901	1853	4014	1516	1866	48761
E	4448	0	3215	2747	2615	2761	1978	2626	1126	3968	615	1856	4245	3329	2685	1830	3432	2109	1362	1522	48469
F	1509	0	3156	2733	856	4602	559	901	1586	2648	287	1080	1715	699	1567	1227	1780	1542	765	794	30006
G	3365	93	2181	5137	2317	6088	1026	2617	1023	3897	532	1644	3010	1975	2093	2481	5375	5294	1009	2133	53290
H	811	116	890	689	549	937	264	561	7	914	310	1803	3937	426	443	383	605	1046	88	369	15148
I	2231	0	1898	1932	2004	2680	619	1010	512	2751	342	1935	3035	977	699	960	2134	1319	1171	855	29064
K	826	0	1271	1635	1329	1059	301	832	821	1053	247	733	1143	551	735	458	303	1050	255	1114	15716
L	5451	0	3475	3585	2629	6342	1151	2021	1000	5017	370	3227	6108	2235	2729	1810	3487	3080	395	1081	55193
M	660	0	742	534	110	828	92	530	188	363	109	480	746	258	181	205	695	352	90	65	7228
N	1554	0	2054	1293	1865	1354	453	825	764	2577	728	923	3115	2151	1872	2550	2610	1916	824	976	30404
P	2073	5	3013	4829	2467	2361	524	1606	813	2624	461	905	1536	1501	3046	2445	1773	2200	666	2916	37764
Q	2024	0	1207	1310	1534	1771	361	2192	651	4615	156	2355	3221	1616	1766	1776	1330	1052	173	2356	31466
R	4346	0	2216	2126	851	2608	397	1133	738	2146	305	2040	4317	1441	443	2101	1204	1587	706	985	31690
S	1929	0	1783	1249	1630	3089	223	1708	256	2074	229	1247	2060	1201	1229	1217	1801	1832	1546	2220	28523
T	1265	77	3143	2755	1717	3042	733	2525	822	4050	264	1352	2792	892	1406	1002	1443	2186	504	859	32829
V	3040	0	2778	2583	1301	5398	2262	2184	866	4673	620	679	3937	3241	923	2223	1884	3911	620	987	44110
W	994	0	404	835	280	1047	289	1545	434	2066	92	1929	1361	651	711	221	258	1244	186	340	14887
Y	2951	0	1719	911	541	1912	496	694	460	1375	169	1391	2187	1581	919	429	1029	3618	2571	919	25872
Summe	47803	291	42152	42511	28882	57265	13662	30731	14750	53939	6512	28444	58974	29546	27093	25927	34604	42070	14867	23682	623705

alle Fragmente

B

Aminosäure nach Bruchstelle

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
A	100	-	85	80	50	93	72	108	109	82	35	41	194	118	51	28	56	73	38	65
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	106	-	112	79	137	111	97	118	143	94	82	89	118	109	96	85	72	127	153	104
E	119	-	97	83	119	65	200	121	94	102	112	92	138	169	118	84	136	68	139	86
F	60	-	142	125	59	162	85	63	198	105	78	80	83	53	97	84	102	74	117	67
G	69	-	51	121	82	109	80	94	66	80	75	63	75	77	71	87	162	131	80	93
H	72	-	89	70	83	73	89	87	2	81	187	298	425	72	65	58	69	112	30	69
I	91	-	87	89	139	96	95	71	65	111	94	146	150	75	44	67	129	64	182	73
K	60	-	105	136	166	68	84	106	188	76	123	100	94	76	88	57	33	92	71	172
L	127	-	91	95	104	129	100	78	73	116	58	140	172	97	104	72	116	85	35	53
M	105	-	133	97	30	116	56	146	94	57	118	142	144	78	47	56	158	67	55	22
N	68	-	101	64	139	52	75	62	104	111	216	74	165	178	134	190	169	94	132	90
P	59	-	96	156	120	59	57	79	72	74	89	48	53	81	143	119	72	75	73	175
Q	90	-	60	66	117	69	61	169	90	204	47	192	174	136	129	135	88	56	29	218
R	168	-	96	88	56	88	58	76	79	79	80	146	202	103	28	137	69	71	104	80
S	77	-	81	57	112	107	34	119	32	81	62	93	100	91	79	81	107	88	233	188
T	44	-	123	109	97	93	97	152	89	137	62	87	118	59	75	60	74	88	67	63
V	86	-	83	83	59	134	241	107	76	130	114	36	134	173	43	107	73	130	67	59
W	87	-	41	85	43	83	98	241	122	184	56	322	148	111	105	34	34	131	64	65
Y	146	-	96	51	46	83	93	59	71	68	57	128	132	149	73	36	76	215	488	96

alle Fragmente relativ

C

Aminosäure nach Bruchstelle

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
A	24	0	9	4	7	17	4	10	0	7	1	0	88	6	7	2	13	13	1	10	223
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	113	0	40	90	130	241	65	118	36	166	14	82	230	83	100	93	71	150	111	78	2011
E	53	0	5	8	18	58	9	20	10	20	6	12	147	14	62	11	22	11	14	12	512
F	9	0	7	0	1	21	1	1	7	13	0	6	36	0	2	0	5	10	4	2	125
G	7	0	4	3	3	12	6	4	4	15	0	5	5	1	4	8	12	6	10	5	114
H	3	0	2	1	8	9	4	5	0	6	6	9	132	0	0	1	3	6	1	3	199
I	17	0	9	1	8	31	2	5	1	16	3	3	41	7	2	7	27	4	0	15	199
K	3	0	2	6	8	3	3	1	4	5	0	4	15	2	2	0	2	3	3	1	67
L	36	0	10	8	24	34	19	17	2	40	2	12	148	10	9	7	4	12	4	14	412
M	9	0	0	4	0	2	0	0	1	0	0	1	19	1	1	4	14	1	0	2	59
N	3	0	3	5	0	9	5	5	1	5	2	3	52	5	5	13	4	10	5	2	137
P	5	0	6	6	12	5	0	4	0	8	0	1	0	6	4	3	5	4	3	5	77
Q	6	0	2	4	5	11	5	3	1	15	0	2	53	13	0	4	3	3	1	8	139
R	16	0	5	5	6	10	4	4	4	6	0	14	66	4	4	4	6	12	2	6	178
S	8	0	15	5	11	10	2	6	0	17	2	9	31	6	8	5	19	6	10	9	179
T	8	0	0	4	9	22	2	4	2	15	0	8	39	0	4	0	13	4	4	4	142
V	11	0	7	3	6	37	32	19	4	11	1	7	80	9	4	7	8	19	9	16	290
W	6	0	0	1	4	3	0	0	4	8	2	1	25	2	4	1	1	5	1	3	71
Y	12	0	2	2	6	11	2	5	1	8	0	1	65	1	0	3	1	30	16	8	174
Summe	349	0	128	160	266	546	165	231	82	381	39	180	1272	170	222	173	233	309	199	203	5308

intensivste Fragmente

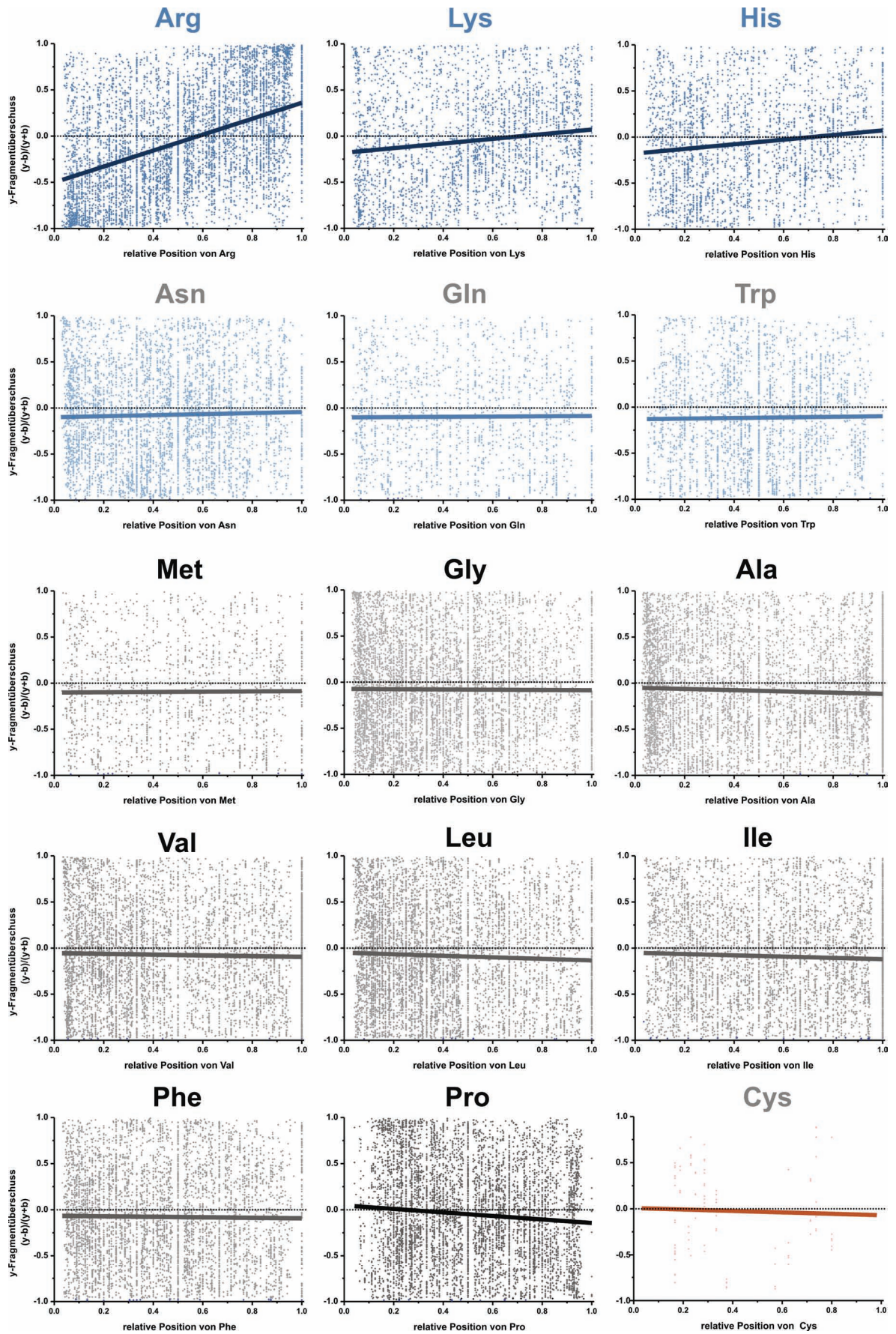
Abb. 4-33: Bruchstatistik des MS/MS-Datensatzes.

(A) Absolute Anzahl aller vorkommenden Brüche bei der Entstehung von Fragment-Ionen (B) Alle vorkommenden Brüche normalisiert durch Einbezug des Aminosäure-Vorkommens in den untersuchten Peptiden. Aufgrund seiner Seltenheit wird Cystein nicht berücksichtigt. Alle Angaben sind relativ zum Vorkommen einer Ala-Ala-Spaltung, die auf den Wert 100 gesetzt wird. Die relative Häufigkeit der Aminosäure innerhalb der Peptidsequenzen ist zusätzlich angegeben. (C) Identische Statistik wie (A), die nur das intensivste Signal jedes Spektrums berücksichtigt. In allen Diagrammen sind die N-terminalen Aminosäuren links und die C-terminalen oben aufgeführt.

4.6.3 Gerichtete Fragmentierung im Bezug auf bestimmte Aminosäuren

Nachfolgend wird untersucht, inwiefern die Position bestimmter Aminosäuren die Entstehung der beiden prominentesten Fragmentationstypen b und y beeinflusst. Hierzu wird der Intensitätsüberschuss einer Ionensorte (y-b) bezogen auf die Gesamt-y/b-Ionenintensität (y+b) gegen die relative Position der Aminosäure in der Peptidsequenz aufgetragen (Abb. 4-34). Spektren ohne y-Ionen besitzen folglich den Wert -1,0; solche ohne b-Ionen den Wert 1,0. Die Steigung m der entsprechenden Regressionsgerade kann als Maß für den Zusammenhang zwischen der Aminosäure-Position und der Prominenz einer bestimmten Ionenserie angesehen werden. Positive Werte drücken intensive y-Ionen mit der besagten Aminosäure aus, negative Werte ein entgegengesetztes Verhalten. Nimmt die Aminosäure keinen Einfluss ist die Steigung nahe Null angesiedelt. Während sich bei den basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin weitgehend punktsymmetrische Muster ergeben, wird die negative Steigung der Ausgleichsgerade einiger Aminosäuren (z.B. Asparaginsäure) größtenteils durch das Fehlen von y-Ionen in den Fragmentspektren verursacht, wenn die saure Aminosäure nahe dem Carboxyterminus vorzufinden ist. Ein vergleichbares Verhalten auf Seite der b-Ionen bei aminoterminaler Lokalisation kann nur sehr schwach beobachtet werden.

Der Schwerpunkt aller Plots befindet sich im negativen Bereich, was auf den leichten Überschuss an b- gegenüber y-Ionen zurückzuführen ist (Tab. 4-7). Der y/b-Quotient zeigt im Mittel keine Abhängigkeit von einer bestimmten Aminosäure und liegt bei den abundanteren Aminosäuren im Intervall zwischen 0,81 und 0,88.



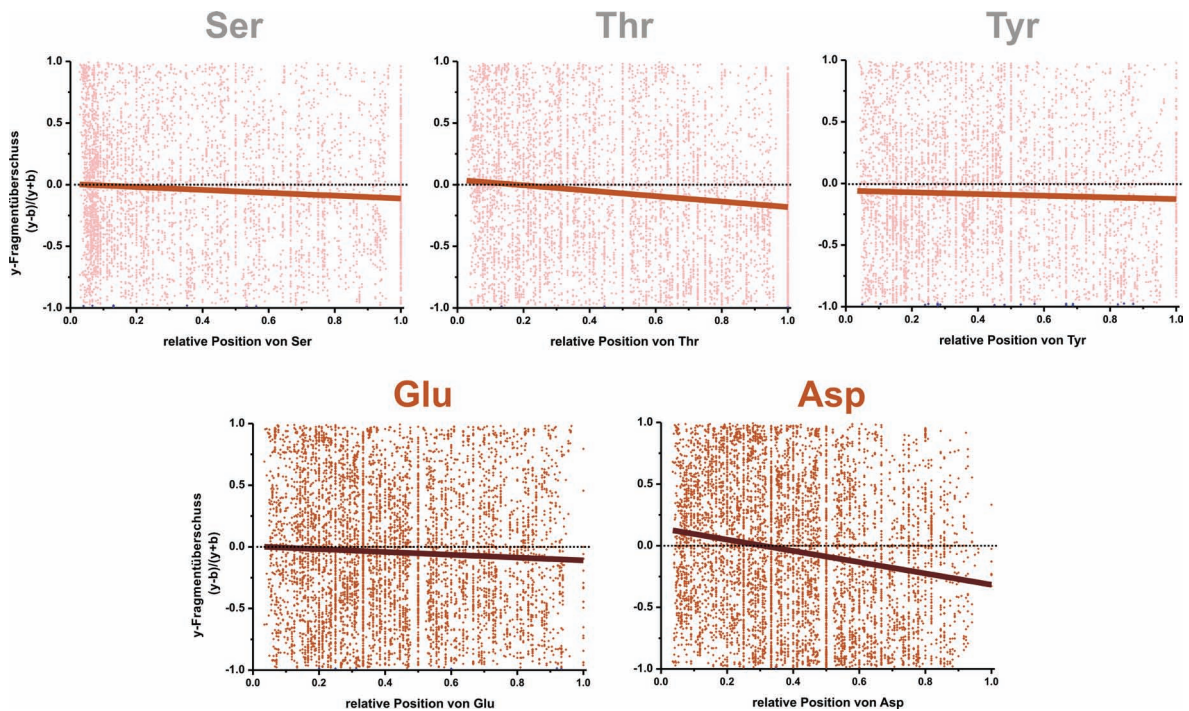


Abb. 4-34: Gerichtete Fragmentierung nach einer definierten Aminosäure I.

Auftragung des y -Intensitätsüberschusses $(y-b)/(y+b)$ von allen 20 proteinogenen Aminosäuren gegen die Position der Aminosäure in der Peptidsequenz auf einer Skala von 0,0 bis 1,0. Die entsprechenden Regressionsgeraden sind eingezeichnet und vermitteln einen Eindruck über die Abhängigkeit der Fragmentierung von der jeweiligen Aminosäure.

Insgesamt korrelieren die Beobachtungen gut mit den physikochemischen Eigenschaften der Seitenketten (Abb. 4-35). Bei Arginin ist diese Abhängigkeit am stärksten ausgeprägt, die anderen beiden basischen Aminosäuren Lysin und Histidin folgen mit einigem Abstand. Die polaren Aminosäuren mit Amidfunktionen Asparagin, Glutamin und Tryptophan weisen nur leicht positive Werte auf, so dass hier kaum von einer Korrelation gesprochen werden kann. Auch die aliphatischen Vertreter mit Ausnahme des Prolins zeigen keine Diskriminierung einer bestimmten Ionenserie. Prolin, die verbleibenden polaren Aminosäuren und auch Glutaminsäure sind weniger in y -Ionen vertreten, so dass in den Spektren gehäuft b -Ionen auftreten. Bei Asparaginsäure ist diese Effekt nochmals deutlicher. Trotz der chemischen Ähnlichkeit von Glutaminsäure und Asparaginsäure weisen sie bezüglich dieses Punktes einen deutlichen qualitativen Unterschied auf.

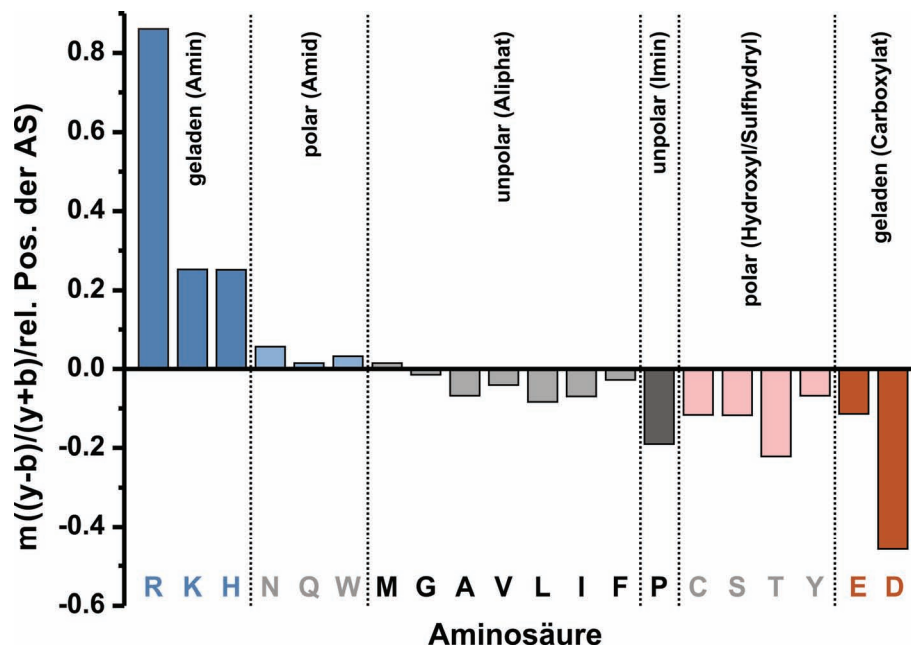


Abb. 4-35: Gerichtete Fragmentierung nach einer definierten Aminosäure II.

Übersicht über die Steigung der Regressionsgeraden aus Abb. 4-34. Die Aminosäuren sind nach den verschiedenen chemischen Eigenschaften der Seitenketten in mehrere Gruppen eingeteilt.

4.7 Andere weniger spezifische Proteasen

4.7.1 PMF-Analyse mit Chymotrypsin, Glu-C, Proteinase K und Pepsin

Neben Elastase als Alternative zu Trypsin wurden auch andere weniger spezifische Proteasen wie Chymotrypsin, Glu-C, Pepsin oder Proteinase K bereits erfolgreich zur Analyse von Proteinen eingesetzt. Anhand von Purpormembran-Verdaus soll evaluiert werden, ob diese Enzyme analog zu dem erarbeiteten Elastase-Protokoll einsetzbar sind oder ob dieses modifiziert werden muss.

Um einen effizienteren Verdau von Membranproteinen zu gewährleisten, wird analog zur Referenz Methanol zu den Standardpuffern hinzugegeben. Die Lösungen zum Verdau mit Proteinase K und Chymotrypsin bestehen aus 60% Methanol und 40% 25 mM ABC, also demselben Puffer, der auch für die elastatischen und tryptischen Experimente eingesetzt wird. Bei Chymotrypsin werden zusätzlich noch 5 mM CaCl_2 zugesetzt, um ausreichend Calcium-Ionen als Enzym-Cofaktor bereitzustellen. In Verdaus mit Glu-C wird anstatt des Ammonium-Bicarbonat- ein 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Puffer verwendet. Durch diese Maßnahme wird die Aktivität des Enzyms durch Hydrogencarbonat-Ionen nicht herabgesetzt. Es wird zusätzlich eine erweiterte Spezifität der Protease erhalten, denn neben Glu wird in diesem Milieu auch vereinzelt nach Asp gespalten. Während die bisher erwähnten Enzyme alle ausreichend Aktivität in Anwesenheit von 60% Methanol aufweisen, ist eine Spaltung mit Pepsin bei dieser Menge an organischem Lösungsmittel nicht mehr möglich. Oberhalb von 10% Methanol ist dessen Leistungsfähigkeit stark eingeschränkt, weshalb nur diese Menge eingesetzt werden kann. Da Pepsin im Gegensatz zu allen anderen eingesetzten Proteasen ein saures Milieu erfordert, wird kein basischer Puffer eingesetzt, sondern mit 0,1% TFA angesäuert. Um die bestmögliche PMF-Zuordnung der einzelnen Signale zu erhalten, werden die Messungen an einer MALDI-Orbitrap ausgeführt. Die PMF-Resultate sind in Tab. 4-8 zusammengefasst, als Referenz werden auch die Werte eines identisch erhaltenen Elastase-Verdaus aufgeführt.

Tab. 4-8: PMF-Daten und Parameter zum PM-Verdau mit alternativen Proteasen.

Die verwendete Suchspezifität und -genauigkeit ist aufgeführt, ebenso die zugeordneten Peptide und die daraus resultierende BR-Sequenzabdeckung.

	Probe				Referenz
	Chymotrypsin MeOH/ABC	Glu-C MeOH/AP	Proteinase K MeOH/ABC	Pepsin MeOH/TFA	Elastase MeOH/ABC
Suchspezifität	FLYW	DE	keine	keine	AVILTS
Suchgenauigkeit		5 ppm			5 ppm
Eindeutige BR-Peptide	17	0	24	29	33
Sequenzabdeckung BR	49,8%	0%	43,4%	66,7%	61,0%
Peptide Autolyse	3	11	28	19	12
BR-Peptidliste	Tab. 9-14A	-	Tab. 9-14B	Tab. 9-14C	Tab. 9-14D

In Verbindung mit dem methanolischen Puffersystem lassen sich mit Chymotrypsin gute Ergebnisse erzielen (Abb. 4-36A). Die Protease ist effektiver als Trypsin, was nicht zuletzt an der für Bacteriorhodopsin geeigneteren Spezifität liegt. Die Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Tyrosin und Tryptophan sind relativ hydrophob und somit viel häufiger in Membranproteinen anzutreffen als Lysin und Arginin. Die abgedeckten Sequenzbereiche ähneln denen des Elastase-Verdau, nur vom C-Terminus sind keine Peptide zu detektieren. Der chymotryptische Eigenverdau ist bei dem gewählten Enzym-zu-Protein-Verhältnis von 1:50 vernachlässigbar gering und nicht störend.

Die Protease Glu-C ist nicht zur Proteolyse von Bacteriorhodopsin aus Purpurmembranen zu gebrauchen, denn es wird kein einziges nachweisbares Bacteriorhodopsin-Peptid produziert (Abb. 4-36B). Der überwiegende Teil der erhaltenen Peptide stammt von der Autoproteolyse des Enzyms, selbst ein Wechsel des Puffers oder die Verringerung des Methanolgehalts schafft keine Verbesserung. Lösliche Proteine wie Cytochrom c lassen sich hingegen gut mit Glu-C verdauen, hierbei werden ähnliche Sequenzabdeckungen wie bei tryptischen Verdau erreicht.

Bei Verwendung der weitgehend unspezifischen Proteinase K können sämtliche hohen Signale im Spektrum Bacteriorhodopsin-Peptiden zugeordnet werden (Abb. 4-36C). Allerdings sind nur sehr wenige größere Peptide zu detektieren, was auf die hohe Aktivität des Enzyms und das Fehlen spezifischer Schnittstellen zurückzuführen ist. Das Fehlen jeglicher Spezifität ist extrem unvorteilhaft für die PMF-Zuordnung der Peptide, da zahlreiche Doppelzuordnungen auftreten, die nicht immer von derselben Sequenzregion stammen. Eine komplett unspezifische Suche ohne MS/MS-Experimente gegen eine

größere Datenbank ist bei der vorliegenden Massengenauigkeit heute noch nicht möglich. Die im direkten Proteinabgleich gefundenen Peptide stammen aber aus den gleichen Sequenzbereichen wie bei Elastase, was ein zusätzliches Indiz für ihre Richtigkeit darstellt.

Als letzte Protease wird Pepsin evaluiert, das sich von Aufbau und dem Mechanismus der Katalyse grundlegend von den anderen Enzymen unterscheidet. Obwohl aufgrund eingeschränkter Kompatibilität des Enzyms nur ein geringer Anteil Methanol im Puffer vorliegt, können mit einem peptischen Verdau zahlreiche Bacteriorhodopsin-Peptide identifiziert werden (Abb. 4-36D). Die Autoprotolyse ist geringfügig ausgeprägter als bei Elastase, liegt aber noch im Rahmen. Mit Pepsin kann sogar eine höhere Sequenzabdeckung als mit Elastase erzielt werden. Die erste Hälfte des Proteins ist nahezu vollständig abgedeckt, zusätzlich tritt noch ein großer Peptidcluster am C-Terminus auf. Allerdings kann mit der für Pepsin geläufigen Suchdefinition FL keine größere Peptidzahl zugewiesen werden, so dass auch hier komplett ohne Spezifität zugeordnet werden muss. Viele der intensiveren Peptide im Spektrum weisen Schnitte außerhalb der Spezifitätsdefinition auf, insbesondere treten hierbei Schnitte nach Threonin und Glycin auf.

Als Referenz wird auch der elastatische Verdau nochmals mit dem MALDI-Orbitrap-Instrument gemessen. Die höhere Massengenauigkeit erlaubt eine bessere Zuordnung, so dass einige potentiell falschpositive Peptide entfernt und einige neue zugeordnet werden können. Grundsätzlich ändert sich dadurch aber nicht das Bild der abgedeckten Proteinsequenz. Lediglich Stellen, an denen nur ein einzelnes Peptid identifiziert wird, zeigen Unterschiede zwischen den beiden Experimenten.

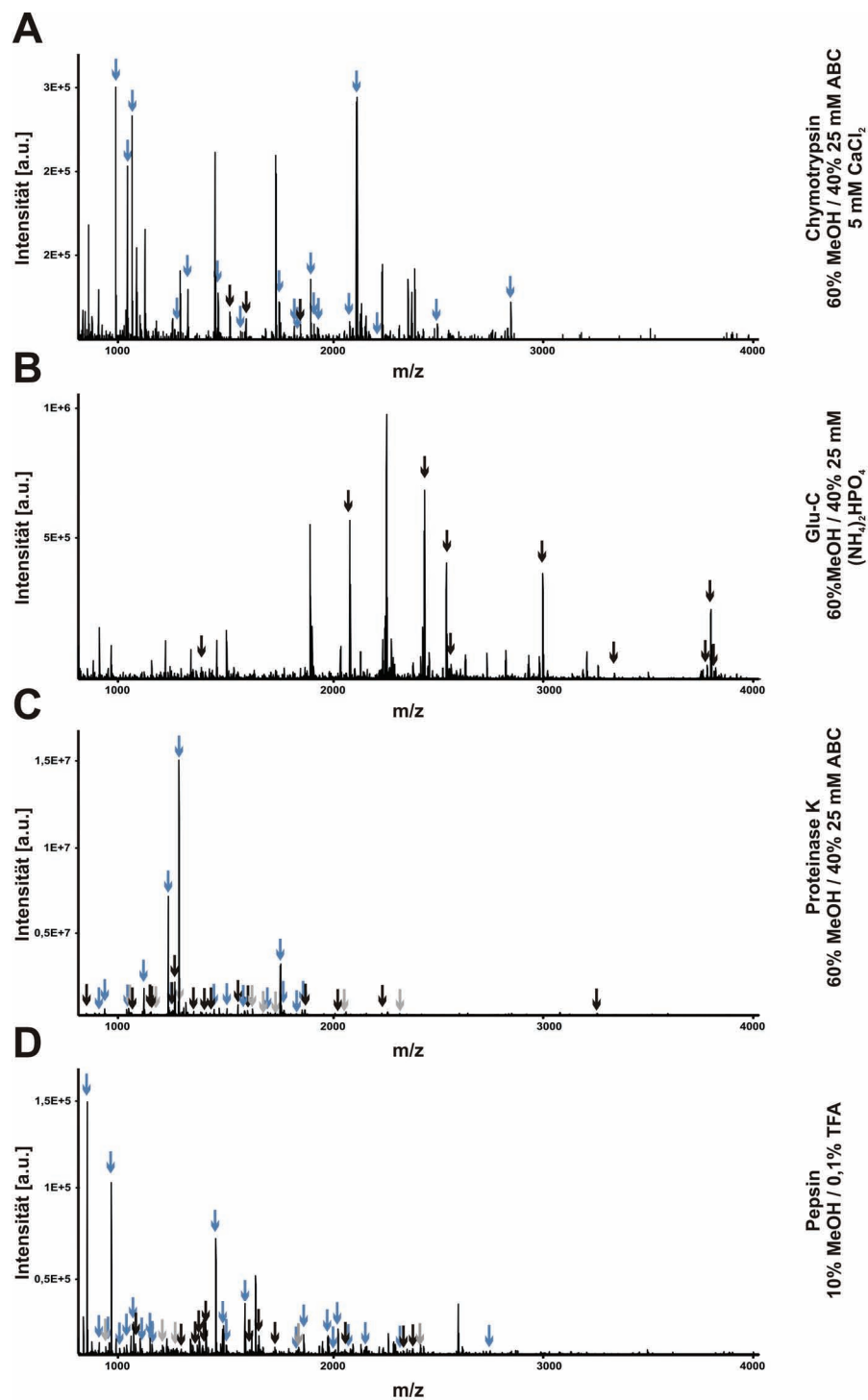


Abb. 4-36: Spektren von Purpormembran-Verdaus mit alternativen Proteasen.

MALDI-Orbitrap-MS-Spektren eines Verdaus von Purpormembranen mit Chymotrypsin (A), Glu-C (B), Proteinase K (C) und Pepsin (D). Blaue Pfeile markieren Peptide, die der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz zugeordnet werden. Schwarze Pfeile kennzeichnen Autoproteolysepeptide, graue Pfeile Signale, die mehreren Sequenzen zugeordnet werden. (S/R 3; *Fit Factor* 44%, *Remainder* 35%)

4.7.2 Vergleich mit dem Pepsin-Referenzprotokoll

Pepsin stellte sich im PMF-Vergleich als verheißungsvoller Kandidat zur Membranproteomanalyse heraus. Trotz geringer Methanol-Konzentration im Puffer konnten zahlreiche Peptide des Modellproteins Bacteriorhodopsin detektiert werden. Weiterhin spricht die Kompatibilität zu sauren Lösungsmittelsystemen für einen Einsatz von Pepsin, da sich dadurch neue Anwendungsmöglichkeiten ergeben. Problematisch hingegen ist die unzureichende Spezifität, welche Datenbanksuchen erschwert. Das klassische Protokoll für peptische Verdaus setzt Ameisensäure als saures Reagenz ein, um die Lösung in den optimalen pH für die enzymatische Aktivität zu bringen. Die hierfür eingesetzte Konzentration von 10% ist allerdings nicht mit der für MALDI-Messungen erforderlichen Probenpräparation kompatibel, so dass eine zwischengeschaltete Aufreinigung der Probe notwendig ist. Weiterhin kann Ameisensäure bei längerer Exposition die Peptide chemisch modifizieren und unerwünschte Artefakte produzieren.

Ein Alternativprotokoll, bei dem sie durch TFA ersetzt wird ist im letzten Kapitel vorgestellt worden. Neben dem Säureaustausch ist bei den PMF-Versuchen auch 10% Methanol zugesetzt worden, um die Löslichkeit hydrophober Proteine und Peptide im Puffer zu verbessern. Schon makroskopisch lassen sich Unterschiede zwischen beiden Proben ausmachen. Die Ameisensäure-haltige Probenpräparation ist deutlich inhomogener, weist größere Matrixkristalle auf und ist von einem glänzenden Schimmer überzogen. Um den negativen Einfluss auf die MALDI-Messung zu demonstrieren, werden zwei Vergleichsspektren aufgenommen (Abb. 4-37). Das MeOH/TFA-Spektrum zeigt um den Faktor 10 intensivere Peptidsignale, dementsprechend werden auch mehr als doppelt so viele BR-Peptide detektiert. Einige Peptide im hohen Massenbereich der Referenzprobe sind im MALDI-TOF-Spektrum des modifizierten Verdauprotokolls nicht mehr zu sehen. Bei der Messung im PMF-Experiment auf der MALDI-Orbitrap waren sie hingegen sichtbar. In der später vorgestellten nLC-MS/MS-Analyse der identischen Probe werden sie aber alle signifikant identifiziert. Auffällig ist auch das Auftreten zweier intensiver Signale, die von einem Peptid mit bis zu zwei oxidierten Tryptophan-Resten stammen. Diese Oxidation der Indolstruktur zum *N*-Formylkynurenin ist bislang nur in den peptischen Verdaus zu beobachten gewesen und setzt wahrscheinlich das saure Milieu voraus.

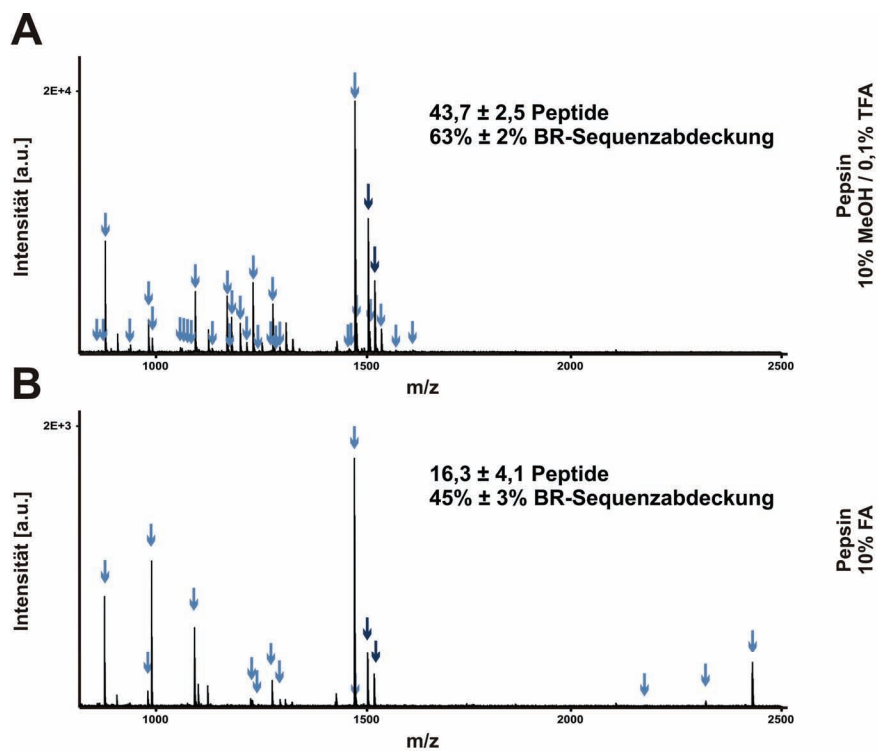


Abb. 4-37: Spektren von peptischen Purpirmembran-Verdaus.

MALDI-TOF-MS-Spektren zweier PM-Verdaus mit Pepsin unter Anwendung des modifizierten (A) oder des Referenzprotokolls (B). Blaue Pfeile markieren Peptide, die der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz zugeordnet werden. Dunkelblaue Pfeile kennzeichnen Signale des *Base Peak*-Peptids mit oxidierten W-Resten. Zusätzlich sind noch die im PMF erhaltenen Peptidzahlen und die Bacteriorhodopsin-Sequenzabdeckung angegeben. (20 ppm Suchgenauigkeit, keine Suchspezifität, min. S/R 10, 1 pmol/μl BR).

4.7.3 Peptische nLC-MALDI-MS/MS-Analyse von PM

Mit Pepsin lassen sich mit Elastase gleichwertige Ergebnisse hinsichtlich der Charakterisierung des Modell-Membranproteins Bacteriorhodopsin erzielen. Es stellt sich die Frage, ob die Protease ähnlich gut für die Untersuchung komplexerer Proteingemische geeignet ist. Um dies herauszufinden werden die mit dem modifizierten Pepsin-Protokoll verdauten Purpurmembranen per nLC aufgetrennt und mittels MALDI-MS/MS analysiert. Der Ersatz von Ameisensäure durch TFA erlaubt ein direktes Injizieren der verdauten Probe auf die Vorsäule, lediglich das Volumen der Probe muss vorher durch Vakuumzentrifugation reduziert werden. Die erhaltenen Resultate werden anschließend kurz mit der elastatischen Referenz verglichen, auch wenn hier eine abweichende Probencharge, mehr Proteinmenge und ein anderes nLC-System zum Einsatz kommen. Da hier MS/MS-basierte Suchen vorliegen, stellt auch die unzureichende Spezifität von Pepsin kein Problem dar, wie es bei den PMF-Analysen der Fall war. Eine Übersicht sämtlicher Ergebnisse und Parameter zu diesem Versuch zeigt Tab. 4-9.

Tab. 4-9: Vergleich von peptischen und elastatischen PM-Verdaus per nLC-MALDI-MS/MS.

Angegeben sind diverse experimentelle Parameter sowie die Resultate auf Peptid- und Proteinebene.

	Probe	Referenz
	PM	PM
	Pepsin	Elastase
	MALDI	MALDI
Technische Replikate	4	6
nLC / Gradient	Proxeon / 80 min	Agilent / 135 min
Suchspezifität	keine	keine
Datenbank	SP09	SP07
Probenmenge	50 µg	25 µg
Precursor-Genauigkeit	30 ppm	30 ppm
Fragment-Genauigkeit	0,3 Da	0,3 Da
Peptide (Mittelw. ± σ) / Lauf	301.2 ± 30.2	229 ± 49
Peptide gesamt (ohne Autolyse-Peptide)	509	507
Falschpositivenrate	4,1%	3,3%
Proteine (Mittelw. ± σ) / Lauf	46.5 ± 3.7	58 ± 13
Proteine gesamt (min. 1/2 Peptide)	69/34	165/56
Proteine mit exakt 1 Peptid	35	109
BR Mascot Protein Hit Nr.	2	1
BR-Peptide	68	120
BR-Sequenzabdeckung	63,7%	75,1%
Autolyse-Peptide	5	166
BR-Peptidliste	Tab. 9-15	Tab 9-11B
Proteinliste	Tab. 9-5	Tab. 9-1B

Hervorzuheben ist vor allem die geringe Anzahl an peptischen Autolyse-Peptiden, die bei übermäßigem Vorkommen wertvolle nLC-Kapazität in Anspruch nehmen. Selbst bei nLC-Experimenten mit dimethyliertem Trypsin, welches sehr geringen Eigenverdau zeigt, sind oft mehr Protease-Peptide nachzuweisen als bei der Verwendung von Pepsin. Für die geringe Rate an Selbstverdau ist das niedrigere Enzym-zu-Protein-Verhältnis verantwortlich, welches aufgrund der höheren Reinheit des kommerziell erhältlichen Pepsins möglich ist. Allgemein liefern die Pepsin-Verdaus pro Lauf mehr identifizierte Peptide als die Elastase-Referenz, dagegen fallen die Proteinzahlen deutlich geringer aus. Als weiterer Unterschied zu den elastatischen Ergebnissen ist CSG in der Datenbanksuche der beste Proteintreffer und nicht das hochabundante Bacteriorhodopsin. Ob diese Differenzen durch die normale biologische Varianz zweier Probenpräparationen verursacht werden oder tatsächlich an der verwendeten Methode liegen, lässt sich nicht eindeutig klären. Die 68 detektierten Bacteriorhodopsin-Peptide führen zu 63,7% Sequenzabdeckung. Wie auch beim PMF stammen zahlreiche Peptide vom C-Terminus des Proteins und von den bereits aus den Elastase-Versuchen bekannten Sequenzbereichen (Abb. 4-38). Auch durch einen Wechsel der Protease ist kein Peptid der schwer zugänglichen Helix E nachzuweisen. Der Versuch zeigt, dass auch mittels Pepsin eine umfassende Analyse eines Membranproteoms vorgenommen werden kann.

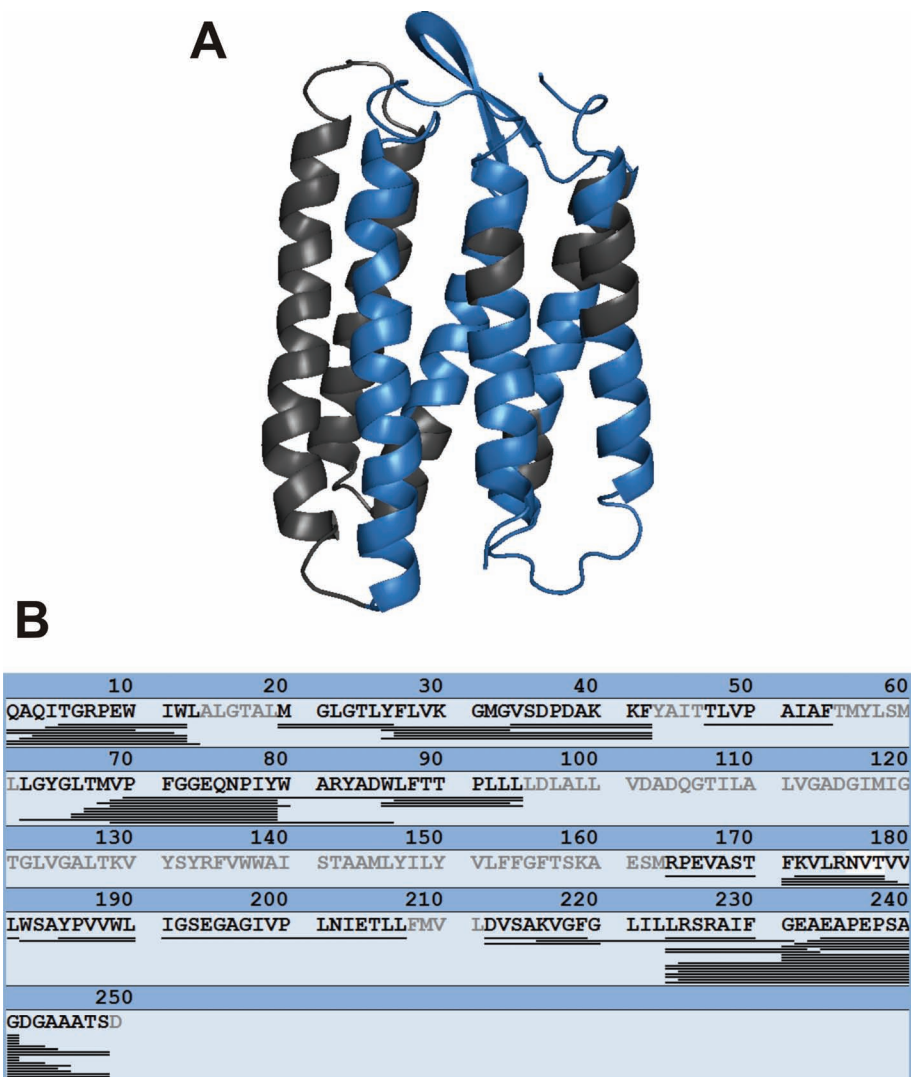


Abb. 4-38: Sequenzabdeckung von BR bei peptischer nLC-MALDI-MS/MS-Analyse.

(A) 3D-Sekundärstrukturmodell von Bacteriorhodopsin. Die Bereiche, welche durch peptische Peptide abgedeckt sind, sind blau hervorgehoben. Aus den schwarzen Proteinbereichen werden keine Peptide identifiziert. (B) Position der identifizierten Peptide in der Bacteriorhodopsin-Proteinsequenz bei der Verwendung von Pepsin als proteolytisches Enzym (3D-Strukturmodelle siehe Tab. 3-10).

4.7.4 Spezifitätsanalyse von Pepsin

Um eine genaue Aussage über die peptischen Spezifität unter den vorliegenden Bedingungen zu treffen, wird der 1.018 Schnitte umfassende peptische Datensatz ausgewertet. Die carboxyterminal am häufigsten gespaltene Aminosäure ist Leucin, gefolgt von Alanin, Phenylalanin und Glutaminsäure. Diese vier Aminosäuren umfassen ca. 55% der Schnitte der Protease und stellen die einzig sinnvolle Spezifität dar, da das Ausmaß an Hydrolyse nach den neun folgenden Aminosäuren relativ gleich ist (Abb. 4-39A). Nach Isoleucin, Valin, Lysin und Arginin wird nur selten gespalten, nach Cystein, Histidin und Prolin überhaupt nicht. Die spezifitätsbestimmende Bindetasche des Pepsins kann also zwischen Leucin, Valin und Isoleucin strikt unterscheiden, was angesichts des geringen Unterschiedes von nur einer Methylgruppe beachtlich ist. Eine aminoterminal Abhängigkeit der Schnittspezifität kann nicht festgestellt werden (Abb. 4-39B) Insgesamt ist die peptische Spezifität zwischen der von Elastase und Proteinase K angesiedelt und leider etwas zu gering um damit PMF-Suchen zu unterstützen.

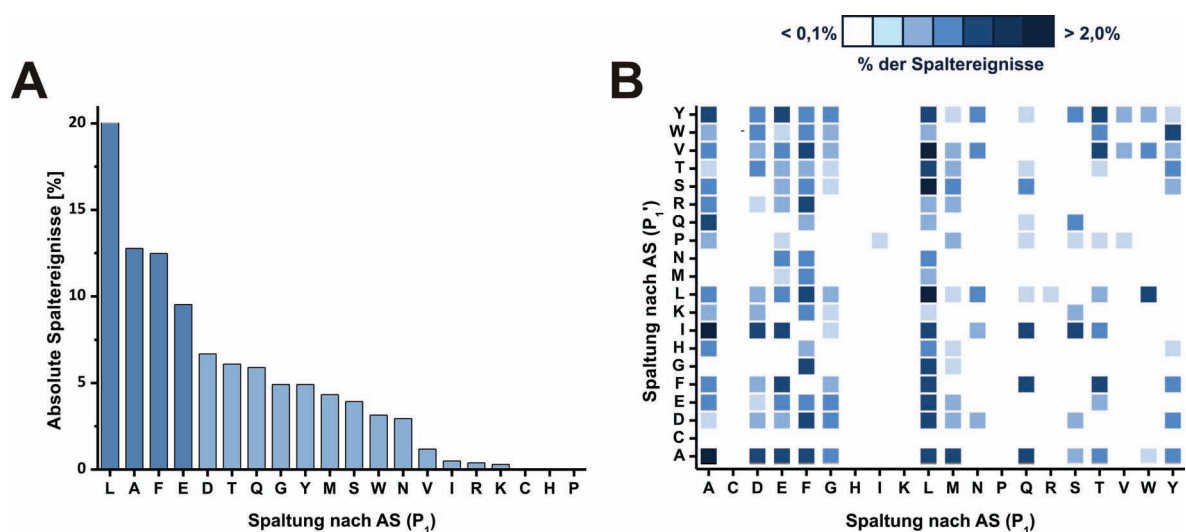


Abb. 4-39: Peptische Spezifität basierend auf 509 ausgewerteten Peptiden.

Absolute (**A**) Schnitthäufigkeit nach bestimmten Aminosäuren. (**B**) 2D-Spezifitätsplot der absolut die Schnittfrequenz zwischen zwei Aminosäuren angibt.

Kapitel 5

DISKUSSION



5. Diskussion

5.1 Elastase im Membranproteomics-Einsatz

5.1.1 Charakterisierung und Spezifitätsanalyse

Die Etablierung einer auf Elastase basierenden *Shotgun Proteomics*-Methode speziell für die Untersuchung von Membranproteinen bildet das Hauptziel dieser Arbeit. Bei Elastase scheint es sich um ein dafür besonders geeignetes Enzym zu handeln, da insbesondere spezifitätsbedingte Nachteile anderer Proteasen nicht vorliegen. Anhand der gesammelten Daten von zwei untersuchten Membranproteomen kann eine umfassende Charakterisierung der elastatischen Spezifität vorgenommen werden.

Elastase zeigt zu ca. 70% eine auf das Aminosäure-Vorkommen normalisierte relative Spezifität für carboxyterminale Schnitte nach den sechs kleinen hydrophoben Aminosäuren Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Serin und Threonin (Abb. 4-21). Dieser Befund stellt erstmals einen Beleg für die Spezifität anhand tatsächlich untersuchter Proteome dar und deckt sich weitgehend mit Untersuchungen der Spezifität, die mit chromogenen Peptidanaloga oder an Einzelproteinen durchgeführt wurden (Bieth, 1978; Largman, 1983; Takahashi *et al.*, 1989). Gegebenenfalls kann die Spezifitätsdefinition um die Aminosäure Glycin erweitert werden, die Wahrscheinlichkeit für weitere Schnitte außerhalb des Spezifitätsfensters AVILTSG fällt aber deutlich ab. Da es sich bei den genannten um relativ häufig auftretende Aminosäuren handelt, ist zudem eine hohe Verfügbarkeit potentieller Schnittstellen im realen Protein gegeben. Die beobachtete Spezifität lässt sich aus der Geometrie der S_1 -Bindetasche des Enzyms und den daraus resultierenden möglichen Interaktionen mit den Seitenketten bindender Peptide ableiten (Meyer *et al.*, 1988). Die Bindetasche wird nahezu vollständig von dem hydrophoben Peptidrückgrat des Enzyms ausgebildet und zusätzlich durch zwei in die Bindetasche ragende ungeladene Seitenketten blockiert. Fast alle Interaktionen mit der spezifitätsbestimmenden Seitenkette sind demzufolge hydrophober Natur. Zusätzlich liegt noch ein Größenausschluss bei der Erkennung der Seitenkette vor, welcher die Bindung der größeren unpolaren Seitenkettenstrukturen von Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und Methionin verhindert. Die postulierte Spezifitätsdefinition AVILTS(G) berücksichtigt mit

Ausnahme des strukturell einzigartigen Prolins alle Aminosäuren, auf welche die Kriterien klein und relativ hydrophob zutreffen, so dass sich insgesamt ein schlüssiges Bild ergibt (Abb. 5-1). Elastase schneidet deutlich weniger spezifisch als die Referenzprotease Trypsin, auch das lässt sich durch die strukturellen Gegebenheiten der Bindetasche erklären. Die vorliegenden Mechanismen zur Erkennung der P₁-Aminosäure basieren auf hydrophoben Wechselwirkungen, deren zwischenmolekulare Kräfte energetisch schwächer sind als die im Trypsin verantwortlichen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den beiden geladenen Seitenketten (Gráf *et al.*, 1987).

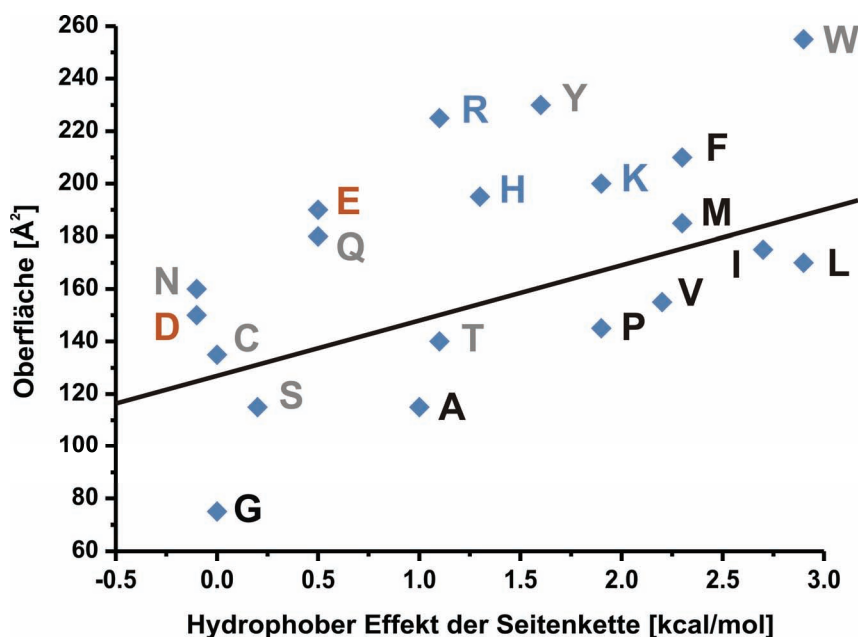


Abb. 5-1: Physikochemische Eigenschaften der Aminosäuren.

Darstellung der Aminosäure-Oberfläche (Chothia, 1975) und des auf Glycin normalisierten hydrophoben Effekts der entsprechenden Seitenkette (Karplus, 1997). Die sich innerhalb der Spezifität von Elastase befindlichen Aminosäuren lassen (außer Prolin) sich klar von den anderen abtrennen, was durch die eingezeichnete Linie dargestellt wird.

Eine zu stark ausgeprägte Proteolyse schränkt den Nutzen einer Protease zur Untersuchung von Proteinen stark ein. Eine übermäßige Spaltung in kleine Peptide oder im Extremfall eine komplette Hydrolyse zu einzelnen Aminosäuren führt zu einem deutlichen Sensitivitätsverlust der gesamten Methode, da sich die Massen der Spaltprodukte außerhalb des üblichen Messbereichs befinden. Trotz der hohen Anzahl möglicher

Schnittmöglichkeiten werden bei Verwendung von Elastase nur vereinzelt Tri- und Tetrapeptide und somit keine vollständige Hydrolyse der Peptide beobachtet. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Bindung einer längeren Peptidkette mit mindestens vier Aminosäuren für eine optimale Aktivität erforderlich ist (Bieth, 1986; Bieth *et al.*, 1989). Dies wird durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt.

In den Bereichen einer Proteinsequenz, an denen gehäuft potentielle Spaltstellen für Elastase auftreten, kristallisieren sich reproduzierbar bevorzugte Schnittpositionen heraus. Die Protease unterscheidet also zwischen verschiedenen „gleichen“ Aminosäuren, was auf andere spezifitätsbestimmende Faktoren außerhalb der S₁-P₁-Interaktion hindeutet. Dies sei exemplarisch an Peptiden verdeutlicht, deren Carboxyterminus sich in der Sequenzabfolge ⁹¹PLLLLD⁹⁶ des Bacteriorhodopsins befindet. Ein Großteil der zahlreichen Peptide aus diesem Sequenzbereich endet mit Leucin 92. Auf die benachbarten Leucine enden nur sehr wenige, auf Leucin 93 sogar kein einziges Peptid. Diese Diskriminierung ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf eine generell erhöhte Zugänglichkeit von Leucin 92 für eine proteolytische Spaltung zurückzuführen, da die Protease Pepsin in diesem Sequenzbereich ein völlig entgegengesetztes Verhalten zeigt. Sie erzeugt keine auf Leucin 92 abschließenden Peptide, sondern spaltet vornehmlich nach Leucin 94 (Abb. 5-2).

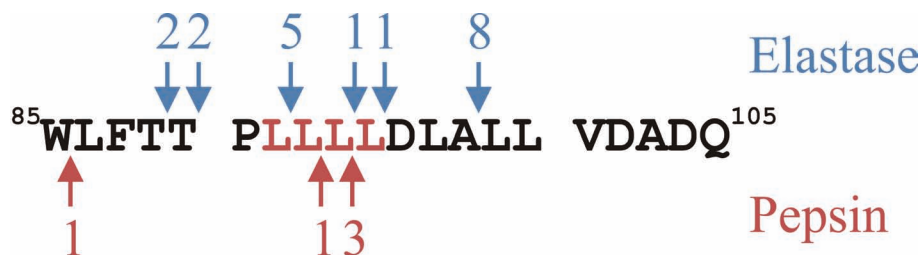


Abb. 5-2: Häufigkeit des Auftretens von Schnitten in einem Leucincluster.

Darstellung des Bacteriorhodopsin-Sequenzbereichs von Aminosäure-Position 85-105. Es sind das Auftreten und die Häufigkeit von elastatischen (blau) und peptischen Schnitten (rot) um vier aufeinanderfolgende Leucinreste dargestellt. An den Stellen ohne Kennzeichnung sind keine enzymatischen Spaltungen zu beobachten.

5.1.2 Verdau von Membranproteinen

Der erforderliche Aufwand zum Umgang mit Elastase in *Proteomics*-Experimenten ist mit anderen gebräuchlichen Proteasen vergleichbar. Mit Expositionszeiten über 16 h lassen sich unter moderatem Schütteln bei einer Inkubationstemperatur von 22°C reproduzierbare Proteinhydrolysate erzeugen (Abb. 4-8). Die Qualität der Ergebnisse leidet nicht unter längeren Verdauzeiten, da die Aktivität des Enzyms anscheinend mit zunehmender Dauer durch seine autoproteolytische Inaktivierung stetig nachlässt. Die Proteasepeptide liegen bei hohen Substratproteinmengen nur als sehr schwache Peptidsignale im Spektrum vor, welche die Auswertung kaum stören (Abb. 4-2D). Durch die Wahl eines angemessenen, nicht zu niedrigen S/R (ca. 20) für die Signalerkennung, kann die überwiegende Zahl an Autoproteolysepeptiden bereits während des Prozessierens des Spektrums aussortiert werden. Nach einigen durchgeführten Experimenten kann zudem eine Ausschlussliste verifizierter Selbstverdaupeptide (Tab. 9-16) erstellt werden, so dass diese in folgenden Datenbanksuchen oder bei der Vorläuferauswahl für MS/MS-Fragmentierung nicht mehr berücksichtigt werden. Das Problem des ungewollten Selbstverdaus besteht bei allen gebräuchlichen weniger spezifischen Proteasen und wird von anderen entsprechenden Membranproteomics-Studien gerne verschwiegen (Wu *et al.*, 2003).

Zum Verdau der Membranproteome ist ein Zusatz von organischen Lösungsmitteln zum Reaktionsansatz zwingend erforderlich, um adäquate Ergebnisse zu erhalten. Dies wird auch bei der Proteolyse des Modellproteins Bacteriorhodopsin deutlich. In rein wässrigen Puffermedien sind nur wenige dem Membranprotein zuzuordnende Peptide nachweisbar, da sämtliche Signale überwiegend von den löslichen Proteinkomponenten der Probe oder anderen Verunreinigungen verursacht werden. Sobald der Verdau aber in gepuffertem 60%-igem Methanol erfolgt, lassen sich mit allen getesteten Serinproteasen bessere Ergebnisse erzielen (Tab. 4-8). Auch andere getestete organische Lösungsmittel zeigen im Verbund mit Elastase deutliche Verbesserungen gegenüber dem wässrigen System, welche die mit Methanol erhaltenen Resultate aber nicht übertreffen (Abb. 4-6). Der positive Effekt ist auf die besonderen Lösungseigenschaften des Methanols zurückzuführen. Diese zerstören die Membranintegrität und erhöhen die Zugänglichkeit des Zielproteins für die Protease (Patra *et al.*, 2006). Zusätzlich wird die Präzipitationsneigung hydrophober Peptide verringert, welche bei der Proteolyse der Proteine entstehen. Obwohl theoretisch alle Proteasen gleichermaßen vom Methanolzusatz profitieren, ist dies bei Elastase besonders prominent. Die Bacteriorhodopsin-Verdaus in Methanol liefern bei Verwendung von Elastase deutlich bessere PMF-Daten als mit der Referenzprotease Trypsin (Tab. 4-1).

Insbesondere nach vorgeschalteter nLC-Auftrennung werden die Vorteile deutlich, die Elastase zur Untersuchung von Membranproteinen bietet. Durch das chromatographische Verfahren ist es möglich, größere Probenmengen einzusetzen und eine genauere Analyse auch wenig abundanter Peptide durchzuführen. In dem tryptischen Purpormembranen-Proteolysat lassen sich mittels nLC-MALDI-MS/MS lediglich vier signifikante BR-Peptide nachweisen (Abb. 5-3A; Tab. 4-2). Es werden folglich noch weniger Peptide erhalten als im tryptischen PMF-Experiment, wobei sich insbesondere das Fehlen des großen aminoterminalen Peptids negativ auf die Sequenzabdeckung auswirkt (Tab. 4-1). Aufgrund seiner Größe von 3328,8 Da und der geringen Peptidintensität im PMF-Spektrum ist der Erhalt eines auswertbaren Fragmentspektrums eher unwahrscheinlich. Ein *in silico*-Verdau des 27 kDa-Proteins Bacteriorhodopsin enthält sechs tryptische Fragmente ohne überlesene Schnittstellen im üblichen Massenbereich moderner MALDI-Massenspektrometer für die Peptidanalytik. Diese Anzahl stellt angesichts der gegebenen Proteingröße einen sehr geringen Wert dar, welcher überwiegend auf das Fehlen geladener Aminosäuren in den hydrophoben Helixbereichen zurückzuführen ist. Als Konsequenz ist das Protein im *Ranking* der Datenbanksuche gegenüber anderen, eigentlich in geringerer Menge vorhandenen Proteinen unterrepräsentiert. Es findet sich in den Suchergebnissen an Position 20 wieder, ein inakzeptables Resultat, wenn bedacht wird, dass es mit über 90 Massenprozent den Hauptteil der untersuchten Probe ausmacht. Dieses Beispiel an einem Modellprotein veranschaulicht eindrucksvoll, welche Probleme bei der Verwendung von Trypsin zur Analyse von Membranproteinen auftreten. Denn auch andere Membranproteine besitzen wenig tryptische Schnittstellen und erleiden folglich eine Unterrepräsentation in der Datenbanksuche.

Wird Elastase zur Hydrolyse der Purpormembranen eingesetzt können 120 Peptide des Bacteriorhodopsins identifiziert werden (Abb. 5-3B; Tab. 4-2). Diese hohe Zahl grenzt das abundante Membranprotein deutlich von den anderen Proteinkomponenten der Probe ab (z.B. von DppA). Lediglich die Autoproteolysepeptide der Elastase sind noch in höheren Stückzahlen vorzufinden. Wird anstatt des nLC-MALDI-Systems das *online*-gekoppelte ESI-LIT-Orbitrap-Instrument zur Detektion verwendet, lassen sich sogar noch mehr Peptide nachweisen. In beiden Datenbanksuchergebnissen führt das Bacteriorhodopsin deutlich die Trefferliste an und spiegelt letztendlich die tatsächlich vorliegende Mengenverteilung des Proteins in der Probe wieder. Die mit Elastase erreichbare Bacteriorhodopsin-Sequenzabdeckung ist mit den in der Literatur dargestellten tryptischen ESI-Daten vergleichbar, allerdings wurde sie dort mit deutlich weniger Peptiden erreicht

(Blonder *et al.*, 2004a). Die Autoren bestätigen allerdings die schlechte Qualität dreier Fragmentspektren von größeren Peptiden, die zu einem großen Teil der Sequenzabdeckung beitragen. Auch andere Publikationen von Bacteriorhodopsin-Untersuchungen beinhalten große proteolytische Fragmente, die entweder im MALDI-Linearmodus gemessen werden mussten oder für die ESI-QIT-Fragmentierung ungeeignete Ladungszustände aufwiesen (Yu *et al.*, 2004). Deshalb erweist es sich als Vorteil, dass zumindest im Falle von Bacteriorhodopsin keine größeren Peptide über 3.000 Da durch Elastase erzeugt werden.

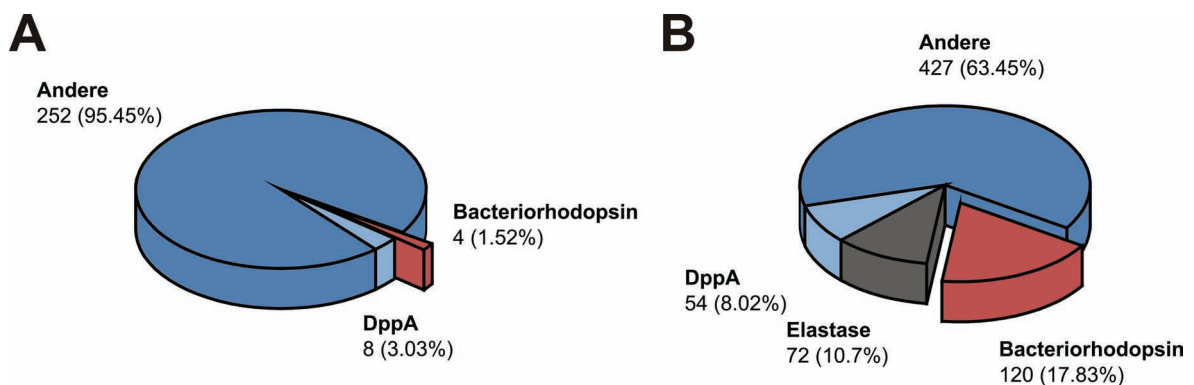


Abb. 5-3: Anteil der BR-Peptide beim Verdau von Purpurchmembranen mit Trypsin und Elastase.

Diagramm zur Darstellung des Anteils der Bacteriorhodopsin-Peptide in tryptisch (A) und elastatisch (B) verdauten Purpurchmembranen. Zusätzlich sind noch die Selbstverdaupeptide und die Peptide des DppA-Proteins aufgeführt, welches in beiden Experimenten die meisten zugeordneten Peptide (exklusive Bacteriorhodopsin) unter den Purpurchmembran-Proteinen aufweist.

Auch qualitativ lassen sich Unterschiede zwischen tryptischen und elastatischen Bacteriorhodopsin-Verdaus ausmachen. Während die wenigen tryptischen Peptide überwiegend von den peripheren Proteinteilen stammen, werden zahlreiche elastatische Peptide gefunden, die mit den Transmembranbereichen des Bacteriorhodopsins überlappen (Abb. 4-13). Ausgehend von diesen Ergebnissen muss die Zugänglichkeit zu den hydrophoben Transmembranbereichen bei Verwendung der Elastase/Methanol-Kombination gewährleistet sein. Dies war bisher nur in wenigen auf Proteasen basierenden Verdausysteme der Fall (Fischer *et al.*, 2006a; Speers und Wu, 2007). Sogar das intensivste Peptid der Elastase-verdauten Bacteriorhodopsin-Spektren (1382,7 Da) stammt aus einem Sequenzbereich inmitten einer Helix, die zudem im Bacteriorhodopsin-Trimer zur Innenpore hin gerichtet ist. Hätte die Protease nur Zugang zu den oberflächlichen

Bereichen des Proteins, wäre die Entstehung eines solchen Peptids nur über die schrittweise Exoproteolyse eines größeren Vorgängerpeptids möglich. Dies ist aber aufgrund der Abhängigkeit der Elastaseaktivität von der Peptidlänge eher unwahrscheinlich und würde sicherlich nicht in größerem Ausmaß erfolgen (Bieth, 2004). Beobachtungen bezüglich der Abdeckung von Transmembranbereichen lassen sich auch auf das komplette Membranproteom übertragen. Der Anteil an tryptischen Peptiden, die zumindest teilweise mit den vorhergesagten Transmembranbereichen überlappen, beträgt lediglich 7.6%. Bei Verwendung von Elastase als Protease sind es, unter Abzug der Autoproteolysepeptide, hingegen 29,0% (Abb. 5-4; Tab. 4-2). Demzufolge ist die Identifikation von Membranproteinen mit Elastase nicht nur über die löslichen, sondern zusätzlich noch über ihre helikalen Bereiche möglich.

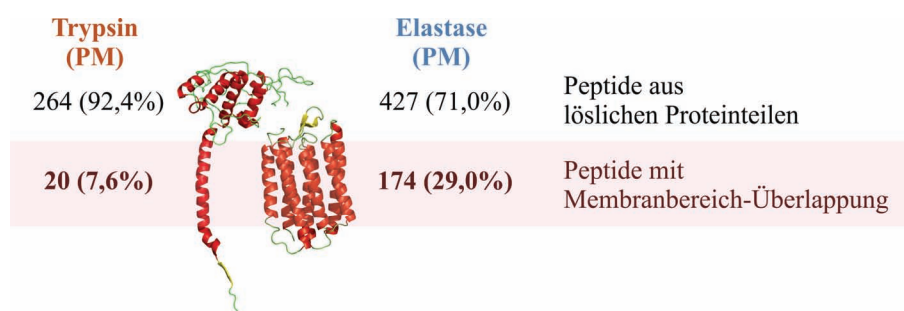


Abb. 5-4: Anteil der TM-Peptide beim Verdau von Purpurmembranen mit Trypsin und Elastase.

Diagramm zur Darstellung des Anteils der mit den vorhergesagten Transmembranbereichen zumindest teilweise überlappenden Purpurmembran-Peptide. Sämtliche Selbstverdaupeptide der Protease werden bei der Erhebung dieser Statistik nicht berücksichtigt.

Bei genauerer Betrachtung der analysierten Purpurmembranen sind weitere Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Proteasen zu beobachten. Obwohl pro nLC-Lauf mit Trypsin mehr Proteine signifikant identifiziert werden, besitzen die mit Elastase nachgewiesenen Proteine im Schnitt mehr zugeordnete Peptide. Ist wie im Falle von Bacteriorhodopsin eine flächendeckende Abdeckung des Proteins gegeben, kann dies zu einer detaillierteren Charakterisierung des Proteins verwendet werden. Aber auch weniger abundante Proteine profitieren von den höheren Peptidzahlen, die eine zusätzliche Sicherheit über die tatsächliche Existenz eines Proteins vermitteln.

Die bei der Analyse der Purpurmembranen erhaltenen Ergebnisse lassen sich ohne weiteres auch auf das zweite untersuchte Membranproteom von *Corynebacterium glutamicum* übertragen, da ebenfalls viele Peptide identifiziert werden, die aus den Helixbereichen der zahlreichen Membranproteine in der Probe stammen (Tab. 4-2). Die Zahlen der nachgewiesenen Peptide sind eher durch die eindimensionale Trennmethode begrenzt als durch das verwendete Enzym (Speers und Wu, 2007). Die Aussage, Elastase sei aufgrund eingeschränkter Aktivität nicht zur Proteolyse komplexer Membranproteome geeignet, ist im Nachhinein als falsch anzusehen (Wu *et al.*, 2003).

Trotz der erhaltenen Resultate wird hier ein grundlegendes Problem bei der Proteolyse komplexer Proteome mit einer weniger spezifischen Protease wie Elastase deutlich. Die im Vergleich zu tryptischen Verdau entstehenden komplexeren Peptidpopulationen führen zu einer effektiven Verdünnung der Probe. Um Sensitivitätsverlusten vorzubeugen kann es unter Umständen sinnvoll sein, von Beginn an größere Probenmengen für ein solches Experiment einzusetzen. Die vorliegende Probenkomplexität stellt höhere Anforderungen an die Leistung der angewendeten Trennmethode. Die eindimensionale Trennung an einer C18-Umkehrphase mag für die Auftrennung kleinerer Membranproteome wie z.B. den Proteinkomplexen der Atmungskette ausreichen, stößt aber schon bei den Purpurmembranen an die Grenzen ihrer Trennkapazität. In zahlreichen Fraktionen sind eigentlich zu viele intensive Signale vorhanden, so dass mit MALDI nicht von allen Peptiden auswertbare Fragmentspektren erzeugt werden können. Eine Verwendung von ESI gestaltet sich ähnlich problematisch, da die Elutionsgeschwindigkeit zu hoch ist, um eine ausreichende Menge an Fragmentspektren aufzunehmen. Prinzipiell ist es kein Problem bereits etablierte mehrdimensionale Separationstrategien auf das Elastaseprotokoll zu übertragen. Seine Kompatibilität zu MudPIT ist im Rahmen dieser Dissertation erfolgreich getestet worden, es sind aber auch andere Methoden zur Vorfraktionierung der Peptide vor der C18-Chromatographie denkbar (Wu *et al.*, 2003; Speers *et al.*, 2007).

5.1.3 Die Vorfraktionierung mittels *Off-Gel IEF*

Die Verteilung der elastatischen Peptide über die einzelnen Fraktionen des MudPIT-Experiments ist nicht optimal (Abb. 4-16A). In der ersten SCX-Fraktion, dem direkten Durchfluss ohne Bindung an die SCX-Phase befinden sich mehr als ein Drittel aller Peptide, der Rest eluiert ungleichmäßig über die verbleibenden zwölf Fraktionen. Zahlreiche der sich in der Membranprobe befindlichen Peptide sind hydrophob und besitzen außer ihren beiden Termini keine weiteren ionisierbaren Gruppen. Folglich besitzen sie bei dem pH-Wert der Trennung die Ladung +1 (Abb. 5-5). Sie können aufgrund dieser geringen Ladung nur eine sehr schwache Bindung mit dem Kationenaustauscher eingehen und eluieren demzufolge überwiegend in der ersten Fraktion, dem Durchlauf (Abb. 4-26B). Somit könnte mit einer Trennung aufgrund anderer physikochemischer Eigenschaften als SCX eine bessere Vorfraktionierung erreicht werden.

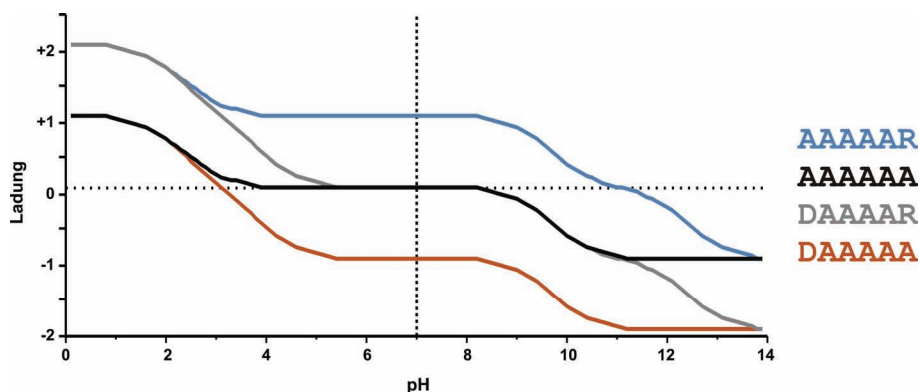


Abb. 5-5: Ladung von Peptiden in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Nettoladung von vier exemplarischen Peptiden über den gesamten pH-Bereich. **AAAAAAR** repräsentiert ein basisches Peptid mit einem Arg-Rest, **AAAAAA** ein rein aliphatisches Neutralpeptid, **DAAAAA** ein saures Asp-enthaltendes Peptid und **DAAAAAR** ein Neutralpeptid mit ausgeglichener Ladungsverteilung. .

Die isoelektrische Fokussierung auf einem IPG-Gelstreifen hat sich zur Auftrennung von Peptidmischungen effizienter als die flüssigchromatographische Trennung an einem Kationenaustauscher erwiesen (Cargile *et al.*, 2005; Essader *et al.*, 2005; Chick *et al.*, 2008). Allerdings birgt die Kombination der konventionellen IPG-IEF mit der Umkehrphasen-nLC einige Probleme, da die Probe aus der Gelmatrix in eine flüssige Phase überführt werden muss. Dies stellt einen aufwendigen Prozess dar, in dem der

Gelstreifen umständlich zerschnitten, extrahiert und die Probe eventuell nochmals aufgereinigt werden muss (Cargile *et al.*, 2005). Durch Verwendung der Off-Gel IEF werden diese Probleme zumindest teilweise umgangen, da die Probe nach der Fokussierung direkt in Lösung vorliegt (Heller *et al.*, 2005; Hörth *et al.*, 2006; Hübner *et al.*, 2008; Cheneau *et al.*, 2008). Allerdings muss beim lösungsbasierten Ansatz darauf geachtet werden, dass keine größeren Probenverluste durch Adsorption an die Plastikwände oder Präzipitation vorliegen. Gerade stark hydrophobe Peptide zeigen hierfür eine erhöhte Neigung. Das sich in der Probe befindende Glycerol verhindert aufgrund seiner Viskosität ein direktes Einspritzen der Lösung in die nLC (Fraterman *et al.*, 2007). Das Glycerol soll den elektroosmotischen Wasserfluss während der Fokussierung reduzieren und so das Austrocknen der äußeren Kammern verhindern. Da ein zusätzlicher Reinigungsschritt zum Entfernen des Glycerols immer auch zu Probenverlusten führen würde, ist ein Glycerol-freies 12-Kammer OGE-Protokoll etabliert worden. Der in den Proben enthaltene Restmethanolgehalt von 20% und die erhöhten Puffervolumina in den äußeren Kammern des modifizierten Protokolls verhindern erfolgreich das Trockenlaufen der äußeren Fraktionen.

Die Fraktionierung der proteolysierten Membranproteome mit der modifizierten OGE besitzt eine vergleichbare Effizienz mit bereits publizierten Standardprotokollen, in denen spezifische Enzyme zur Erzeugung der Peptide eingesetzt wurden (Heller *et al.*, 2005; Hörth *et al.*, 2006; Hübner *et al.*, 2008; Cheneau *et al.*, 2008; Elschenbroich *et al.*, 2009). Es zeigt sich sogar ein geringeres Ausmaß an Verschleppung der Peptide über mehrere Fraktionen (Abb. 4-23C). Aus den Publikationen war bereits bekannt, dass die OGE-Fraktionierung nur im sauren Bereich der pH-Skala optimal verläuft. Die Probleme im Neutralbereich sind ebenfalls in der Ladungsverteilung entsprechender Peptide begründet. Neutrale Peptide besitzen über einen breiten pH-Bereich keine Nettoladung und sind dann elektrophoretisch nicht mobil (Abb. 5-5). Folglich verteilen sie sich über dieses pH-Intervall und fokussieren dementsprechend schlecht. Um die Fokussierungsleistung zu verbessern, wurden bereits Strategien zur Reduktion des elektroosmotischen Flusses bei Proteintrennungen vorgeschlagen (Hübner *et al.*, 2008). Diese beschreiben Zusätze von Sorbitol, Methylcellulose oder organischen Lösungsmitteln zum IEF-Puffer, um die Fraktionierungseffizienz zu verbessern. Da auch der im modifizierten Protokoll enthaltene Restmethanol zu keiner sichtbaren Verminderung des elektroosmotischen Flusses des Wassers führt, sondern einfach nur als Restvolumen in der Kammer verbleibt, hat auch der Zusatz anderer Substanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit einen geringen Effekt. Das

verwendete 12-Kammer-Format ist für die elastatische Analyse kleinerer Membranproteome, wie der von Viren, Bakterien und niederer Eukaryonten, völlig ausreichend. Falls mehr Trennleistung erforderlich ist, sollte sich das Protokoll problemlos auf die 24-Kammern erweitern lassen, gegebenenfalls müssen die zusätzlichen Puffermengen etwas erhöht werden, um den stärkeren Wassertransport zu kompensieren. Allerdings soll der verstärkte Wassertransport im größeren Format auch zu einer schlechteren Fokussierung führen, so dass damit nicht zwingend mehr Proteine identifiziert werden können (Hübner *et al.*, 2008).

Die modifizierte OGE eignet sich besser für die Untersuchung von Membranproteomen als die SCX-Fraktionierung, da sich die Peptide gleichmäßiger über die entsprechenden Fraktionen verteilen (Abb. 5-6; Abb. 4-23A). Lediglich bei den Purpurmembranen finden sich in den sauren Fraktionen überproportional viele Peptide, was auf das hohe Vorkommen saurer Aminosäuren im *Halobacterium*-Proteom zurückzuführen ist. Das Proteom der untersuchten Corynebakterien ist zwar auch überwiegend sauer, allerdings sind die hydrophilen Schleifenregionen der Proteine vor der OGE proteolytisch entfernt worden. Dies führt zu einer Anreicherung der Helixbereiche, die nur wenige geladene Reste enthalten. Der Vorteil einer zusätzlichen Trenndimension ist erkennbar und manifestiert sich in einer Erhöhung der identifizierten Peptide und Proteine um den Faktor drei. Die erhaltene Bacteriorhodopsin-Sequenzabdeckung stellt wohl das Maximum der mit einem Enzym und MALDI-MS/MS erreichbaren Abdeckung dar, da sich auch mit mehreren 1D-nLC-Läufen keine deutlich höheren Werte erreichen lassen (Hübner *et al.*, 2008; Tab. 4-2, Tab. 4-4). Damit wird demonstriert, dass sich die Vorfraktionierung sowohl vorteilhaft für die Analyse abundanter als auch weniger abundanter Proteine erweist. Eine eindimensionale C18-nLC-Trennung zeigt das Potential der Elastaseverdau nur bedingt auf.

Schließlich muss sich das modifizierte OGE/C18-MALDI-Protokoll aber nicht mit der eindimensionalen C18-Trennung, sondern mit den anderen geläufigen Methoden zur Vorfraktionierung von Membranproteomen messen. Gegenüber SCX/C18 besitzt es den bereits besprochenen Vorteil einer besseren Orthogonalität (Abb. 5-6), ein direkter Vergleich mit der ESI-basierten *online*-MudPIT-Plattform erweist sich aber aus den im nächsten Kapitel angesprochenen Gründen als nicht sehr aussagekräftig. Andere auf Gelen basierende Verfahren zur Fraktionierung vor einer C18-Trennung wie die konventionelle IPG-IEF oder die SDS-PAGE benötigen verlustbehaftete Extraktionsschritte, um die

Peptide in ein flüssiges Medium zu überführen. Dies wird durch die direkte Injektionsmöglichkeit der modifizierten OGE-Probenlösung in die nLC vermieden.

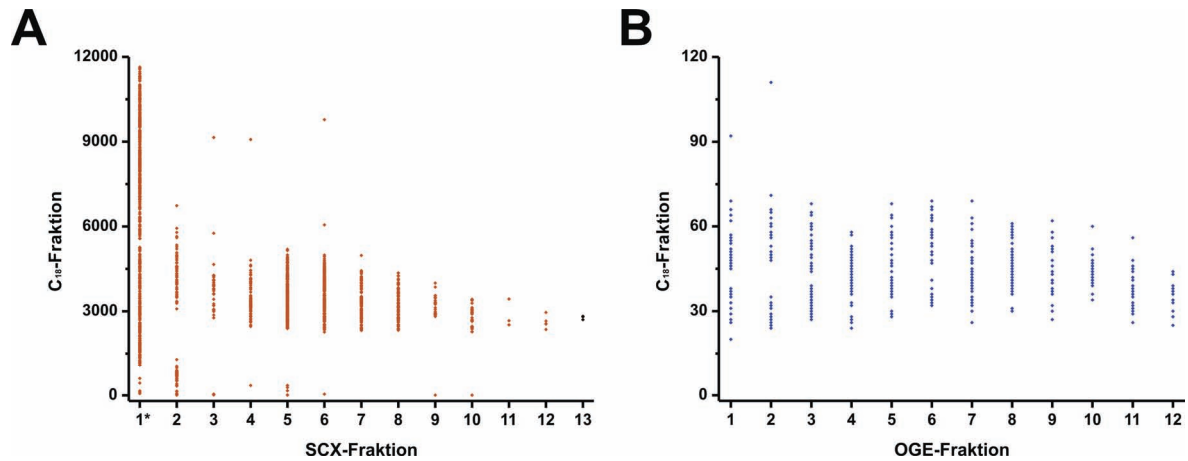


Abb. 5-6: Orthogonalität der verwendeten 2D-Trennmethode MudPIT und OGE/C18-nLC.

Auftragung der Fraktionsnummer eines bestimmten Peptids in beiden Trenndimensionen. Darstellung bei SCX/C18 bzw. MudPIT (**A**) und OGE/C18 (**B**). Da bei der ersten mit einem Stern (*) gekennzeichneten SCX-Fraktion ein längerer C18-Gradient eingesetzt wurde, wird ein Korrekturfaktor von 0,55 (100 min/180 min) bei der Auftragung der C18-Fraktion berücksichtigt.

5.1.4 Vergleich der Instrumentenplattformen

Die Untersuchung der beiden Membranproteome wurde sowohl auf dem MALDI-TOF/TOF als auch der ESI-LIT-Orbitrap durchgeführt und miteinander verglichen. Ein fairer Vergleich zwischen beiden Instrumenten erweist sich aus mehreren Gründen als schwierig. Neben den unterschiedlichen Verfahren zur Ionenerzeugung werden verschiedene Massenanalytoren verwendet, die qualitativ unterschiedliche Daten erzeugen. Weiterhin stellt die *online*-nLC-ESI-Kopplung ein über mehrere Jahre erprobtes und etabliertes Verfahren dar, während das MALDI-Spotting bei weitem noch nicht so ausgereift erscheint (Mirgorodskaya *et al.*, 2006). Der Verlust an Trennleistung durch die beim Spottingprozess auftretenden Verschleppungseffekte können durch den Vorteil einer *offline*-Messung nicht kompensiert werden. Der Vergleich ist somit nicht zwischen den beiden Ionisationstechniken zu treffen, vielmehr müssen die kompletten Plattformen berücksichtigt werden.

Von den reinen Zahlen her schneidet das Elektrospray-Instrument besser ab. Mit ihm lassen sich mehr Proteine und Peptide aus den komplexen Proteingemischen identifizieren (Tab. 4-2). Auch gerade im Hinblick auf die in diesen Analysen erwünschten Transmembranpeptide zeigt sich die ESI-Plattform gegenüber nLC-MALDI-TOF/TOF klar im Vorteil. Die allgemein höheren Identifikationsraten sind im Wesentlichen auf drei Faktoren zurückzuführen. Erstens kann mit einem ESI-Massenspektrometer der Massenbereich unter 700 Da erschlossen werden, in dem sich in beiden Proben ca. 20% der Peptide befinden. Die kleinen Peptide erhöhen zwar auf den ersten Blick die Qualität der Daten, sind aber im Vergleich zu größeren Peptiden als minderwertiger einzustufen. Ihr Informationsgehalt ist geringer, da sie weniger Sequenzinformation mit einer höheren Redundanz in der Datenbank bieten. Obwohl sich mittels MALDI größere Peptide über 2.000 Da besser nachweisen lassen, fällt dies bei den Elastaseverdaus nicht so stark ins Gewicht, da vermehrt Peptide kleiner und mittlerer Masse gebildet werden. Dazu kann die Wiederfindung größerer hydrophober Peptide durch eine irreversible Bindung an die C18-Umkehrphase der nLC erniedrigt sein. Zweitens werden bei Verwendung des hochauflösenden Orbitrap-Massenanalytators geringere Signifikanzkriterien für MS/MS-Spektren durch die bessere Vorläufergenauigkeit vorausgesetzt. Der erforderliche Schwellenwert für einen signifikanten Treffer sinkt bei einer Verbesserung der Massengenauigkeit von 30 auf 5 ppm für jedes MS/MS-Spektrum um neun Punkte. Dieses Intervall enthält bis zu zwei Drittel der Peptide über der 5 ppm-Signifikanzschwelle, denen bei Messung mit dem MALDI-Gerät keine Signifikanz zugewiesen werden kann

(Abb. 4-29A). Drittens verläuft die Detektion aliphatischer Neutralpeptide, die keine geladenen Seitenketten enthalten, mittels CHCA-MALDI problematisch. Dieser Umstand wirkt sich insbesondere auf die Transmembranpeptide negativ aus, da diese überwiegend hydrophob ausfallen müssen. Werden die aliphatischen Neutralpeptide und der Massenbereich unter 700 Da nicht berücksichtigt, liefern beide Geräte vergleichbare Anzahlen an identifizierten Transmembranpeptiden (Abb. 5-7). Die schwächere Detektion der Neutralpeptide beim konventionellen MALDI kann zwei Effekten zugeordnet werden. Einerseits werden die Peptide durch die schwächere Ionenpaarbildung mit der Matrix wesentlich schlechter in den Matrixkristall inkorporiert. Zusätzlich sind sie aufgrund der geringeren Basizität der einzig vorhandenen terminalen Aminogruppe auch deutlich schwieriger zu protonieren (Krause *et al.*, 1999; Jaskolla *et al.*, 2008). Selbst wenn schwache Signale dieser Peptide detektiert werden, ist die Erzeugung eines qualitativ ansprechenden MS/MS-Spektrums durch laserinduzierte Fragmentierung unwahrscheinlich. Obwohl die Präferenz von MALDI für basische, argininhaltige Peptide bereits länger bekannt ist, spielt die Diskriminierung von aliphatischen Neutralpeptiden in den meisten *Proteomics*-Studien keine Rolle. Dort werden überwiegend die Enzyme Trypsin und Lys-C eingesetzt, die hochspezifisch nach basischen Aminosäuren hydrolysieren. Somit entstehen in diesen Experimenten *de facto* keine rein aliphatischen Peptide. Solche Diskriminierungseffekte treten bei ESI nicht auf, hier wurde sogar eine leicht bessere Nachweisbarkeit einiger Peptide gezeigt, deren hydrophobe Charakteristika durch Alkylierung verstärkt wurden (Cech und Enke, 2000; Frahm *et al.*, 2007).

Trotz aller aufgeführten Vor- und Nachteile beider Technologieplattformen darf nicht unterschlagen werden, dass sich die identifizierten Proteine nur zu 20% überschneiden (Abb. 4-15). Beide Systeme liefern ausreichend komplementäre Daten, so dass kein Instrument das andere ersetzen kann.

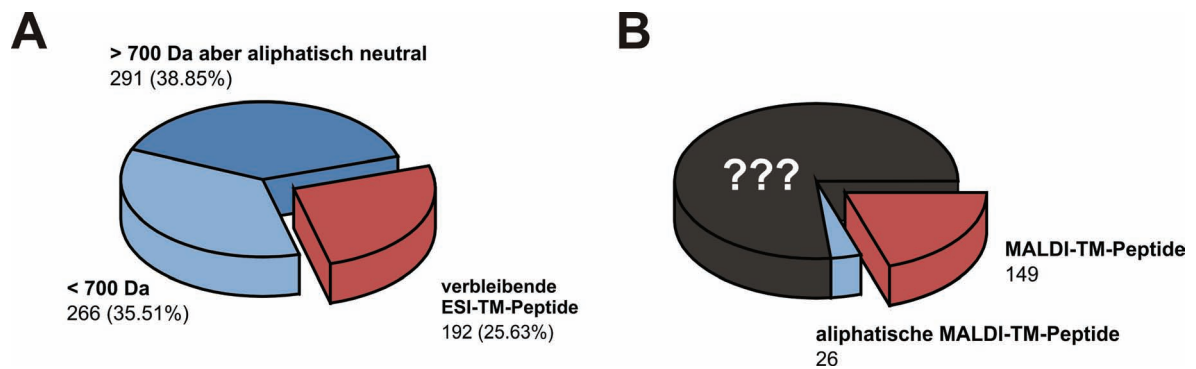


Abb. 5-7: Klassifizierung der Transmembranpeptide.

Darstellung des Anteils von Membranpeptiden im nLC-ESI- (**A**) und nLC-MALDI-Experiment (**B**), welche zu den rein aliphatische Neutralpeptide gehören. Bei ESI sind zusätzlich die Peptide unter 700 Da separat aufgeführt. Der dunkelgraue Sektor in (**B**) repräsentiert die unbekannte Menge an Transmembranpeptiden, die mit klassischem CHCA-MALDI nicht nachweisbar sind.

5.1.5 Datenbanksuchen

Die Ergebnisse eines *Proteomics*-Experiments stehen und fallen mit der Qualität der ihm zugrundeliegenden Datenbanksuche. Der Einsatz von weniger spezifischen Proteasen stellt besondere Anforderungen an die Suchalgorithmen, da sich deutlich mehr Möglichkeiten für entstehende Peptide ergeben. Der Suchraum gegen den die gemessenen Daten abgeglichen werden müssen, steigt mit zunehmender Anzahl an spezifischen Schnittstellen exponentiell an. Zusätzlich weisen viele der weniger spezifischen Enzyme einen größeren Anteil an Schnitten außerhalb der eigentlichen Enzymdefinition auf, die größtenteils von den Suchmaschinen nicht berücksichtigt werden. In elastatisch verdauten Proben treten ca. 16% nichtspezifische Schnitte auf, so dass bis zu 30% der entstehenden Peptide unter Annahme einer vollen Spezifität für die Aminosäuren Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Serin und Threonin nicht berücksichtigt werden (Abb. 5-8).

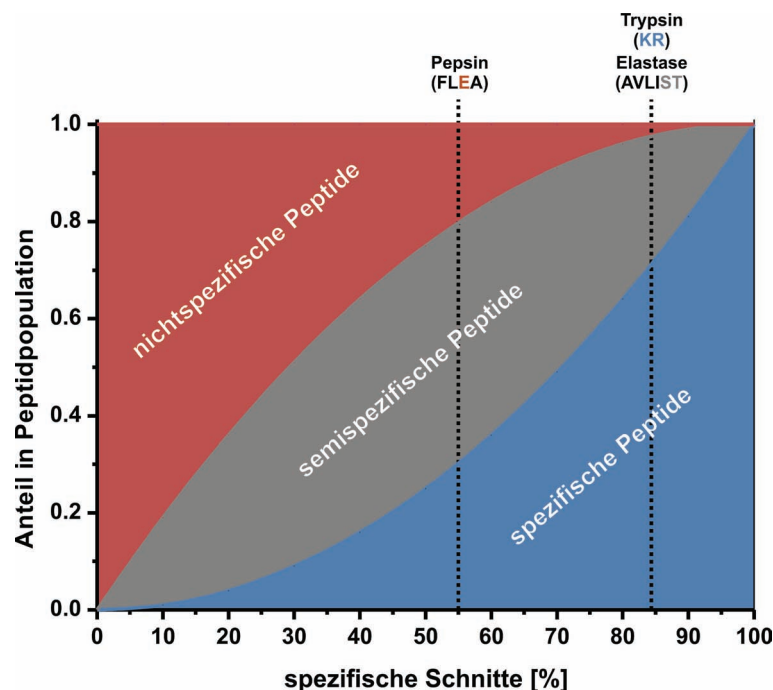


Abb. 5-8: Auswirkung des Spezifitätsausmaßes auf die entstehende Peptidpopulation.

Entstehende Peptidpopulation bei einem gegebenen Prozentsatz an spezifischen Schnitten. Die Werte von Trypsin, Elastase (in 60% MeOH/25 mM ABC) und Pepsin (in 10% MeOH/0,1% TFA) sind gesondert gekennzeichnet.

Ein erster Schritt zur Verbesserung für solche Datenbanksuchen wäre demzufolge eine Implementierung nichtspezifischer Schnitte durch eine angemessene Gewichtung der tatsächlich auftretenden Spaltungen. Dies ist ansatzweise im *Paragon*-Algorithmus der *ProteinPilot*TM-Suchmaschine verwirklicht, gilt dort allerdings nur für tryptische Datensätze. In solchen Verdaus fällt die Menge an semi- und nichttryptischen Peptiden geringer aus, so dass der Nutzen dieser Funktion hier deutlich geringer ist.

Ohnehin stellt sich bei den weniger spezifischen Enzymen mit einer graduellen Schnittverteilung die Frage, welche eigentlich die am besten geeignete Suchdefinition darstellt. Im Falle von Elastase muss hierbei grundsätzlich zwischen PMF- und MS/MS-basierten Suchabfragen unterschieden werden. PMF-Suchen von elastatisch verdauten Proteinen sind mit der aktuell gängigen und verwendeten Suchmaschine *Mascot* selbst bei kleinen Datenbankgrößen und hoher Massengenauigkeit nicht möglich. Durch die hohe Menge potentieller Peptidtreffer können nur in Ausnahmefällen Proteine statistisch abgesichert identifiziert werden. Um dennoch positive Identifikationen zu ermöglichen, müssen in die Datenbanksuche weitere Kriterien einfließen. Aus der SDS-PAGE kann die intakte Proteinmasse eines Proteins abgeschätzt werden, so dass die Datenbank entsprechend eingegrenzt werden kann. Dies ist bereits in einigen aktuellen PMF-Suchalgorithmen verwirklicht. Die bei Elastaseproteolysaten auffällige Bildung von Peptidclustern könnte ebenfalls zur Validierung der Suchergebnisse verwendet werden. Da sich nicht von allen möglichen Spaltstellen Peptide nachweisen lassen, kommt es zu einer Ansammlung von Peptiden aus den Abschnitten des Proteins, die gehäuft gut ionisierbare, überwiegend basische Bereiche enthalten. Falschpositiv zugeordnete Proteine zeigen hingegen gleichverteilte Peptidmuster und können so gezielt aussortiert werden. Wird im Rahmen eines PMF-Experiments nur gegen einzelne Proteinsequenzen abgeglichen, kann durch Verwendung der AVILST(G)-Enzymdefinition ein zu falschen Sequenzen gut abgegrenztes Resultat erzielt werden. Eine völlig unspezifische Zuordnung erzeugt zu viele falsche, nichtspezifische Treffer und kann daher nicht empfohlen werden.

Einen weitaus bedeutenderen Einfluss übt die vorliegende Massengenauigkeit der gemessenen Daten auf die prinzipiell möglichen PMF-Suchresultate aus. Unterhalb von 5 ppm treten kaum noch falsche oder mehrfache Zuordnungen einer Masse auf, so dass diese Massengenauigkeit für den Abgleich gegen eine Proteinsequenz wünschenswert ist (Abb. 4-28). Ein Orbitrap-Massenspektrometer erreicht eine solche Massengenauigkeit problemlos und ist daher als optimales Instrument für weniger spezifische PMF-Zwecke

einzustufen. MALDI-TOF-Instrumente erreichen im Routinebetrieb je nach Qualität und Art der durchgeführten Kalibrierung Suchgenauigkeiten von 10 bis 30 ppm (Han und Yates, 2008). Die mit ihnen aufgenommenen Spektren eignen sich prinzipiell zwar auch für PMF-basierte Ansätze, die Proteinzugeweisungen sollten aber durch zusätzliche MS/MS-Spektren abgesichert werden, da sich insbesondere an der oberen Genauigkeitsgrenze die Zahl an Mehrfachzuordnungen deutlich erhöht.

Im Gegensatz zu PMF-Suchen sind selbst nichtspezifische MS/MS-Abfragen gegen große Datenbanken mit der *Mascot*-Suchmaschine möglich. Die zusätzlich vorhandene Fragmentinformation verhindert, dass einer Masse zu viele potentielle Sequenzen signifikant zugeordnet werden, was bei den elastischen PMF-Suchen das Ausschlusskriterium war. Mit welcher Enzymdefinition letztendlich gesucht wird, spielt in der Praxis eine untergeordnete Rolle, da sich die Gewinne durch die Berücksichtigung einer Spezifität mit den Verlusten durch nicht berücksichtigte Peptide nahezu ausgleichen. Letztendlich ist die völlig nichtspezifische Suche sogar zu bevorzugen, da hier ein breites Peptidspektrum abgedeckt werden kann. Diese Schlussfolgerung ist nicht generell für alle weniger spezifischen Enzyme gültig, trifft aber für die gegebene Spezifitätsverteilung der Elastase zu.

Bei MS/MS-Datenbanksuchen besteht nicht die Gefahr, durch eine zu geringe Massengenauigkeit die Anzahl falschpositiver Identifikationen in die Höhe zu treiben. Allerdings lassen sich deutlich weniger Proteine aus einer komplexen Probe identifizieren, als es mit einer akkurateren Messung möglich gewesen wäre. Der Suchraum wird bei elastischen Datenbanksuchen durch die breite oder fehlende Spezifität nicht begrenzt, so dass er schon bei MALDI-TOF-typischen Massengenauigkeiten gigantische Ausmaße annimmt. Um trotzdem signifikante Peptididentifikationen zu gewährleisten, werden von den Suchalgorithmen hohe Anforderungen an die Qualität der MS/MS-Fragmentspektren gestellt. Während bei der Suche tryptischer MS/MS-Spektren einige wenige zugeordnete Fragmente ausreichen, um selbst bei 50 ppm Genauigkeit einen signifikanten Treffer zu produzieren, wird für ein vergleichbares Ergebnis in einer elastischen Datenbanksuche ein hochwertiges Fragmentspektrum vorausgesetzt. Der hierbei für die Peptididentifikation erforderliche Signifikanzschwellenwert könnte durch den Einbezug eines weiteren Peptidcharakteristikums herabgesetzt werden. Hierfür bietet sich in erster Linie der pI der Peptide an, der bei IEF-Anwendungen zusätzlich bestimmt wird. Dieser Parameter wurde bereits mehrfach zur Validierung von MS/MS-Sequenzinformationen und zum

Herausfiltern von falschpositiven Peptidinformationen verwendet (Cargile *et al.*, 2004; Krijgsveld *et al.*, 2006; Uwaje *et al.*, 2007). Das pI-basierte Filtern wird noch nicht von routinemäßigen Datenbanksuchalgorithmen berücksichtigt, vielleicht auch weil die pI-Werte einzelner Peptide nicht eindeutig vorherzusagen sind (Heller *et al.*, 2005b).

Ein weiterer Ansatzpunkt für eine verbesserte MS/MS-Datenbanksuche ist die gewichtete Bewertung einzelner Fragmentensignale und –intensitäten im MS/MS-Spektrum. Momentan berücksichtigen die Suchalgorithmen nur, ob ein Fragment vorhanden ist oder nicht. Etwaige Bruchpräferenzen bei der Fragmentierung werden nicht berücksichtigt. Um diese zusätzliche Information in die Suchmaschinen implementieren zu können, müssen möglichst große und universelle Bruchstatistiken vorliegen, damit die Gewichtung der einzelnen Fragmente im richtigen Maß geschieht. Die einzig publizierte MALDI-PSD(CID)-Fragmentierungsstatistik enthält ausschließlich durch spezifischen Verdau mit Trypsin erzeugte Peptide, die alle einen basischen Rest am Carboxyterminus besitzen (Khatun *et al.*, 2007). Dieser führt zu einer gerichteten Fragmentierung der Peptide, denn durch die Lokalisierung der positiven Ladung am C-Terminus erfolgt eine verbesserte Ionisierung der den basischen Rest tragenden Ionen und es werden vornehmlich die y-Fragmente im Spektrum sichtbar (Tabb *et al.*, 2004; Cañas *et al.*, 2007). Für die Verbesserung nichtspezifischer Datenbanksuchen könnten diese Auswertungen nur bedingt als Fragmentierungsgrundlage herangezogen werden, da die untersuchten Peptide nur einen Bruchteil des in diesen Verdau vorliegenden Peptidspektrums abdecken. Die in dieser Arbeit erstellte MS/MS-Fragmentierungsstatistik ist der erste mit einem MALDI-TOF/TOF-Instrument erzeugte Datensatz nicht-tryptischer Peptide. Zusammen mit der bereits angesprochenen tryptischen Statistik sind dadurch allgemeine Aussagen zur Fragmentierung von Peptiden in MALDI-TOF/TOF-Instrumenten möglich, unabhängig mit welcher Protease gespalten wird. Damit sollte es möglich sein prominente oder intensive Bruchstellen wie Xxx-Pro oder Asp-Xxx in den Datenbanksuchen zu berücksichtigen.

Der Signifikanzschwellenwert in MS/MS-Suchen wird maßgeblich durch die verwendete Suchgenauigkeit beeinflusst. Durch die Verwendung hochauflösender Massenspektrometer kann er herabgesetzt werden, so dass der Verlust der Spezifität in weniger spezifischen Datensätzen zumindest teilweise durch eine bessere Massengenauigkeit kompensiert werden kann. Der Erfolg der ESI-LIT-Orbitrap-Hybridmassenspektrometrie basiert nicht zuletzt auf der sehr guten Massengenauigkeit der Geräte.

5.1.6 Kombination von Orbitrap-MS und TOF/TOF-MS/MS-Daten

Durch die erst kürzlich eingeführte Kopplung einer MALDI-Quelle mit einem LIT-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer wird eine vergleichbare Massengenauigkeit zum entsprechenden ESI-Gerät erreicht. Allerdings bringt das geänderte Ionisationsverfahren neben technischen Schwierigkeiten bei der Umsetzung der Kopplung weitere Probleme mit sich, die hauptsächlich die Fragmentierungseigenschaften des Geräts betreffen. MALDI erzeugt fast ausschließlich einfach geladene Ionen, die bekanntermaßen schlechte Fragmentierungseigenschaften mit *low energy* CID in einer Ionenfalle aufweisen (Wysocki *et al.*, 2005). Das *high energy* CID-unterstützte PSD der MALDI-TOF/TOF-Instrumente, eignet sich deutlich besser zur Fragmentierung einfach geladener Peptidionen, erzeugt aber auch viele interne Fragmente, die das Fragmentspektrum unnötig verkomplizieren. Die anderen in der MALDI-LIT-Orbitrap möglichen Fragmentierungsarten besitzen entweder eine geringe Sensitivität und benötigen hohe Scanzeiten (HCD) oder umspannen einen ungeeigneten Massenbereich zur Messung von Peptidfragmenten (PQD). Die auf Elektronenanregung basierende Fragmentierungstechnik ETD ist in der MALDI-LIT-Orbitrap aufgrund des Ladungszustandes der Ionen nicht möglich und daher keine Option. Mithilfe der im Rahmen dieser Dissertation angefertigten Elastase-Datensätze konnte berechnet werden, dass eine Verbesserung der Massengenauigkeit von 50 auf 5 ppm bei gleichbleibender MS/MS-Spektrenqualität bis zu 50% mehr signifikante Peptididentifikationen ermöglicht (Abb. 4-29; Tab. 4-6).

Da die Vorläufermasse nicht dem Fragmentspektrum entnommen wird, besteht prinzipiell die Möglichkeit eine getrennte genauere Massenbestimmung auf einem anderen Instrument durchzuführen. Die MALDI-LIT-Orbitrap ist nicht das erste auf dem Markt befindliche hochauflösende MALDI-Instrument. Es wurden bereits MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten mit akkuraten Vorläufermassen versehen, die an einem MALDI-FT-ICR-MS gemessen wurden (Stoop *et al.*, 2008). Dieses Vorgehen führte bei einem tryptischen Datensatz zu einer deutlichen Reduzierung der Falschpositivenrate. Der Effekt der verbesserten Massengenauigkeit fällt bei tryptisch verdauten Proben geringer aus, da bereits sehr niedrige Signifikanzschwellenwerte vorliegen. Lediglich bei extrem großen Datenbanken wäre ein zu nichtspezifischen Suchen vergleichbarer Zuwachs denkbar.

Der Probentransfer zwischen beiden Geräten stellt ein rein technisches Problem dar, dass sich am ehesten durch einen zu beiden Geräten kompatiblen MALDI-Probenteller beheben ließe. Leider ist dies aufgrund der aktuellen Herstellersituation eher unwahrscheinlich, so

dass andere Wege zum Übertrag der Probe gefunden werden müssen. Die hier angewandte Prozedur beinhaltet das Rücklösen der Probenpräparation vom Probenteller nach der Fragmentierung und das anschließendem Neuspotten unter Matrixzusatz zur Aufnahme der genauen *Precursor*-Masse. Durch Einhaltung dieser Reihenfolge wird gewährleistet, dass die maximale Probenmenge zur Fragmentierung bereitsteht. Auch nach extensiver Fragmentierung mit bis zu 15.000 Laserschüssen pro *Spot* lassen sich bis zu 70% der Vorläufermassen im zweiten Durchlauf auf der MALDI-LIT-Orbitrap messen (Tab. 4-6). Dieser Prozentsatz ist völlig ausreichend, da die ausgelassenen Massen überwiegend von schwach intensiven oder sehr großen Peptiden stammen, welche im Regelfall keine guten MS/MS-Spektren liefern.

Das beschriebene Verfahren führt zu einem Zuwachs an signifikant identifizierten Peptiden, deren Anzahl sich voll und ganz mit den berechneten Zahlen deckt (Abb. 5-9; Tab. 4-6). Das Gespann aus MALDI-TOF/TOF- und MALDI-LIT-Orbitrap ist für die Analyse von nichtspezifischen Datensätzen auf eine Ebene mit der sehr erfolgreichen ESI-LIT-Orbitrap-Plattform zu stellen und besitzt zudem den Vorteil, dass bestimmte Proben zwecks Verifizierung nochmals vermessen werden können. Nachteilig ist sicherlich der erhöhte Arbeits- und Zeitaufwand, der sich aber durch eine Automatisierung des Probentransfers reduzieren ließe.

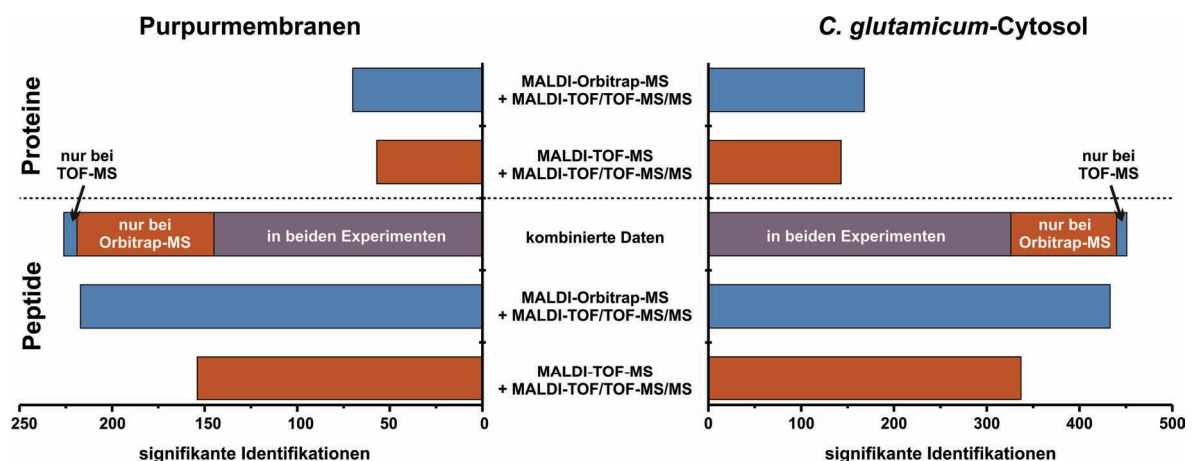


Abb. 5-9: Kombination der Daten zweier MALDI-Geräte.

Vergleich der Untersuchungen von zwei Proteome, die mit einem (MALDI-TOF und -TOF/TOF) bzw. der Kombination zweier Instrumente (MALDI-Orbitrap und MALDI-TOF/TOF) analysiert wurden. Werden beide Datensätze kombiniert können nochmals mehr Peptide identifiziert werden.

5.2 Andere Proteasen

5.2.1 Glu-C, Chymotrypsin und Proteinase K

Neben Elastase werden noch vier weiteren Proteasen am Modellprotein Bacteriorhodopsin getestet (Tab. 4-8). Die Spaltungen mit Chymotrypsin, Glu-C oder Proteinase K erfolgen ebenfalls in 60% Methanol, da die entsprechenden rein wässrigen Referenzansätze analog zu Elastase entscheidend schlechter sind (Abb. 4-2).

Im Glu-C-Verdau ist kein einziges Bacteriorhodopsin-Peptid nachweisbar (Abb. 4-36B). Der überwiegende Teil der Signale im Spektrum sind intensive Autoproteolysepeptide, einige weitere sind keiner der berücksichtigten Proteinsequenzen zuzuordnen. Bei der Proteolyse löslicher Proteine mit Glu-C ist der Selbstverdau zwar nie völlig vermeidbar, aber zumindest nicht so ausgeprägt. Insgesamt kann festgehalten werden, dass sich das Elastaseprotokoll nicht direkt auf einen Verdau mit Glu-C übertragen lässt.

Im Gegensatz zur bakteriellen Endopeptidase lässt sich mit Chymotrypsin ein aussagekräftiges BR-Spektrum erhalten (Abb. 4-36A). Es fällt jedoch störend auf, dass viele intensive Signale im Spektrum innerhalb der FLYW-Enzymdefinition weder dem Bacteriorhodopsin noch der Proteasesequenz zugeordnet werden können. Da es sich beim verwendeten Enzym um ein chemisch modifiziertes Chymotrypsin handelt, können diese von den modifizierten Proteasepeptiden stammen. Ebenfalls können lösliche Proteinkomponenten für die Signale verantwortlich sein, die dem Chymotrypsin leichter zugänglich sind. Eine letzte mögliche Erklärung wäre, dass die zusätzlichen Peptide außerhalb der FLYW-Spezifität liegen und deshalb nicht berücksichtigt werden. Aufgrund seiner engeren Spezifität mit nur vier Schnittstellen ist Chymotrypsin für PMF-Datenbanksuchen besser geeignet als Elastase. Deshalb fand das Enzym auch schon in zahlreichen Membranproteomics-Experimenten Anwendung, insbesondere wenn die vorliegende Fragestellung mit Trypsin nicht beantwortet werden konnte (Fischer und Poetsch, 2006; Galkin *et al.*, 2008; Jaskolla *et al.*, 2009). Da unter den von Chymotrypsin spezifisch gespaltenen Aminosäuren lediglich Leucin in größeren Mengen in den Transmembranbereichen der Proteine anzutreffen ist, können mit Elastase diese Bereiche durch die höhere Peptidzahl mit besserer Redundanz abgedeckt werden. Deshalb bleibt Elastase zur MS/MS-Analyse von helikalen Membranproteinen erste Wahl. Ansonsten spricht aber nichts gegen einen Einsatz von Chymotrypsin für diesen Zweck.

Anders sieht es hingegen bei Verwendung von Proteinase K aus. Das weitgehend nichtspezifische Enzym ist zwar auch in 60% Methanol aktiv, aber aus mehreren Gründen auch problematisch. Das völlige Fehlen einer Spezifität macht PMF-Suchen gegen Datenbanken unmöglich. Auch beim Abgleich gegen einzelne Proteinsequenzen kommt es zu einer Vielzahl an Mehrfachzuordnungen, die eine Interpretation der Ergebnisse erschweren. Weiterhin wird eine starke Proteolyse der Substratproteine beobachtet, so dass kaum Peptide über 2.000 Da anzutreffen sind (Abb. 4-36C). Es kann davon ausgegangen werden, dass Proteinase K aufgrund ihrer starken Aktivität zahlreiche Peptide erzeugt, die unterhalb des messbaren Massenintervalls liegen. Dies ist zwar auch bei Elastase der Fall, aber nicht in diesem Ausmaß. Von allen getesteten weniger spezifischen Proteasen weist Proteinase K den deutlichsten Selbstverdau auf, der ebenfalls Probleme bei der Auswertung von Spektren verursachen kann. Das Enzym wurde bereits für MS/MS-Analysen von Membranproteomen eingesetzt, aber nur um die löslichen Anteile der Proteine zu entfernen (Wu *et al.*, 2003). Die eigentliche Spaltung der Transmembranbereiche erfolgte durch CNBr. Für die dortigen Verdau wurden stark alkalische Puffer verwendet, die zu besser messbaren, weil längeren Peptiden führten. Elastase zeigt in geringerem Ausmaß störenden Selbstverdau, besitzt in 60% Methanol direkten Zugang zu den Helixbereichen, weist zumindest eine gewisse Spezifität auf und ist im Gegensatz zu CNBr nicht toxisch. Folglich gibt es keinen ersichtlichen Grund, weshalb ein Verdau mit Elastase in zwei Schritten nicht gleichwertige oder sogar bessere Ergebnisse als die Proteinase K/CNBr-Kombination liefern sollte.

5.2.2 Pepsin

Bei dem letzten untersuchten weniger spezifischen Enzym handelt es sich um die saure Protease Pepsin. Obwohl sie bereits erfolgreich zur Identifizierung eines Membranproteins verwendet wurde, fand sie in einem der führenden Membranproteomics-Übersichtsartikel keine Beachtung (Han *et al.*, 2004, Speers und Wu, 2007). Im Gegensatz zu allen anderen getesteten Proteasen ist Pepsin im sauren pH-Bereich aktiv. Dadurch eröffnen sich zusätzliche Anwendungsbereiche für die Protease, die zwingend ein saures Milieu voraussetzen. Pepsin ist deshalb für den Wasserstoff-/Deuterium-Austausch zur Aufklärung von Proteinstrukturen und -interaktionen das Enzym der Wahl (Zhang *et al.*, 2008). Klassischerweise werden die sauren Bedingungen durch den Verdau in 10% Ameisensäure erreicht (Han *et al.*, 2004). Da diese Menge Ameisensäure die Kristallisation der MALDI-CHCA-Probenpräparation negativ beeinträchtigt wird sie durch 0,1% TFA ersetzt. Leider konnten der Verdauung nur 10% Methanol zur Verbesserung der Löslichkeit von Membranproteinen zugesetzt werden, da Pepsin bei höheren Mengen an Methanol seine Aktivität einbüßt (Bruyneel *et al.*, 2007). Trotz des vergleichsweise geringen Anteils an organischem Lösungsmittel kann mit Pepsin ein der Elastase ebenbürtiges Bacteriorhodopsin-PMF-Spektrum aufgenommen werden (Abb. 4-36A). Sowohl hinsichtlich der Peptidanzahl als auch der Sequenzabdeckung können mit beiden Proteasen ähnlich gute Werte erzielt werden. Nur die Autoproteolyserate ist im peptischen Verdau geringfügig höher. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse sei aber angemerkt, dass für die peptische PMF-Suche eine völlig unspezifische Suche angenommen werden musste und sich demzufolge eine höhere Anzahl falschpositiver Treffer unter den zugeordneten Peptiden befinden könnte.

Der Pepsin-Verdau in 10% Methanol/0,1% TFA ist direkt mit einer nLC-MALDI-MS/MS-Analyse kompatibel. Aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Parameter (u.a. Probenmenge, nLC-System und -Methode) ist eine Gegenüberstellung mit den Elastase-MS/MS-Daten nicht sinnvoll. Trotzdem ist aus den Ergebnissen klar sichtbar, dass mit diesem Protokoll auch komplette Membranproteome untersucht werden können. Es sollte ebenfalls mit dem für HDX-Experimente erforderlichen deuterierten CD₃OD/D₂O-Lösungsmittelsystem verträglich sein, so dass die Grundlagen für ein HDX-Protokoll für Membranproteine vorliegen.

Aus den aufgenommenen MS/MS-Daten kann zusätzlich eine Aussage über die peptische Spezifität getroffen werden. Ungefähr 55% der Schnitte erfolgen nach den Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Glutaminsäure und Alanin (Abb. 4-39A). Im Vergleich zu Elastase unterscheiden sich die darauf folgenden neun Schnittwahrscheinlichkeiten nur unwesentlich, so dass die eindeutige Definition einer Spezifität nicht möglich ist. Die Enzymdefinition FLEA eignet sich nur bedingt für PMF, da nur 31% der entstehenden Peptide vollspezifisch sind (Abb. 5-8). Dies zeigt sich dann auch bei den Datenbanksuchen, in denen bei Verwendung dieser Spezifität vielen Signalen im Spektrum kein Peptid zugewiesen werden kann. Bei MS/MS-Suchen kann wie bei den Elastase-Suchen komplett ohne Spezifität gesucht werden.

5.3 Fazit und Ausblick

Ist Elastase nun die ideale Protease für den Verdau von Membranproteomen? Nach den durchgeführten Experimenten ließe sich diese Frage durchaus mit „Ja“ beantworten, da mit ihr die besten Ergebnisse hinsichtlich des Modellproteins Bacteriorhodopsin erzielt worden sind. Zur endgültigen Beantwortung dieser Frage müssen aber mehrere Dinge berücksichtigt werden. Da sich helikale Membranproteine voneinander unterscheiden, kann nicht automatisch angenommen werden, dass sie sich alle wie Bacteriorhodopsin verhalten. Andere Membranproteine können durchaus mehr tryptische Schnittstellen oder größere lösliche Anteile besitzen, so dass sie mit Trypsin gut nachweisbar sind. Für die Identifikation löslicher Proteinkomponenten oder ganzer löslicher Proteine ist Trypsin aufgrund seiner extrem zuträglichen Spezifität unverzichtbar und sollte deshalb immer erste Wahl sein, wenn auch diese Bestandteile der Probe identifiziert werden sollen. Mit Trypsin werden sich aus einem komplexen Proteingemisch auch immer die größte Anzahl an Proteinen nachweisen lassen, da für die Datenbanksuchen niedrigere Kriterien für das Erreichen einer signifikanten Proteinidentifikation gelten. Diese Aussage ist ebenso für die Untersuchung von Membranproteomen gültig, da diese neben den assoziierten löslichen Proteinen auch meist für Trypsin zugängliche hydrophile Bereiche in den Membranproteinen besitzen. Für den ersten Blick auf ein unbekanntes Membranproteom sollte deshalb immer zuerst ein tryptischer Verdau durchgeführt werden.

Nun kommt es bei den tryptischen Analysen jedoch vor, dass bestimmte Membranproteine in der Datenbanksuche drastisch unterrepräsentiert sind oder gar nicht identifiziert werden. Um an weitere Information über diese Proteine zu gelangen, können weniger spezifische Proteasen eingesetzt werden. Egal ob hierzu Elastase, Chymotrypsin, Proteinase K oder Pepsin verwendet werden, es sind aufgrund der geeigneteren Schnittspezifitäten zusätzliche Daten erzeugbar. Insbesondere mit Elastase lassen sich die Helixbereiche der Membranproteine gut abdecken, dies kann aber auch mit Pepsin oder Chymotrypsin bewerkstelligt werden. Die Helices werden in Verdaus mit Chymotrypsin überwiegend durch große Peptide abgedeckt, so dass nur vereinzelt Schnitte tatsächlich in der Membran erfolgen. Bei Pepsin und vor allem bei Elastase kommen auch zahlreiche Schnitte in der Helix vor, so dass letztendlich eine höhere Redundanz erzielt wird. Zusammen mit tryptischen Daten ist dann die wohl umfassendste Untersuchung eines Membranproteoms gegeben. Dennoch muss beachtet werden, dass auch Proteine existieren, die mit Elastase nicht analysiert werden können. Proteine mit längeren Sequenzbereichen, welche fast ausschließlich aus elastatischen Schnittstellen zusammengesetzt sind, werden unter

Umständen übermäßig proteolysiert werden. Für die Analyse solcher Proteine kann dann wiederum eine andere Protease besser geeignet sein. Festzuhalten bleibt, dass es wahrscheinlich für jedes Protein ein optimales Enzym gibt. Im Falle von Bacteriorhodopsin und sicherlich vieler anderer Membranproteine ist dies Elastase, so dass das Enzym zu diesem Zweck universell einsetzbar ist. Eine kategorisierte Bewertung der behandelten Proteasen wird in Tabelle 5-1 vorgenommen.

Tab. 5-1: Bewertung der einzelnen Proteasen für den *Proteomics*-Einsatz.

Die Proteasen werden in den verschiedenen Kategorien Spezifität, Autoproteolyse, entstehende Peptidgröße, Vorkommen potentieller Schnittstellen in den Helixbereichen und Membranzugang bewertet. Grundlage für die Bewertung sind ausschließlich die in dieser Dissertation durchgeführten Experimente. (mod.) – vom Hersteller chemisch modifizierte Enzymprodukte

	Protease					Referenz
	Elastase	Chymotrypsin (mod.)	Glu-C (mod.)	Proteinase K	Pepsin (mod.)	Trypsin (mod.)
Spezifität	∅	+	+	--	-	++
Autoproteolyse	∅	+	--	--	-	++
Peptidgröße	∅	++	++	-	∅	++
Schnittstellen in Helix	++	∅	--	++	++	--
Membranzugang	++	∅	--	-	+	--

Anhand der gesammelten Daten kann von einer Verwendung von Proteinase K und Glu-C nur abgeraten werden, da die Probleme des Selbstverdaus und der unkontrollierten Aktivität die Vorteile überwiegen.

Auch die Proteolyse im Gel aufgetrennter Proteine mit sukzessiver PMF-Analytik ist eine große Domäne tryptischer Verdaus, da es dabei auf hohe Spezifität und eine geringe Neigung zum Selbstverdaus ankommt. Mittels Chymotrypsin lassen sich auch Membranproteine aus einem Gel nachweisen, zu Glu-C, Proteinase K und Pepsin fehlen entsprechende Vergleichsdaten. Wahrscheinlich sind diese Enzyme im Geleinsatz den anderen auch deutlich unterlegen, da sie höhere Autoproteolyseraten aufweisen und die Spezifitäten von Proteinase K und Pepsin zumindest für PMF nicht ausreichen. In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass auch mit Elastase der Proteinverdaus in einem Gel möglich ist. Unter den gewählten Verdaubedingungen lässt sich das Membranprotein Bacteriorhodopsin hydrolysieren, ohne dass der Selbstverdaus größere Ausmaße annimmt. Die AVILST-Spezifitätsdefinition reicht auch im Gelversuch aus, um eine ansprechende

Proteinidentifikation zu erlangen. Somit sollte auch der Einsatz von Elastase in umfassenderen Gelexperimenten wie z.B. 2D-Gelsystemen möglich sein. Problematisch könnte es lediglich werden, falls sich zu viele verschiedene Proteine in einem Gelspot befinden. Dann käme es vermutlich zu zahlreichen Mehrfachzordnungen, welche die Aussagekraft des Spektrums verringern. Auch bei gering konzentrierten Proteinen kann gegebenenfalls eine Identifizierung mit Elastase nicht mehr möglich sein, da aufgrund des bereits beschriebenen Verdünnungseffekts die Sensitivität der Methode leidet.

Neben der qualitativen Identifikation eines Proteins aus einem komplexen Gemisch ist die Bestimmung der Proteinmenge ein zweites großes Teilgebiet in der Proteomforschung, welches allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit ist. Es haben sich mehrere Verfahren etabliert, um eine quantitative Aussage über das relative Mengenverhältnis zweier Proteinproben treffen zu können. Üblicherweise werden die zu vergleichenden Protein- oder Peptidlösungen mit differenzierbaren isobaren Massentags derivatisiert und dann zusammen vermessen (*iTRAQ*TM, *TMT*TM). In den Fragmentspektren einzelner Peptide werden dann Reporterionen sichtbar, deren Intensitätsverhältnis zur Quantifizierung verwendet werden kann. Wird vor der Derivatisierung proteolytisch gespalten, kann nur dann erfolgreich quantifiziert werden, wenn die Verdau absolut reproduzierbar verläuft. Der Verdau mit spezifischen Proteasen verläuft meist vollständig, so dass Endpunktspektren erhalten werden. Beim Einsatz von Enzymen wie Elastase bestünde die Gefahr, dass aufgrund der hohen Verfügbarkeit an Schnittstellen nicht immer die gleichen Peptide nach Ablauf der Spaltung vorliegen. In diesen Fällen wären die Quantifizierungsergebnisse nicht aussagekräftig. Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Elastaseverdau geben jedoch berechtigten Grund zur Annahme, dass auch mit Elastase auf diese Weise quantifiziert werden kann. Trotz verschiedener eingesetzter Probenmengen liegen die Unterschiede zwischen den erhaltenen Peptidmustern absolut im Rahmen. Sollte die Quantifizierung auf diesem Wege trotzdem fehlschlagen, kann immer noch auf Proteinebene vor der Proteolyse derivatisiert werden. Dabei werden die unterschiedlich gelabelten Proben zusammen in einem Ansatz verdaut und sind von der Protease weitgehend unabhängig. Etwaige Schnittstellen werden durch die überwiegend aminoreaktiven Quantifizierungsreagenzien bei Verwendung von Elastase nicht blockiert, wie es bei Trypsin der Fall ist. Auch metabolische oder chemische *Labelling*-Verfahren (*SILAC*TM, *ICPL*TM, *ICAT*TM) sind mit Elastase anwendbar.

Zusammenfassend stellt Elastase eine weitere nützliche Ergänzung zum Proteaserepertoire des Proteomforschers dar. Ihre Stärken liegen vornehmlich in der Eignung zur Proteolyse von Membranproteinen, da auch die Helixbereiche dem Enzym zugänglich sind. Die vorliegende Spezifität reicht aus, um PMF-Anwendungen an Einzelproteinen durchzuführen, ist aber schwieriger zu handhaben als die tryptische. Fortgeschrittene Anwendungen mit Elastase sind denkbar und sollten möglichst zeitnah verwirklicht werden.

Kapitel 6

ZUSAMMENFASSUNG

6. Zusammenfassung

Diese Dissertation befasst sich mit der massenspektrometrischen Analytik von Membranproteinen. Diese gestaltet sich aufgrund der hydrophoben Natur der Proteine und der damit verbundenen schlechten Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen als deutlich schwieriger als die Untersuchung löslicher Proteine. Einige weitere Probleme entstehen durch die konsequente Verwendung der Referenzprotease Trypsin zur Hydrolyse der Proteine. Sie spaltet ausschließlich Peptidbindungen nach basischen Aminosäuren, die naturgemäß in den unpolaren Helixbereichen der Membranproteine nur vereinzelt anzutreffen sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf weniger spezifischen Proteasen basierende Protokolle zur Analyse von ganzen Membranproteomen entwickelt, welche einige der ursprünglichen Probleme umgehen oder zumindest vermindern. Die Proteolysereaktion fand in Anwesenheit von Methanol statt, welcher die Membranstruktur destabilisiert und so die Zugänglichkeit der in die Membran eingebetteten Proteinteile für das Enzym erhöht. Zusätzlich erhöhte sich dadurch die Löslichkeit gebildeter hydrophober Peptide im Puffer.

Das neue Protokoll wurde an Bacteriorhodopsin, einem geläufigen Modellsystem für α -helikale Membranproteine, erfolgreich etabliert. Bei Verwendung der Proteasen Elastase und Pepsin konnten nach nLC-Trennung und MALDI-MS/MS deutlich mehr Peptide des Membranproteins signifikant identifiziert werden, als es mit Trypsin möglich gewesen ist. Auch qualitativ ergaben sich Unterschiede zwischen beiden Enzymen. Mit den alternativen Enzymen ließen sich nicht nur die hydrophilen peripheren Proteinabschnitte nachweisen, sondern auch zahlreiche Peptide aus den hydrophoben Transmembranbereichen. Das am Modellprotein etablierte Elastase-Protokoll konnte problemlos auf die Analyse des komplexeren Membranproteoms von *Corynebacterium glutamicum* transferiert werden. So konnten ca. 150 verschiedene Proteine identifiziert werden, darunter auch zahlreiche Membranproteine. Die erzeugten Peptidmischungen wurden nicht nur mittels nLC-MALDI-TOF/TOF sondern auch mit einer nLC-ESI-Orbitrap-Plattform analysiert. Anhand einer detaillierten Analyse der physikochemischen Eigenschaften der entstandenen Peptide konnte gezeigt werden, dass der dabei beobachtete Vorteil des ESI-Instrumentes zu großen Teilen auf die bessere Detektion aliphatischer Neutralpeptide zurückzuführen war. Diese werden bei der MALDI vornehmlich aufgrund der schlechteren Ionisation bei Verwendung der Standardmatrix α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure diskriminiert.

Ein weiterer Vorteil des verwendeten ESI-Gerätes ist seine bessere Massengenauigkeit durch den hochauflösenden Orbitrap-Massenanlyator. Wurden die MALDI-TOF/TOF-Fragmentierungsdaten durch, auf einem zweiten Instrument gemessene, genaue MALDI-Orbitrap-Vorläufermassen supplementiert, konnten über 30% mehr Peptide signifikant identifiziert werden.

Die gesammelten Daten konnten zur Erhebung einiger Statistiken über Elastase und Pepsin herangezogen werden. Erstmals wurde eine umfassende Untersuchung der Spaltspezifität von Elastase vorgenommen. Das Enzym hydrolysiert in ca. 82% der Fälle nach den kleinen hydrophoben Aminosäuren Ala, Val, Ile, Leu, Ser und Thr. Diese Spezifität ist für proteolytische Schnitte innerhalb der hydrophoben Helixbereiche von Membranproteinen äußerst vorteilhaft. Sie reicht aus, um *Peptide Mass Fingerprinting* an Einzelproteinen durchzuführen, wie exemplarisch am Modellprotein Bacteriorhodopsin gezeigt wurde. Die für Pepsin erhaltene Spezifität ist hingegen zu undifferenziert für solche Experimente, weshalb hier MS/MS-basierte Strategien vorzuziehen sind.

Weitergehende Verbesserungen für Datenbanksuchen mit weniger spezifischen Proteasen wurden vorgeschlagen. Hierzu wurde erstmals eine größere Fragmentierungsstatistik eines nichttryptischen Datensatzes auf einem MALDI-Instrument erstellt, deren Aussage zur Verifizierung von Suchergebnissen in die Algorithmen implementiert werden kann.

Beim Einsatz weniger spezifischer Proteasen erhöht sich im Vergleich zu Trypsin die entstehende Peptidkomplexität. Zur Kompensation dessen wurde eine Fraktionierung mittels *Off-gel* IEF vor der nLC-MALDI-Analyse etabliert. Zwecks direkter Kompatibilität zur nLC wurde ein *Off-gel* IEF-Protokoll ohne die Probeninjektion störendes Glycerol entwickelt. So ließ sich die dreifache Menge an Peptiden nachweisen, als mit ausschließlich eindimensionaler nLC-Trennung.

In Verbindung mit den durch Trypsin erzielbaren Resultaten lassen sich mit den weniger spezifischen Enzymen viele Membranproteine umfassender charakterisieren, da zusätzlich die hydrophoben Transmembranbereiche und somit mehr Informationen für die Analytik zugänglich sind. Der gezielte Einsatz von alternativen Enzymen verbessert die momentane Situation in der Membranproteom-Analytik deutlich und führt diese einen weiteren Schritt an die Analytik löslicher Proteine heran.

Kapitel 7

**ABKÜRZUNGS-
VERZEICHNIS**

7. Abkürzungsverzeichnis

Dieses Kapitel enthält eine Aufzählung aller in dieser Dissertation verwendeten Abkürzungen und Akronyme. Nicht gesondert aufgeführt sind sämtliche Einheiten und Präfixe des *Système international d'unités* (SI) und die Symbole und Nomenklatur chemischer Formeln nach *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

μLC	<i>microbore</i> Flüssigchromatographie
16-BAC	16-Benzyl-dimethyl- <i>n</i> -Hexadecylammoniumchlorid
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
A	Alanin
ABC	Ammonium-Hydrogencarbonat
ACTH	Adrenocorticotropin
AG	Arbeitsgruppe
Ala	Alanin
AP	Atmosphärendruck
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ASB	Amidosulfobetain
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure/Aspartat
B	magnetischer Sektor
BN	Blau-nativ
BNPS-Skatol	3-Bromo-2-Methyl-2-(2-Nitrophenylthio)-3H-Indol
bp	Basenpaar
BPC	<i>Base Peak</i> -Chromatogramm
BR	Bacteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
BuOH	<i>n</i> -Butanol

C	Cystein
C18	C18-Umkehrphase
CD	Zirkulardichroismus
CEM	<i>Channeltron</i>
CFCA	α -Cyano-2,4-Difluorzimtsäure
CGC	Corynebacterium glutamicum-Cytosol
CGM	Corynebacterium glutamicum-Membranen
CHAPS	3-Chloramidopropyl-Dimethylammonio-1-Propansulfat
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure
CI	Chemische Ionisation
CIEF	Kapillar-IEF
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
CICCA	4-Chlor- α -Cyanozimtsäure
CN	Klar-nativ
CNBr	Bromcyan
CSG	Cell Surface Glycoprotein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Trap	<i>Curved-Trap</i>
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure/Aspartat
Da	Dalton
DART	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
DB	Datenbank
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -Maltosid
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dSDS	Doppel-SDS
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	elektrischer Sektor
E	Glutaminsäure/Glutamat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	Elektronentransfer-Dissoziation

EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FA	Ameisensäure
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>
FDI	Felddesorptions-Ionisation
FPR	Falschpositivenrate
FT	Fourier-Transformation
FT-ICR	Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz
G	Glycin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure/Glutamat
Gly	Glycin
GRAVY	<i>Grand Average of Hydropathy</i>
H	Histidin
HCD	<i>Higher Energy Collisional Dissociation</i>
HDX	Wasserstoff/Deuterium-Austausch
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HFBA	Heptafluorbutansäure
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
His	Histidin
I	Isoleucin
IAA	<i>N</i> -Iodacetamid
ICAT	<i>Isotope Coded Affinity Tag</i>
ICPL	<i>Isotope Coded Protein Label</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ile	Isoleucin
iPrOH	Isopropanol
IT	Ionenfalle
iTRAQ	<i>Isobaric Tag for relative and absolute Quantitation</i>
K	Lysin
k_{cat}	Wechselzahl
K_m	Michaelis-Konstante
L	Leucin

LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LDI	Laserdesorption/Ionisation
Leu	Leucin
LIT	Lineare Ionenfalle
Lys	Lysin
M	Methionin
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
MCP	Multikanalplatte
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MGF	<i>Mascot Generic File</i>
MOWSE	<i>Molecular Weight Score</i>
MS	Massenspektrometrie
MudPIT	Multidimensionale Proteinidentifikations-Technologie
N	Asparagin
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
nLC	<i>nanobore</i> Flüssigchromatographie
OG	β - <i>n</i> -D-Octylglucosid
OGE	<i>Off-gel</i> -Isoelektrische Fokussierung
oTOF	orthogonaler Flugzeitmassenanalysator
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	<i>RSCB Protein Data Base</i>
PDI	Plasmadesorption-Ionisation
Phe	Phenylalanin
pI	Isoelektrischer Punkt
PM	Purpurchmembranen
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PQD	gepulste Quadrupol-Dissoziation
PrOH	1-Propanol

PSD	<i>Post Source Decay</i>
Q	Glutamin
Q/q	Quadrupol
QIT	Quadrupol-Ionenfalle
QqQ	<i>Triple Quadrupol</i> -Massenanalysator
R	Arginin
S	Serin
S/R	Signal-zu-Rauschverhältnis
SAX	starke Anionenaustausch-Chromatographie
SCX	starke Kationenaustausch-Chromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SEV	Sekundärelektronen-Vervielfacher
SILAC	<i>Stable Isotope Labelling with Amino Acids in Cell Culture</i>
T	Threonin
tBuOH	<i>tert</i> -Butanol
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TIS	<i>Timed Ion Selector</i>
TMT	<i>Tandem Mass Tag</i>
TOF	Flugzeitmassenanalysator
TPCK	<i>N</i> α -Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethylketon
TRIS	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-Propan-1,3-Diol
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
V	Valin
Val	Valin
W	Tryptophan
X	beliebige Aminosäure
XIC	<i>Extracted Ion</i> -Chromatogramm
Y	Tyrosin

Kapitel 8

LITERATUR- VERZEICHNIS

8. Literaturverzeichnis

- Abe S.**, Takayama K.I., Kinoshita S. (1967), *J Gen Appl Microbiol*, 13, 279-301
- Adamian L.**, Liang J. (2002), *Proteins*, 47, 209-218
- Alikhanov S.G.** (1957), *Sov Phys JETP*, 4, 452
- Arnaud I.L.**, Josserand J., Rossier J.S., Girault H.H. (2002), *Electrophoresis*, 23, 3253-3261
- Asbóth B.**, Polgár L. (1983), *Biochemistry*, 22, 117-122
- Aston F.W.** (1918), *Phys Rev*, XI, 316
- Babusiak M.**, Man P., Petrak J., Vyoral D. (2007), *Proteomics*, 7, 121-129
- Bachovin W.W.**, Roberts J.D. (1978), *J Am Chem Soc*, 100, 8041-8047
- Bagshaw R.D.**, Mahuran D.J., Callahan J.W. (2005), *Mol Cell Proteomics*, 4, 133-143
- Baird T.T. Jr.**, Wang B., Lodder M., Hecht S.M., Craik C.S. (2000), *Tetrahedron Lett*, 56, 9477-9485
- Bajorath J.**, Saenger W., Pal G.P. (1988), *Biochim Biophys*, 954, 176-182
- Barbosa J.A.R.G.**, Saldanha J.W., Garratt, R.C. (1996), *Protein Eng*, 9, 951-601
- Baudry J.**, Takhorshid E., Molnar F., Phillips J., Schulten K. (2001), *J Phys Chem B*, 105, 905-918
- Bäumlisberger D.**, Jaskolla T.W., Arrey T.N., Rietschel B., Karas M. (2009), *DGMS Jahrestagung 2009*, Poster PWA: 129
- Beavis R.C.**, Chait B.T. (1989), *Rapid Commun Mass Spectrom*, 3, 432-435
- Beckey H.D.** (1969), *Research/Development*, 20, 26
- Bender M.L.**, Kézdy F.J. (1965), *Annu Rev Biochem*, 34, 49-76
- Berg J.M.**, Tymoczko J.L., Stryer L., Clarke N.D. (2002), *Biochemistry 5th Edn.*, 1163-1164
- Bergman M.**, Fruton J.S. (1941), *Adv Enzymol*, 1, 63-98
- Betzel C.**, Gourinath, S., Kumar P., Kaur P., Perbandt M., Eschenburg S., Singh T.P. (2001), *Biochemistry*, 40, 3080-3088
- Biemann K.** (1982), *J Mass Spect Ion Phys*, 45, 183-194
- Bieth J.G.** (1978), *Frontiers of Matrix Biology Vol. 6*, 1-82
- Bieth J.G.** (1986), *Biology of Extra-Cellular Matrix Vol. 1*, 217-320
- Bieth J.G.**, Dirrig S., Jung M.L., Boudier C., Papamichael E., Sakrarellos C., Dimicoli J.L. (1989), *Biochim Biophys Acta*, 994, 64-74
- Bieth J.G.** (2004), *Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd Edn*, 1504-1508
- Blackler A.R.**, Klammer A.A., MacCoss M.J., Wu C.C. (2006), *Anal Chem*, 78, 1337-1344
- Blonder J.**, Goshe M.B., Moore R.J., Pasa-Tolic L., Masselon C.D., Lipton M.S., Smith R.D. (2002), *J Proteome Res*, 1, 351-360

- Blonder J.**, Terunuma A., Conrads T.P., Chan K.C., Yee C., Lucas D. et al. (2004a), *J Invest Dermatol*, 123, 691-699
- Blonder J.**, Conrads T.P., Yu L.R., Terunuma A., Janini G.M., Issaq H.J et al. (2004b), *Proteomics*, 4, 31-45
- Blonder J.**, Chan K.C., Issaq H.C., Veenstra T.D. (2006), *Nat Protoc*, 1, 2784-2790
- Blow D.M.**, Birktoft J.J., Hartley B.S. (1969), *Nature*, 221, 337-340
- Blundell T.L.**, Cooper J., Foundling S.L., Jones D.M. Atrash B., Szelke M. (1987), *Biochemistry*, 26, 5585-5590
- Bode W.**, Meyer E., Powers J.C. (1989), *Biochemistry*, 28, 1951-1963
- Borner G.H.**, Sherrier D.J., Weimar T., Michaelson L.V., Hawkins N.D., Macaskill A. et al. (2005), *Plant Physiol*, 137, 104-116
- Bosserhoff A.**, Wallach J., Frank R.W. (1989), *J Chromatogr*, 473, 71-77
- Bowie J.U.** (1997), *J Mol Biol*, 272, 780-789
- Boyle J.G.**, Whitehouse C.M. (1992), *Anal Chem*, 64, 2084-2089
- Breci L.A.**, Tabb D.L., Yates J.R. 3rd, Wysocki V.H. (2003), *Anal Chem*, 75, 1963-1971
- Breddam K.**, Meldal M. (1992), *Eur J Biochem*, 206, 103-107
- Brömme D.**, Peters K., Fink S., Fittkau S. (1986), *Arch Biochem Biophys*, 244, 439-446
- Brown S.R.**, Lennon J.J. (1995), *Anal Chem*, 67, 1998-2003
- Bruyneel B.**, Hoos J.S., Smoluch M.T., Lingemann H., Niessen W.M., Irth H. (2007), *Anal Chem*, 79, 1591-1598
- Burré J.**, Beckhaus T., Corvey C., Karas M., Zimmermann H., Volkmandt W. (2006a), *Electrophoresis*, 27, 3488-3496
- Burré J.**, Beckhaus T., Schägger H., Corvey C., Hofmann S., Karas M., Zimmermann H., Volkmandt W. (2006b), *Proteomics*, 6, 6250-6262
- Buxbaum E.** (2003), *Anal Biochem*, 314, 70-76
- Cameron A.E.**, Eggers D.F. (1948), *Rev Sci Instr*, 19, 605-607
- Cañas B.**, Piñero C., Calvo E., López-Ferrer D., Gallardo J.M. (2007), *J Chromatogr A*, 1153, 235-258
- Carboni L.**, Piubelli C., Righetti P.G., Jansson B., Domenici E. (2002), *Electrophoresis* 23, 4132-4141
- Cargile B.J.**, Bundy J.L., Freeman T.W., Stephenson J.L. Jr. (2004), *J Proteome Res*, 3, 112-119
- Cargile B.J.**, Sevinsky J.R., Essader A.S., Stephenson J.L. Jr., Bundy J.L. (2005), *J Biolmol Tech*, 16, 181-189
- Carmona C.**, Gray G.L. (1987), *Nucleic Acids Res*, 15, 6757
- Carroll D.I.**, Dzidic I., Stillwell R.N., Haegele K.D., Horning E.C. (1975), *Anal Chem*, 47, 2369
- Castellanos-Serra L.**, Paz-Lago D. (2002), *Electrophoresis*, 23, 1745-1753
- Cech N.B.**, Enke C.G. (2000), *Anal Chem*, 72, 2717-2723
- Chamberlain A.K.**, Faham S., Yohannan S., Bowie J.U. (2003), *Adv Protein Chem*, 63, 19-46
- Chen K.**, Arnold F. (1993), *Protein Sci*, 11, 2774-2791

- Chenau J.**, Michelland S., Sidibe J., Seve M. (2008), *Proteome Sci*, 6, 9
- Chevallet M.**, Santoni V., Poinas A., Rouquié D., Fuchs A., Kieffer S. *et al.* (1998), *Electrophoresis*, 16, 345-379
- Chick J.M.**, Haynes P.A., Molloy M.P., Bjellqvist B., Baker M.S., Len A.C. (2008), *J Proteome Res*, 7, 1036-1045
- Chothia C.** (1975), *J Mol Biol*, 105, 1-14
- Coates M.L.**, Wilkins C.L. (1985), *Biomed Mass Spectrom*, 12, 424-428
- Cody R.B.**, Laramée J.A., Durst H.D. (2000), *Anal Chem*, 77, 2297
- Comisarow M.B.**, Marshall A.G. (1974), *Chem Phys Lett*, 25, 282-283
- Cooper J.B.**, Khan G., Taylor G., Tickle I.J., Blundell T.L. (1990), *J Mol Biol*, 24, 199-222
- Corcelli A.**, Lattanzio V.M., Mascolo G., Papadia P., Fanizzi F. (2002), *J Lipid Res*, 43, 132-140
- Corey D.R.**, Craik C.S. (1992), *J Am Chem Soc*, 114, 1784-1790
- Coughenour H.D.**, Spaulding R.S., Thompson C.M. (2004), *Proteomics*, 4, 3141-3155
- Covey T.R.**, Huang E.C., Henion J.D. (1991), *Anal Chem*, 63, 1193-1200
- Craik C.S.**, Largman C., Fletcher T., Barr P., Fletterick R., Rutter W.J. (1985), *Science*, 228, 291-297
- Craik C.S.**, Rocznik S., Largman C., Rutter W.J. (1987), *Science*, 237, 909-913
- Da Cruz S.**, Xenarios I., Langridge J., Vilbois F., Parone P.A., Martinou J.C. (2003), 278, 41566-71
- Delahunty C.**, Yates J.R. 3rd (2005), *Methods*, 35, 248-255
- Delmotte N.**, Lasaosa M., Tholey A., Heinzle E., Huber C.G. (2007), *J Proteome Res*, 6, 4363-4373
- Delom F.**, Szponarski W., Sommerer N., Boyer J.C., Bruneau J.M., Rossignol M., Gibrat R. (2006), *Proteomics*, 3029-3039
- Dempster A.J.** (1917), *Phys Rev*, XI, 316
- Desnuelle P.** (1960), *The Enzymes Vol. 4*, 93-118
- Dole M.**, Mack L.L., Hines R.L. (1969), *J Chem Phys*, 49, 2240-2249
- Drapeau G.R.**, Boily Y., Houmard J. (1972), *J Biol Chem*, 247, 6720-6726
- Dunn B.M.**, Jimenez M., Parten B.F., Valler M.J., Rolph C.E., Kay J. (1986), *Biochem J*, 237, 899-906
- Ebeling W.**, Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., Lang H. (1974), *Eur J Biochem*, 47, 91-97
- Eichacker L.A.**, Granvogel B., Mirus O., Müller B.C., Miess C., Schleiff E. (2004), *J Biol Chem*, 279, 50915-50922
- Elias J.E.**, Gygi S.P. (2007), *Nat Methods*, 4, 207-214
- Elschenbroich S.**, Ignatchenko V., Sharma P., Schmitt-Ulms G., Gramolini A.O., Kislinger T. (2009), *J Proteome Res*, 8, 4860-4869
- Ens W.**, Mao Y.M.F., Mayer F., Standing K.G. (1991), *Rapid Commun Mass Spectrom*, 5, 117-123
- Ericson C.**, Phung Q.T., Horn D.M., Peters E.C., Fitchett, J.R., Ficarro S.B. *et al.* (2003), *Anal Chem*, 75, 2309-2315
- Essader A.S.**, Cargile B.J., Bundy J.L., Stephenson, J.L. Jr. (2005), *Proteomics*, 5, 24-34

- Essen L., Siegert R., Lehmann W.D., Oesterhelt D. (1998), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11673-11678
- Feller S.E., Gawritsch K., MacKerell A.D. Jr. (2002), *J Am Chem Soc*, 124, 318-326
- Fenn J.B. (1988), *36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*
- Fenner N.C., Daly N.R. (1966), *Rev Sci Instr*, 37, 1068-1070
- Fersht A.R., Sperling J. (1973), *J Mol Biol*, 74, 137-149
- Fink A.L., Painter B. (1987), *Biochemistry*, 26, 1665-1671
- Fischer F., Wolters D., Rögner M., Poetsch A. (2006a), *Mol Cell Proteomics*, 5, 444-453
- Fischer F., Poetsch A. (2006b), *Proteome Sci*, 2, 4:2
- Fontana A. (1972), *Meth Enzymol*, 25, 419-423
- Frahm J.L., Bori I.D., Comins D.L., Hawkrige A.M., Muddiman D.C. (2007), *Anal Chem*, 79, 3989-3995
- Fraterman S., Zeiger U., Khurana T.S., Rubinstein N.A., Wilm M. (2007), *Proteomics*, 7, 3404-3416
- Fruton J.S. (1976), *Adv Enzymol*, 44, 1-36
- Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S., Lazarow P.B. (1982), *J Cell Biol*, 93, 97-102
- Galeva N., Altermann M. (2002), *Proteomics*, 2, 713-722
- Galkin A., Meyer B., Wittig I., Karas M., Schägger H., Vinogradov A., Brandt U. (2008), *J Biol Chem*, 283, 20907-20913
- Gao X., Wen X., Esser L., Quinn B., Yu L., Yu C.A., Yia D. (2003), *Biochemistry*, 42, 9067-9080
- Gaucher S.P., Taylor S.W., Fahy E., Zhang B., Warnock D.E., Ghosh S.S., Gibson B.W. (2004), *J Proteome Res*, 3, 495-505
- Gertler A., Birk Y. (1970), *Eur J Biochem*, 12, 170-176
- Glish G.L., Goeringer D.E. (1984), *Anal Chem*, 56, 2291
- Goo Y.A., Yi E.C., Baliga N.S., Tao W.A., Pan M., Aebersold R. et al. (2003), *Mol Cell Proteomics*, 2, 506-524
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J. (2004), *Proteomics*, 4, 1293-1304
- Görg A., Drews O., Lück C., Weiland F., Weiss W. (2009), *Electrophoresis*, Suppl1, S122-S132
- Gráf L., Craik C.S., Patthy A., Roczniak S., Fletterick R.J., Rutter W.J. (1987), *Biochemistry*, 26, 2161-2623
- Gráf L., Jancso A., Szilágyi L., Hegyi G., Pinter K., Natay-Stabó G. et al. (1988), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 4961-4965
- Graham R.L., O'Loughlin S.N., Pollock C.E., Ternan N.G., Weatherly D.B., Jackson P.J. et al. (2006), *J Proteome Res*, 5, 2465-2473
- Graham R.L., Pollock C.E., O'Loughlin S.N., Ternan N.G., Weatherly D.B., Tarleton R.L., McMullan G. (2007), *Proteomics*, 7, 82-91
- Grigorieff N., Ceska T.A., Downing K.H., Baldwin J.M., Henderson R. (1996), *J Mol Biol*, 259, 393-421
- Gross E., Witkop B. (1962), *J Biol Chem*, 237, 1856-1860

- Hamuro Y.**, Coales S.J., Molmar K.S., Tuske S.J., Morrow J.A. (2008), *Rapid Commun Mass Spec*, 22, 1041-1046
- Han J.**, Schey K.L. (2004), *J Proteome Res*, 3, 807-812
- Han X.**, Aslanian A., Yates J.R. 3rd (2008), *Curr Opin Biol Chem*, 12,483-490
- Hannig K.** (1978), *J Chromatogr*, 159, 183-191
- Harris J.L.**, Backes B.J., Leonetti F., Mahrus S., Ellman J.A., Craik C.S. (2000), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7754-7759
- Hartinger J.**, Stenius K., Hogemann D., Jahn R. (1996), *Anal Biochem*, 240, 126-133
- Haussmann U.**, Qi S.W., Wolters D., Rögner M., Liu S.J., Poetsch A. (2009), *Proteomics*, 9, 3635-3651
- Hedstrom L.**, Szilági L., Rutter W.J. (1992), *Science*, 255, 1249-1253
- Hedstrom L.**, Farr Jones S., Kettner C.A., Rutter W.J. (1994), *Biochemistry*, 33, 8764-8769
- Heller M.**, Michel P.E., Morier P., Crettaz D., Wenz C., Tissot J.D. *et al.* (2005a) *Electrophoresis*, 26, 1174-1188
- Heller M.**, Ye M., Michel P.E., Morier P., Stalder D., Jünger M.A., Aebersold R. *et al.* (2005b), *J Proteome Res*, 4, 2273-2282
- Henderson R.** (1970), *J Mol Biol*, 54, 341-354
- Henry K.D.**, Williams E.R., Wang B.H., McLafferty F.W., Shabanowitz J., Hunt D.F. (1989), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9075-9078
- Henzel W.J.**, Billeci T.M., Stults J.T., Wong S.C., Grimley C., Watanabe C. (1993), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 5011-5015
- Herbert B.**, Righetti P.G. (2000) *Electrophoresis*, 21, 3639-3648
- Hermann T.**, Finkemeier M., Pfefferle W., Wersch G., Krämer R., Burkovski A. (2000), *Electrophoresis*, 21, 654-659
- Hermann T.** (2003), *J Biotechnol*, 104, 155-172
- Hillenkamp F.**, Karas M., Beavis R.C., Chait B.T. (1991), *Anal Chem*, 63, 1193-1203
- Hillenkamp F.**, Karas M. (2000), *Int J Mass Spectrom*, 2000, 71-77
- Hillinger M.**, Hertel T. (1997), *J Basic Microbiol*, 37, 29
- Hirokawa T.**, Boon-Chieng S., Mikatu S. (1998), *Bioinformatics*, 14, 378-379
- Hjelmeland L.M.** (1980), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 6368-6370
- Hopkins A.L.**, Groom, C.R. (2002), *Nat Rev Drug Discov*, 1, 727-730
- Horneffer V.**, Forsmann A., Strupat K., Hillenkamp F., Kubitschek U. (2001), *Anal Chem*, 73, 1016-1022
- Hörth P.**, Miller C.A., Preckel T., Wenz C. (2006), *Mol Cell Proteomics*, 5, 1968-1974
- Howell K.E.**, Palade G.E. (1982), *J Cell Biol*, 92, 822-832
- Huang Y.**, Triscari J.M., Wysocki V.H., Pasa-Tolic L., Anderson G.A., Lipton M.S., Smith R.D. (2004), *J Am Chem Soc*, 126, 3034-3035
- Hübner N.C.**, Ren S., Mann M. (2008), *Proteomics*, 8, 4862-4872

- Huenerbein** A., Schmelzer C.E.H., Neubert R.H. (2007), *Anal Chim Acta*, 584, 72-77
- Hunt** D.F., Henderson R.A., Shabanowitz J., Sakaguchi L., Michel H., Sevilir N. *et al.* (1992), *Science*, 255, 1261-1263
- Hunziker** P.E., Hughes G.J., Wilson K.J. (1980), *Biochem J*, 187, 515-519
- Hunzinger** C., Wozny W., Schwall G.P., Poznanovic, Stegmann W., Zengerling H *et al.* (2006), *J Proteome Res*, 5, 625-633
- Hurwitz** N., Pellegrini-Calace M., Jones D.T. (2006), *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361, 465-475
- Ikeda** M., Nakagawa S. (2003), *Appl Microbiol Biotechnol*, 62, 99-109
- Inman** F.P., Nisonoff A. (1966), *J Biol Chem*, 241, 322-329
- James** M.N.G., Sielecki A.R., Hayakawa K., Gelb M.H. (1992), *Biochemistry*, 31, 3872-3886
- James** P., Quadroni M., Carfoli E., Gonnet G. (1993), *Biochem Biophys Res Commun*, 195, 58-64
- Jaskolla** T.W., Lehmann W.D., Karas M. (2008), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 12200-12205
- Jaskolla** T.W., Papatotiriou D.G., Karas M. (2009), *J Proteome Res*, 8, 3588-3597
- Jennings** K.R. (1968), *Int J Mass Spec Ion Physics*, 1, 227-235
- Jenö** P., Scherer P.E., Manning-Krieg U., Horst M. (1993), *Anal Biochem*, 215, 292-298
- Johnson** R.S., Davis M.T., Taylor J.A., Patterson S.D. (2005), *Methods*, 35, 223-236
- Kalinowski** J., Bathe B, Bartels D, Bischoff N., Bott M., Burovski A. *et al.* (2003), *J Biotechnol*, 104, 5-25
- Käll** L., Krogh A., Sonnhammer E.L. (2004), *J Mol Biol*, 338, 1027-1036
- Karas** M., Bachmann D., Hillenkamp F., (1985), *Anal Chem*, 57, 2935-2939
- Karas** M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. (1987), *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 78, 53-68
- Karas** M., Hillenkamp F. (1988), *Anal Chem*, 60, 2299-2301
- Karas** M., Ingendoh A., Bahr U., Hillenkamp F. (1989a), *Biomed Environ Mass Spectrom*, 18, 841-8843
- Karas** M., Bahr U., Hillenkamp F. (1989b), *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 92, 231-242
- Karas** M., Bahr U., Ingendoh A., Stahl B., Hillenkamp F. (1990), *Anal Chim Acta*, 241, 175-185
- Karas** M., Bahr U., Gießmann U. (1991), *Mass Spectrom Rev*, 10, 335-357
- Karas** M., Krüger R. (2003), *Chem Rev*, 103, 427-439
- Karplus** P.A. (1997), *Protein Sci*, 6, 1302-1307
- Kashima** A., Inoue Y., Sugio S., Maeda I., Nose T., Shimohigashi Y. (1998), *Eur J Biochem*, 255, 12-23
- Kaufmann** R., Spengler B., Lutzenkirechen F. (1993), *Rapid Commun Mass Spec*, 7, 902-910
- Kawasaki** H., Suzuki K. (1990), *Anal Biochem*, 186, 264-268
- Khatun** J., Ramkissoon K., Giddings M.C. (2007), *Anal Chem*, 79, 3032-3040
- Kingdon** K.H. (1923), *Phys Rev*, 21, 408
- Kinohita** S., Udaka S., Shimono M. (1959), *J Gen Appl Microbiol*, 3, 193-205
- Klein** C., Garcia-Rizo C., Bisle B., Scheffer B., Zischka H., Pfeiffer F. *et al.* (2004), *Proteomics*, 5, 180-

197

- Klose J.**, (1975), *Humangenetik*, 26, 231-243
- Knight R.D.** (1981), *Appl Phys Lett*, 38, 221-223
- Körs M.**, Steinhart H. (1997), *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205, 224-226
- Koffas M.A.**, Jung G.Y., Stephanopoulos G. (2003), *Metab Eng*, 5, 32-41
- Kossiakoff A.A.**, Spencer S.A. (1981), *Biochemistry*, 20, 6462-6474
- Kragh-Hansen U.**, le Maire M., Noël J.P., Gulik-Krtywicki T., Møller J.V. (1993), *Biochemistry*, 32, 1648-1656
- Kragh-Hansen U.**, le Maire M., Møller J.V. (1998), *Biophys J.*, 75, 2932-2946
- Kraus E.**, Kiltz H.H., Femfert U. F. (1976), *Z Physiol Chem*, 357, 233-237
- Krause E.**, Wenschuh H., Jungblut P.R. (1999), *Anal Chem*, 71, 4160-4165
- Krijgsveld J.**, Gauci S., Dormeyer W., Heck A.J. (2006), *J Proteome Res*, 5, 1721-1730
- Krogh A.**, Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E.L. (2001), *J Mol Biol*, 305-567-580
- Krüger R.**, Pfenninger A., Fournier I., Glückmann M., Karas M. (2001), *Anal Chem*, 73, 5812-5821
- Kuhn K.**, Thompson A., Prinz T., Müller P., Baumann C., Schmidt G. *et al.* (2003), *J Proteome Res*, 2, 598-609
- Kurumbail R.G.**, Stevens A.M., Gierse J.K., McDonald J.J., Stegeman R.A., Pak Y.A. *et al.* (1996), *Nature*, 384, 644-648
- Kyte J.**, Doolittle R.F. (1982), *J Mol Biol*, 157, 105-132
- Laemmli U.K.** (1970), *Nature*, 227, 680-685
- Lam H.T.**, Jossierand J., Lion N., Girault H.H. (2007), *J Proteome Res*, 6, 1666-1676
- Laiko V.V.**, Balwin M.A., Burlingame A.L. (2000), *Anal Chem*, 72, 652-657
- Langen H.**, Takacs S., Evers S., Berndt P., Lahm H.W., Wipf B. *et al.* (2000), *Electrophoresis*, 21, 411-429
- Largman C.** (1983), *Biochemistry*, 22, 3763-3770
- Lasaosa M.**, Delmotte N., Huber C.G., Melchior K., Heinzle E., Tholey A. (2009), *Anal Bioanal Chem*, 393, 1245-1256
- Lasserre J.P.**, Beyne E., Pyndia S., Lapaillerie D., Claverol S., Bonneau M. (2006), *Electrophoresis*, 27, 3306-3321
- le Maire M.**, Deschamps S., Møller J.V., Le Caer J.P., Rossier J. (1993), *Anal Biochem*, 214, 50-57
- le Maire M.**, Champeil P., Møller J.V. (2000), *Biochim Biophys Acta*, 1508, 86-111
- Leath K.J.**, Johnson S., Roversi P., Hughes T.R., Smith R.A., Mackenzie L. *et al.* (2007), *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 63, 648-652
- Lechner J.**, Sumper M. (1987), *J Biol Chem*, 262, 9724-9729
- Lehner I.**, Niehof M., Borlak J. (2003), *Electrophoresis*, 24, 1795-1808
- Leuchtenberger W.** (1996), *Biotechnology*, 11, 187-193

- Leuchtenberger** W., Huthmacher K, Drauz K. (2005), *Appl Microbiol Biotech*, 69, 1-8
- Lin** Y., Fusek M., Lin X., Hartsuck J.A., Kézdy, F. J., Tang J. (1992), *J Biol Chem*, 267, 17257-17263
- Link** A.J., Eng J., Schieltz D.M., Carmack E., Mize G.J., Morris D.R. *et al.* (1999), *Nat Biotechnol*, 17, 676-682
- Liu** H., Sadygov R.G., Yates J.R. 3rd (2004), *Anal Chem*, 76, 4193-4201
- Loo** R.R., Dales N., Andrews P.C. (1994), *Protein Sci*, 3, 1975-1983
- Loo** R.R., Loo J.A. (2007), *Anal Chem*, 79, 1115-1125
- Lowry** O.H. (1951), *J Biol Chem*, 193, 265-275
- Luche** S., Santoni V., Rabilloud T. (2003) *Proteomics*, 3, 249-253
- Ly** H.V., Longo M.L. (2004), *Biophys J.*, 87, 1013-1033
- Macfarlane** R.D., Torgerson D.F. (1976), *Science*, 191, 920
- Macfarlane** D.E. (1989), *Anal Biochem*, 180, 457-463
- Macfarlane** R.D. (1999), *Brazilian J Phys*, 29, 415-421
- Mack** L.L., Kralik P., Rheude A., Dole M. (1970), *J Chem Phys*, 52, 4977-4985
- Makarov** A., (2000), *Anal Chem*, 72, 1156-1162
- Makarov** A., Denisov E., Lange O., Horning S. (2006), *J Am Soc Mass Spec*, 17, 977-982
- Makhatadze** G.I., Privalov P.L. (1992), *J Mol Biol*, 226, 491-505
- Mamyrin** B.A., Karataev, V.I., Shmikk D.V., Zagulin V.A. (1973), *Sov Phys JETP*, 37, 45
- Manadas** B., English J.A., Wynne K.J., Cotter D.R., Dunn M.J. (2009), *Proteomics*, Epub Sep 21 2009
- Mann** M., Højrup P., Roepstorff P. (1993), *Biol Mass Spectrom*, 22, 338-345
- Mao** D., Douglas D.J. (2003), *J Am Soc Mass Spectrom*, 14, 85-94
- Markley** J.L. (1979), *Magnetic Resonance Studies in Biology*, 397-461
- Martins-de-Souza** D., Menezes de Olivera B., dos Santos Farias A., Horiuchi R.S., Crepaldi Domingues C., de Paula E. *et al.* (2007), *Brief Funct Genomic Proteomic*, 6, 70-75
- Martosella** J., Zolotarjova N., Liu H., Moyer S.C., Perkins P.D., Boyes B.E. (2006), *J Proteome Res*, 5, 1301-1312
- Mastro** R., Hall M. (1999), *Anal Biochem*, 273, 313-315
- Matthews** B.W., Sigler P.B., Henderson R., Blow D.M. (1967), *Nature*, 214, 652-656
- McDonald** T., Sheng S., Stanley B., Chen D., Ko Y., Cole R.N. *et al.* (2006), *Mol Cell Proteomics*, 5, 2392-2411
- McGrath** M.E., Sprengeler P.A., Hirschbein B., Somoza J.R., Lehoux I., Janc J.W. *et al.* (2006), *Biochemistry*, 45, 5964-5973
- Medzihradzky** K.F., Campbell J.M., Baldwin M.A., Falick A.M., Juhasz P., Vestal M.L., Burlingame A.L. (2000), *Anal Chem*, 72, 552-558
- Michel** P.E., Reymond F., Arnaud I.L., Josserand J, Girault H.H., Rossier J.S. (2003), *Electrophoresis*, 24, 3-11

- Miliotis T.**, Kjellstrom S., Nilsson J., Laurell T., Edholm L.E., Marko-Varga G. (2000), *J Mass Spec*, 35, 369-377
- Mirgorodskaya E.**, Breuer C., Fucini P., Lehrach H., Gobom J. (2006), *Proteomics*, 5, 299-408
- Moebius J.**, Zahedi R.P., Lewandrowski U., Berger C., Walter U., Sickmann A. (2005) *Mol Cell Proteomics*, 4, 1754-1761
- Möglich A.**, Krieger F., Kiefhaber T. (2005), *J Mol Biol*, 345, 153-162
- Molloy M.P.**, Herbert B.R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A.S., Williams K.L., Gooley A.A. (2000), *Eur J Biochem*, 267 2871-2881
- Morciano M.**, Burré J., Corvey C., Karas M., Zimmermann H., Volkandt W. (2005), *J Neurochem*, 95, 1732-1745
- Moritz R.L.**, Simpson R.J. (2005), *Nat Methods*, 2, 863-873
- Morris H.R.**, Batley K.E., Harding N.C., Bjur R.A., Dann J.G., King R.W. (1974), *Biochem J.*, 137, 409-411
- Morris H.R.**, Panico M., Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A. (1981), *Biochem Biophys Res Commun*, 101, 623-631
- Mowry C.D.**, Johnston M.V. (1993), *Rapid Commun Mass Spectrom*, 7, 569-573
- Müller A.**, Hinrichs W., Wolf W.M., Saenger W. (1994), *J Biol Chem*, 269, 23108-23111
- Munson M.S.B.**, Field F.H., (1966), *J Am Chem Soc*, 88, 262-2630
- Murzin, A.G.**, Lesk, A.M., Chothia C. (1994a), *J Mol Biol*, 236, 1369-1381
- Murzin, A.G.**, Lesk, A.M., Chothia C. (1994b), *J Mol Biol*, 236, 1382-1400
- Naldrett M.J.**, Zeidler R., Wilson K.E., Kocourek A. (2005), *J Biomol Tech*, 16,423-428
- Nelson D.L.**, Cox M.M. (2001), *Lehninger Principles of Biochemistry 3rd Edn*, 125
- Neuhoff V.**, Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988), *Electrophoresis*, 9, 255-262
- Neurath H.** (1957), *Advances in Protein Biochemistry Vol. 12*, 319-386
- Norris J.L.**, Porter N.A., Caprioli R.M. (2003), *Anal Chem*, 75, 6642-6647
- O'Farrell P.H.** (1975). *J Biol Chem*, 250, 4007-4021
- Oesterheld D.**, Stockenius W. (1974), *Methods of Enzymology*, 31, 667-687
- Ohnishi J.**, Mitsuhashi S., Hayashi M., Ando S., Yokoi J., Ochai K., Ikeda M. (2002), *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 217-223
- Olsen J.V.**, Ong S.E., Mann M. (2004), *Mol Cell Proteomics*, 3, 608-614
- Olsen J.V.**, de Godoy L.M.F., Li G., Macek B., Mortensen P., Pesch R. et al. (2005), *Mol Cell Proteomics*, 4, 2010-2021
- Olsen J.V.**, Schwartz J.C., Griep-Raming J., Nielsen M.L., Damoc E., Denisov E. et al. (2009), *Mol Cell Proteomics*, Epub Oct 14 2009
- Ostrom R.S.**, Insel P.A. (2006), *Methods Mol Biol*, 332,181-191
- Ott C.M.**, Lingappa V.R. (2002), *J Cell Sci*, 115, 2003-2009
- Palagi P.M.**, Hernandez P., Walther D., Appel R.D. (2006), *Proteomics*, 6, 5435-5444

- Pappin** D.J., Højrup P., Bleasby A.J. (1993), *Curr Biol*, 3, 327-332
- Pascual** C., Lawson P.A., Farrow J.A., Gimenez M.N., Collins M.D. (1995), *Int Syst Bacteriol*, 45, 724-728
- Pasini** E.M., Kirkegaard M., Mortensen P., Lutz H.U., Thomas A.W., Mann M. (2006), *Blood*, 108, 791-801
- Patra** M., Salonen E., Terama E., Vattulainen I., Faller R., Lee B.W. *et al.* (2006), *Biophys J*, 90, 1121-1135
- Paul** W. (1990), *Angew Chem*, 102, 780-789
- Pedersen** S.K., Harry J.L., Sebastian L., Baker J., Traini M.D., McCarthy J.T. *et al.* (2003), *J Proteome Res*, 2, 303-311
- Peirce** M.J., Wait R., Begum S., Saklatvala J., Cope A.P. (2004), *Mol Cell Proteomics*, 3, 56-65
- Perona** J.J., Hedstrom L., Rutter W.J., Fletterick R.J. (1995), *Biochemistry*, 34, 1489-1499
- Perona** J.J., Craik C.S. (1995), *Protein Sci*, 4, 337-360
- Pinisetty** D., Moldovan D., Devireddy R. (2006), *Ann Biomed Eng*, 34, 1442-1451
- Piskiewicz** D., Landom M., Smith E.L. (1970), *Biochem Biophys Res Commun*, 40, 1173-1178
- Pitt-Rivers** R., Ambesi Impiombato, F.S. (1968), *Biochem J*, 109, 825
- Polgár** L., Bender M.L. (1969), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64, 1335-1342
- Polgár** L. (2004), *Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd Edn*, 1072-1079
- Prasad** L., Leduc Y., Hayakawa K., Delbaere L.T. (2006), *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 256-259
- Prinz** T., Müller J., Kuhn K., Schäfer J., Thompson A., Schwarz J., Hamon C. (2004), *J Proteome Res*, 3, 1073-1081
- Qin** J., Chait B.T. (1995), *J Am Chem Soc*, 117, 5411-5412
- Quach** T.T., Li N., Richards D.P., Zheng J., Keller B.O., Li L. (2003), *J Proteome Res*, 2, 543-552
- Quist** A.P., Huth-Fehre T., Sundquist B.U.R. (1994), *Rapid Commun Mass Spectrom*, 8, 149-154
- Rabilloud** T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J. (1997), *Electrophoresis*, 18, 307-316
- Rabilloud** T. (2009), *Electrophoresis*, Suppl1, S174-S180
- Rahbar** A.M., Fenselau C. (2005), *J Proteome Res*, 4, 2148-2153
- Rais** I., Karas M., Schägger H. (2004), *Proteomics*, 3, 2567-2571
- Rao** C., Dunn B.M. (1995), *Adv Exp Med Biol*, 362, 91-94
- Rawlings** N.D., Barrett A.J. (2004), *Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd Edn*, 3-12
- Rees** D.C., DeAntonio L., Eisenberg D. (1989), *Science*, 245, 510-513
- Reifschneider** N.H., Goto S., Nakamoto H., Takahashi R., Sugawa M., Dencher N.A., Krause F. (2006), *J Proteome Res*, 5, 1117-1132
- Reynolds** J.A., Tanford C. (1970), *J Biol Chem*, 245, 5161-5165
- Righetti** P.G., Castagna A., Antonioli P., Boschetti E. (2005), *Electrophoresis*, 26, 297-319

- Riley M.L., Wallace B.A., Flitsch S.L., Booth P.J. (1997), *Biochemistry*, 36, 192-196
- Robertus J.D., Kraut J., Alden R.A., Birkhoff J.J. (1972), *Biochemistry*, 11, 4293-4303
- Roepstorff P., Fohlmann J. (1984), *Biomed Mass Spec*, 11, 601
- Röllgen F.W., Bremmer-Weger E., Bütfering L. (1987), *J de Physique C6*, 11, 253-256
- Ros A., Faupel M., Mees H., Oostrum J., Ferrigno R., Reymond F. et al. (2002), *Proteomics*, 2, 151-156
- Russ, A.P., Lampel, S. (2005), *Drug Discov Today*, 10, 1607-1610
- Russell W.K., Park Z.Y., Russell D.H. (2001), *Anal Chem*, 73, 2682-2685
- Ruth M.C., Old, W.M., Emrick M.A., Meyer-Arendt K., Aveline-Wolf L.D., Pierce K.G. et al. (2006), *J Proteome Res*, 5, 709-719
- Santoni V., Rabilloud T, Doumas P., Rouquié D., Mansion M., Kieffer S. et al. (1999) *Electrophoresis*, 20, 705-711
- Schägger H., von Jagow G. (1991), *Anal Biochem*, 199, 223-231
- Schägger H., Cramer W.A., von Jagow G. (1994), *Anal Biochem*, 217, 220-230
- Schägger H., (2006) *Nat Protoc*, 1, 16-22
- Schaffer S., Weil B. Nguyen V.D., Dongmann G., Gunther K., Nickolaus M. et al. (2001), *Electrophoresis*, 22, 4404-4422
- Schechter I., Berger A. (1967), *Biochem Biophys Res Commun*, 27, 157-162
- Scheele G.A. (1975), *J Biol Chem*, 250, 5375-5385
- Schellenberger V., Turck C.W., Rutter W.J. (1994), *Biochemistry*, 33, 4251-4257
- Schindler J., Lewandrowski U, Sickmann A, Friauf E., Nothwang H.G. (2006), *Mol Cell Proteomics*, 5, 390-400
- Schirle M., Heurtier M.A., Küster B (2003), *Mol Cell Proteomics*, 2, 1297-1305
- Schirmer E.C., Florens L., Guan T., Yates J.R. 3rd, Gerace L. (2003), *Science*, 301, 1380-1380
- Schlosser A., Lehmann W.D. (2000), *J Mass Spectrom*, 35, 1382-1390
- Schlosser A., Bodem J., Bossemeyer D., Grummt I., Lehmann W.D. (2002), *Proteomics*, 2, 911-918
- Schluesener D., Fischer F., Kruij J., Rögner M., Poetsch A. (2005), *Proteomics*, 5, 1317-1330
- Schmelzer C.E.H., Schöps R, Reynell L., Ulbrich-Hofmann R., Neubert R.H., Raith K. (2007), *J Chromatogr A*, 1166, 108-115
- Schmidt A., Karas M., Dulcks T. (2003), *J Am Soc Mass Spectrom*, 14, 492-500
- Schmitt S., Prokisch H., Schlunck T., Camp D.G. 2nd, Ahting U., Waizenegger T. et al. (2006), *Proteomics*, 6, 72-80
- Schneider U. (2008), *Methods Mol Biol*, 424, 63-69
- Schwartz B.L., Bursley M.M. (1992), *Biol Mass Spectrom*, 21, 92
- Scigelova M., Makarov A. (2006), *Proteomics*, 6, 16-21
- Scorza F.B., Doro F., Rodriguez-Ortega M.J., Stella M., Liberatori S. et al., (2008), *Mol Cell Proteomics*, 7, 473-485

- Sebela M.**, Stosová T., Havlis J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006), *Proteomics*, 6, 2959-2963
- Second T.P.**, Blethrow J.D., Schwartz J.C., Merrihew G.E., MacCoss M.J., Swaney D.L. *et al.* (2009), *Anal Chem*, 81, 7757-7765
- Shevchenko A.**, Jensen O.N., Podtelejnikov A.V., Sagliocco F. Wilm M., Vorm O. *et al.* (1996), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14440-14445
- Shio I.**, KJ S. (1969), *Gen Appl Microbiol*, 15, 267
- Simões-Barbosa A.**, Santana J.M., Teixeira A.R. (2000), *Electrophoresis*, 21, 641-644
- Simon L.M.**, László K., Vértési A., Bagi K., Szajani B. (1998), *J Mol Cat B*, 4, 41-45
- Simon L.M.**, Kotormán M., Garab G., Laczkó I. (2001), *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 1367-1371
- Simpson R.J.**, Conolly L.M., Eddes J.S., Pareira J.J., Moritz R.L., Reid G.E. (2000), *Electrophoresis*, 21, 1707-1732
- Sørensen S.B.**, Sørensen T.L., Breddam K. (1991), *FEBS Lett*, 294, 195-197
- Speers A.E.**, Blackler A.R., Wu C.C. (2007), *Anal Chem*, 79, 4613-4620
- Speers A.E.**, Wu C.C. (2007), *Chem Rev*, 107, 3687-3714
- Spengler B.**, Kirsch D., Kaufmann R. (1991), *Rapid Commun Mass Spectrom*, 5, 198
- Spengler B.**, Kirsch D., Kaufmann R. (1992), *J Phys Chem*, 24, 9678-9683
- Spengler B.** (1997), *J Mass Spectrom*, 32, 1019-1036
- Spengler B.** (2004), *J Am Soc Mass Spectrom*, 15, 703-714
- Sprenger R.R.**, Fontijn R.D., von Marle J., Pannekoek H., Horrovoets A.J. (2006), *Biochem J*, 400, 401-410
- Spyropoulos I.C.**, Liakopolos T.D., Bagos P.G., Hamodrakas S.J. (2004), *Bioinformatics*, 20, 3258-3260
- Stemmer W.P.** (1994), *Nature*, 370, 389-391
- Stenberg F.**, Chovanec P., Maslen S.L., Robinson C.V., Ilag L.L., von Heijne G., Daley D.O. (2005), *J Biol Chem*, 280, 34409-34419
- Stennike H.R.**, Breddam K. (2004), *Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd Edn*, 1448-1451
- Stephens W.E.** (1946), *Phys Rev*, 69, 691
- Stigter E.C.**, de Jong G.C., van Bennekom W.P. (2008), *Anal Chim Acta*, 619, 231-238
- Stoop M.P.**, Lamers R.J., Burgers P.C., Sillevius Smitt P.A., Hintzen R.Q., Luider T.M. (2008), *J Proteome Res*, 7, 4841-4847
- Strupat K.**, Karas M., Hillenkamp F. (1991), *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 111, 89-96
- Strupat K.**, Damoc E., Kellmann M., Lange O., Denisov E., Makarov A. (2007), *Proceedings of the ASMS Conference 2007*, MPY 392
- Suckau D.**, Resemann A., Schürenberg M., Hufnagel P., Franzen J., Holle A. (2003), *Anal Bioanal Chem*, 376, 952-965
- Sweeney P.J.**, Walker J.M. (1993), *Methods Mol Biol*, 16, 305-311
- Syka J.E.**, Marto J.A., Bai D.L., Horning S., Senko M.W., Schwartz J.C. *et al.* (2004a), *J Proteome Res*, 3, 621-626

- Syka J.E.**, Coon J.J., Schroeder M.J., Shabanowitz J., Hunt D.F. (2004b), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9528-9533
- Tabb D.L.**, Smith L.L., Brechi L.A., Wysocki V.H., Lin D., Yates J.R. 3rd (2003), *Anal Chem*, 75, 1155-1163
- Tabb D.L.**, Huang Y., Wysocki V.H., Yates J.R. 3rd (2004), *Anal Chem*, 76, 1243-1248
- Tajkhorshid E.**, Baudry J., Schulten K., Suhai S. (2000), *Biophys J*, 78, 683-693
- Takahashi L.**, Radhakrishnan R., Rosenfeld R., Meyer E., Trainor D. (1989), *J Am Chem Soc*, 111, 3368-3374
- Tang J.** (1963), *Nature*, 199, 1094-1095
- Tang J.**, James M.N.G., Hsu I.N., Jenkins J.A., Blundell T.L. (1978), *Nature*, 271, 618-621
- Taranenko N.I.**, Tang K., Allman S.L., Cháng L.Y., Chen C.H. (1994), *Rapid Commun Mass Spectrom*, 6, 1001-1006
- Taylor G.** (1964), *Proc R Soc London Ser A*, 280, 383-397
- Thomson J.J.** (1897), *Phil Mag*, 44, 293
- Tobi D.**, Elber R., Thirumalai D. (2003), *Biopolymers*, 68, 359-369
- Tolmachev A.V.**, Udseth H.R., Smith R.D. (2000), *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14, 1907-1913
- Torres J.**, Stevens T.J., Samsó M. (2003), *Trends Biochem Sci*, 28, 137-144
- Tusnády G.E.**, Simon I. (2001), *Bioinformatics*, 17, 849-850
- Ujwal R.**, Cascio D., Colletier J.P., Faham S., Zhang J., Toro L. *et al.* (2008), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17742-17747
- Ulmschneider M.B.**, Sansom M.S., Di Nola A. (2005), *Proteins*, 59, 252-265
- Uwaje N.C.**, Mueller N.S., Maccarrone G., Turck C.W. (2007), *Electrophoresis*, 28, 1867-1876
- Vaisar T.**, Urban J. (1996), *J Mass Spectrom*, 31, 1185
- Vanrobaeys F.**, Van Coster R., Dhondt G., Devreese B., Van Beeumen J. (2005), *J Proteome Res*, 4, 2283-2293
- Vastola F.J.**, Mumma R.O., Pirone A.J. (1970), *Org Mass Spectrom*, 3, 101-104
- Venekei I.**, Gráf L., Rutter W.J. (1996), *FEBS Lett*, 379, 139-142
- Verentchikov A.N.**, Ens W., Standing K.G. (1994), *Anal Chem*, 66, 126-133
- Vissers J.P.**, Chervet J.P., Salzmann J.P. (1996), *J Mass Spectrom*, 31, 1021-1027
- Wallin E.**, von Heijne G. (1998), *Protein Sci*, 7, 1029-1038
- Wang W.**, Guo T., Rudnick P.A., Song T., Li J., Zhuang Z., Zheng W. *et al.* (2007), *Anal Chem*, 79, 1002-1009
- Washburn M.P.**, Wolters D., Yates J.R. 3rd (2001), *Nat Biotechnol*, 19, 242-247
- Washburn M.P.**, Ulaszek R.R., Yates J.R. 3rd (2003), *Anal Chem*, 75, 5054-5061
- Weber G.**, Islinger M., Weber P., Eckerskom C., Völkl A. (2004), *Electrophoresis*, 25, 1735-1747
- Welinder K.G.** (1988), *Anal Biochem*, 174, 54-64

- White S.H., Wimley W.C. (1999)**, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 28, 319-365
- Whitelegge J.P., Halgand F., Souda P., Zabrouskov V. (2006)**, *Exp Rev Proteomics*, 3, 585-596
- Wiley W.C., McLaren I.H. (1955)**, *Rev Sci Instr*, 26, 1150-1157
- Wilkins C.L., Weil D.A., Yang C.L., James C.F. (1985)**, *Anal Chem*, 57, 520-524
- Wilm M., Mann M. (1994)**, *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 136, 167-180
- Wilm M., Mann M. (1996)**, *Anal Chem*, 68, 1-8
- Wimley W.C. (2003)**, *Curr Opin Struct Biol*, 13, 404-411
- Witkop B. (1961)**, *Adv Protein Chem*, 16, 221-321
- Wittig I., Braun H.P., Schägger H. (2006)**, *Nat Protocols*, 1, 418-428
- Wittig I., Karas M., Schägger H. (2007)**, *Mol Cell Proteomics*, 6, 1215-1225
- Wolters D.A., Washburn M.P., Yates J.R. 3rd (2001)**, *Anal Chem*, 73, 5683-5690
- Wright P.A., Wilmouth R.C., Clifton I.J., Schofield C.J. (2001)**, *Eur J Biochem*, 268, 2969-2974
- Wu C.C., MacCoss M.J., Howell K.E., Yates J.R. 3rd (2003)**, *Nat Biotechnol*, 21, 532-538
- Wu C.C., MacCoss M.J., Mardones G., Finnigan C., Mogelsvang S., Yates J.R. 3rd, Howell K.E. (2004)**, *Mol Cell Proteomics*, 15, 2907-19
- Wysocki V.H., Tsaprailis G, Smith L.L., Breci L.A. (2000)**, *J Mass Spectrom*, 35, 1399-1406
- Wysocki V.H., Resing K.A., Zhang Q., Cheng G. (2005)**, *Methods*, 35, 211-222
- Yabuta M., Ochi N., Ohsuye K. (1995)**, *Appl Microbiol Biotechnol*, 44, 118-125
- Yamashita M., Fenn J.B. (1984)**, *J Phys Chem*, 4459-4465
- Yoshida N, Tsuruyama S., Nagata K., Hirayama K., Noda K., Makisumi S. (1988)**, *J Biochem*, 104, 451-456
- Yost R.A., Enke C.G. (1978)**, *J Am Chem Soc*, 100, 2274-2275
- Yost R.A., Enke C.G. (1979)**, *Anal Chem*, 51, 1251A-1262A
- Yu W., Vath J.E., Huberty M.C., Martin S.A. (1993)**, *Anal Chem*, 65, 3015-3023
- Yu Y.Q., Gilar M, Gebler J.C. (2004)**, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18, 711-715
- Yu Y.Q., Gilar M., Lee P.J., Bouvier E.S., Gebler J.C. (2003)**, *Anal Chem*, 75, 6023-6028
- Zabrouskov V., Whitelegge J.P. (2007)**, *J Proteome Res*, 6, 2205-2210
- Zahedi R.P., Sickmann A., Boehm A.M., Winkler C., Zufall N., Schönfish B. et al. (2006)**, *Mol Biol Cell*, 17, 1436-50
- Zhao Z., Zhang W., Stanley B.A., Assmann S.M. (2008)**, *Plant Cell*, 20, 3210-3226
- Zhang H.Y., Caprioli R.M. (1996)**, *J Mass Spec*, 31, 1039-1046
- Zhang N., Li N., Li L. (2004)**, *J Proteome Res*, 3, 719-727
- Zhang L., Xie J., Wang X., Liu X., Cao R., Hu W. et al. (2005)**, *Proteomics*, 5, 4510-4524
- Zhang N., Chen R., Young N., Wishart D., Winter P., Weiner J.H., Li L. (2007)**, *Proteomics*, 7, 484-493

Zhang H.M., Kazazic S., Schaub T.M., Tipton J.D., Emmett M.R., Marshall A.G. (2008), *Anal Chem*, 80, 9034-9041

Zhou C., Zheng Y., Zhou Y. (2004), *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2, 1-5

Zischka H., Gloeckner C.J., Klein C., Willmann S., Swiatek-de Lange M., Ueffing M. (2004), *Proteomics*, 4, 3776-3782

Zubarev R. H., Håkansson P., Sundqvist B. (1996), *Anal Chem*, 68, 4060-4063

Zubarev R.A., Kelleher N.L., McLafferty F.W. (1998), *J Am Chem Soc*, 120, 3265

Zubarev R., Mann M. (2007), *Mol Cell Proteomics*, 6, 377-381

Kapitel 9

ANHANG

9. Anhang

9.1 Proteintabellen

In den Tabellen dieses Abschnitts sind sämtliche identifizierten Proteine der nLC-MS/MS-Experimente aufgeführt, denen 2 oder mehr signifikante Peptide zugeordnet werden. Auf die Berücksichtigung von *One-hit Wonders* wird aus Platzgründen verzichtet. Neben den Proteinbeschreibungen enthalten die Tabellen auch die Zahl zugeordneter Peptide, die Anzahl vorhergesagter Transmembran-Helices, die *Accession*-Nummer der Datenbank und die Treffernummer bei der jeweiligen Datenbanksuche.

Tab. 9-1A: nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpormembranen, Trypsin, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	8	Q9HMW9	Dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	0
4	6	Q9HMW4	Oligopeptide binding protein	0
11	6	Q9HMX1	Dipeptide ABC transporter permease	8
7	6	Q9HMZ3	Heterodisulfide reductase	5
5	5	Q9HHN1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
8	5	Q9HN95	Cytochrome c oxidase subunit I	10
10	5	Q9HP76	Putative uncharacterized protein	2
15	5	Q9HPB1	Preprotein translocase subunit secY	10
6	5	Q9HSA8	Bifunctional short chain isoprenyl diphosphate synthase	1
20	4	P02945	Bacteriorhodopsin	7
9	4	Q9HMI3	Dipeptide ABC transporter ATP-binding	0
14	4	Q9HNQ9	Protein-export membrane protein	6
12	4	Q9HRR3	Putative uncharacterized protein	4
3	3	Q9HHP3	Vng6297c	0
30	3	Q9HHR4	Vng6268c	15
45	3	Q9HMU9	Nitrite/nitrate reduction protein	6
33	3	Q9HP89	Photolyase/cryptochrome	0
32	3	Q9HQP2	Transmembrane oligosaccharyl transferase	16
18	3	Q9HRF2	Putative uncharacterized protein	12
2	3	Q9HRQ9	Putative uncharacterized protein	1
27	3	Q9HRS0	Putative uncharacterized protein	0
16	3	Q9HS26	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
21	3	Q9HS72	Preprotein translocase subunit secE	1
23	3	Q9HSQ7	ABC transport protein	4
82	2	P16102	Halorhodopsin	7
46	2	P25964	Sensory rhodopsin-1	7
19	2	P33518	Cytochrome c oxidase polypeptide 1	13
64	2	P33741	Sensory rhodopsin I transducer	1
55	2	Q9HMK7	Glutaryl-CoA dehydrogenase	0
47	2	Q9HMX0	Dipeptide ABC transporter permease	6
13	2	Q9HN93	Halocyanin-like	3
22	2	Q9HN94	Cytochrome c oxidase subunit II	0
34	2	Q9HNE6	Brp-like homolog	6
63	2	Q9HNN6	Putative uncharacterized protein	7
61	2	Q9HPU7	Bacteriorhodopsin related protein	7
35	2	Q9HQ04	Putative uncharacterized protein	5

<i>Hit</i>	<i>Peptide</i>	<i>Accession</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>TMH</i>
56	2	Q9HR16	Proline permease	11
62	2	Q9HR80	Putative uncharacterized protein	5
31	2	Q9HR99	Halocyanin-like	0
76	2	Q9HRC5	Putative uncharacterized protein	2
25	2	Q9HRJ0	Putative uncharacterized protein	0
54	2	Q9HRL1	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	11
28	2	Q9HRL3	F420H2:quinone oxidoreductase chain L	17
17	2	Q9HRL4	NADH dehydrogenase/oxidoreductase-like protein	3
41	2	Q9HRL8	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	6
36	2	Q9HRM1	NADH dehydrogenase/oxidoreductase-like protein	3
29	2	Q9HRR1	Putative uncharacterized protein	0
38	2	Q9HRT0	Putative uncharacterized protein	16
40	2	Q9HS12	Phosphate ABC transporter permease	14
37	2	Q9HSC3	Putative protease La homolog type	1
39	2	Q9HSC9	N-methyltransferase homolog	0
26	2	Q9HSQ2	Probable protease htpX homolog	4

Tab. 9-1B: nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpirmembranen, Elastase, 30 ppm.

<i>Hit</i>	<i>Peptide</i>	<i>Accession</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>TMH</i>
1	120	P02945	Bacteriorhodopsin	6
2	72	P00772	Elastase-1	0
3	54	Q9HMW9	Dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	0
7	22	Q48302	Precursor proteolipid	2
5	22	Q9HN93	Halocyanin-like	3
4	22	Q9HR99	Halocyanin-like	0
6	20	Q9HMI3	Dipeptide ABC transporter ATP-binding	0
8	18	Q9HHN1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
10	15	Q9HM69	Cell surface glycoprotein	2
12	14	Q9HMG3	Putative uncharacterized protein	1
13	12	Q9HRQ9	Putative uncharacterized protein	1
16	12	Q9HSS1	Phosphoglycerate dehydrogenase	0
17	10	Q9HN95	Cytochrome c oxidase subunit I	10
15	10	Q9HRS0	Putative uncharacterized protein	0
14	10	Q9HSA8	Bifunctional short chain isoprenyl diphosphate synthase	1
22	7	Q9HND8	V-type ATP synthase subunit I	7
20	6	Q9HMF1	Aconitase	0
21	6	Q9HMT7	Probable thiosulfate sulfurtransferase	0
19	6	Q9HRL3	F420H2:quinone oxidoreductase chain L	17
24	6	Q9HRR0	Putative uncharacterized protein	2
32	5	Q9HMW4	Oligopeptide binding protein	0
18	5	Q9HN94	Cytochrome c oxidase subunit II	0
29	4	Q9HHP3	Vng6297c	0
36	4	Q9HM89	Elongation factor 1-alpha	0
49	4	Q9HMU9	Nitrite/nitrate reduction protein	6
41	4	Q9HNL7	Putative uncharacterized protein	0
26	4	Q9HRL1	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	11
25	4	Q9HSQ7	ABC transport protein	4
40	3	Q9HMB7	Probable carboxypeptidase	0
80	3	Q9HMK0	Putative uncharacterized protein	1
35	3	Q9HMX1	Dipeptide ABC transporter permease	8
27	3	Q9HNB9	Putative uncharacterized protein	0
31	3	Q9HQA6	Putative uncharacterized protein	1
33	3	Q9HQF4	Membrane protein	0
37	3	Q9HR04	Iron-binding protein	0
34	3	Q9HRL8	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	6

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
23	3	Q9HRR1	Putative uncharacterized protein	0
78	3	Q9HS12	Phosphate ABC transporter permease	14
48	2	Q9HM85	Elongation factor 2	0
39	2	Q9HMB6	Alcohol dehydrogenase	0
51	2	Q9HMH4	Putative uncharacterized protein	0
105	2	Q9HMQ2	Argininosuccinate synthase	0
58	2	Q9HMX0	Dipeptide ABC transporter permease	6
160	2	Q9HN22	Putative uncharacterized protein	2
266	2	Q9HN92	Putative uncharacterized protein	2
66	2	Q9HNY9	Quinolate phosphoribosyltransferase	0
119	2	Q9HP48	NADH oxidase	0
42	2	Q9HP76	Putative uncharacterized protein	2
64	2	Q9HP88	Phytoene dehydrogenase	0
47	2	Q9HPB1	Preprotein translocase subunit secY	10
28	2	Q9HQP2	Transmembrane oligosaccharyl transferase	16
618	2	Q9HQV6	Putative uncharacterized protein	3
45	2	Q9HRL9	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	0
141	2	Q9HRR3	Putative uncharacterized protein	4
38	2	Q9HSM4	NADP-specific glutamate dehydrogenase B	0
92	2	Q9HSQ2	Probable protease htpX homolog	4

Tab. 9-1C: nLC-MALDI-TOF/TOF, *Corynebacterium* DM1698-Membranen, Elastase, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	166	P00772	Elastase-1	0
2	72	Cg0446	(sdhA) succinate dehydrogenase A	0
3	61	Cg1537	(ptsG) GLUCOSE-SPECIFIC ENZYME II BC COMPONENT OF PTS	10
5	47	Cg2409	(ctaC) CYTOCHROME C OXIDASE CHAIN II	3
6	46	Cg0587	(tuf) ELONGATION FACTOR TU	0
4	46	Cg2705	(amyE) MALTOSE-BINDING PROTEIN PRECURSOR	0
7	26	Cg3138	Membrane protease subunit, stomatin/prohibitin homolog	2
10	22	Cg0447	(sdhB) succinate dehydrogenase B	0
8	22	Cg2911	ABC-type Mn/Zn transport system, secreted Mn/Zn-binding (lipo)protein	0
9	22	Cg3009	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
12	21	Cg2780	(ctaD) PROBABLE CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE SUBUNIT	12
15	19	Cg2403	(qcrB) CYTOCHROME B, MEMBRANE PROTEIN	9
13	18	Cg1656	(ndh) NADH DEHYDROGENASE	1
11	17	Cg0583	(fusA) ELONGATION FACTOR G	0
17	17	Cg2404	(qcrA1) RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN	3
16	17	Cg2843	(pstB) ABC-type phosphate transport system, ATPase component	0
14	14	Cg0957	(fas-IB) FATTY ACID SYNTHASE	0
18	13	Cg2708	(msiK1) ABC-type sugar transport system, ATPase component	0
21	12	Cg0791	(pyc) PYRUVATE CARBOXYLASE	0
19	12	Cg1787	(ppc) PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE	0
22	12	Cg2875	hypothetical protein predicted by Glimmer	0
27	11	Cg0445	(sdhCD) succinate dehydrogenase CD	5
20	11	Cg1368	(atpD) ATP SYNTHASE ALPHA SUBUNIT	0
28	10	Cg0924	ABC-type cobalamin/Fe3+-siderophores transport sys	0
23	10	Cg2181	ABC-type peptide transport system, secreted component	0
29	10	Cg2196	putative secreted or membrane protein	2
33	9	Cg0756	(cstA) PUTATIVE CARBON STARVATION PROTEIN A	16
38	9	Cg1366	(atpA) PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN	0
31	9	Cg1437	(ilvC) KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE	0
37	9	Cg1790	(pgk) PHOSPHOGLYCERATE KINASE	0
40	9	Cg2958	(butA) L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase	0
26	9	Cg3186	(cmt2) Trehalose corynomycolyl transferase	1

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
42	8	Cg1429	putative membrane protein	5
50	8	Cg1685	(tatX) Sec-independent protein secretion pathway component	1
45	8	Cg2211	putative membrane protein	2
51	8	Cg2444	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
32	8	Cg3227	(lldA) PUTATIVE L-LACTATE DEHYDROGENASE	0
34	7	Cg0766	(icd) ISOCITRATE DEHYDROGENASE	0
24	7	Cg1081	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	0
25	7	Cg1111	(eno) ENOLASE	0
36	7	Cg1290	(metE) Homocysteine methyltransferase	0
54	7	Cg1880	(thrS) THREONYL-TRNA SYNTHETASE	0
30	7	Cg2405	(qcrC) CYTOCHROME C1	2
55	6	Cg0647	(secY) preprotein translocase subunit SecY	10
47	6	Cg0953	Na ⁺ /proline, Na ⁺ /panthothenate symporter or related permease	13
44	6	Cg1001	(mscL) LARGE CONDUCTANCE MECHANOSENSITIVE CHANNEL	2
58	6	Cg1169	Na ⁺ -dependent transporters of the SNF family	13
46	6	Cg1737	(acn) ACONITASE	0
43	6	Cg1791	(gap) GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE	0
56	6	Cg2291	(pyk) PYRUVATE KINASE	0
41	6	Cg2499	(glyS) GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE--TRNA LIGASE)	0
39	6	Cg2523	(malQ) 4-ALPHA-GLUCANOTRANSFERASE	0
73	6	Cg2558	related to aldose 1-epimerase	0
57	6	Cg2840	(actA) BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE	0
53	6	Cg3079	(clpB) PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEASE (HEAT SHOCK PROTEIN)	0
62	6	Cg3365	(rmpC) putative ribitol transport membrane protein	13
49	5	Cg0737	ABC-type transport system, secreted lipoprotein component	0
70	5	Cg0935	conserved hypothetical protein	0
99	5	Cg1121	Permease of the major facilitator superfamily	7
76	5	Cg1363	(atpE) ATP SYNTHASE C CHAIN	2
65	5	Cg1556	conserved hypothetical protein	0
61	5	Cg1586	(argG) ARGININOSUCCINATE SYNTHASE	0
120	5	Cg2703	Sugar permease	6
59	5	Cg2845	(pstC) ABC-type phosphate transport system, permease component	6
60	5	Cg2949	putative secreted protein	0
94	5	Cg3008	(porA) PORIN	1
52	4	Cg0545	(pitA) PUTATIVE LOW-AFFINITY PHOSPHATE TRANSPORT PROTEIN	7
48	4	Cg0576	(rpoB) DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA CHAIN	0
81	4	Cg0834	Bacterial extracellular solute-binding protein, fa	0
240	4	Cg0952	PUTATIVE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN	2
85	4	Cg1203	Mg-chelatase subunit ChlI	0
92	4	Cg1362	(atpB) ATP SYNTHASE F0 SUBUNIT 6	6
64	4	Cg1579	putative secreted protein	0
117	4	Cg2096	putative membrane protein	3
66	4	Cg2137	(gluB) GLUTAMATE SECRETED BINDING PROTEIN	0
89	4	Cg2157	(terC) TELLURIUM RESISTANCE MEMBRANE PROTEIN	9
78	4	Cg2192	(mqo) MALATE:QUINONE OXIDOREDUCTASE OXIDOREDUCTASE	0
68	4	Cg2195	putative secreted or membrane protein	2
67	4	Cg2410	(ItsA) glutamine-dependent amidotransferase	0
98	4	Cg2466	(aceE) PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT	0
79	4	Cg2695	ABC-type transport system, ATPase component	0
75	4	Cg2704	ABC-type sugar transport system, permease component	6
35	4	Cg2743	(fas-IA) FATTY ACID SYNTHASE	0
74	4	Cg2799	(pknE) putative secreted protein	1
83	4	Cg2963	(clpC) PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEASE (HEAT SHOCK PROTEIN)	0
80	4	Cg3149	Aminotransferases class-I	0
104	4	Cg3219	(ldh) L-LACTATE DEHYDROGENASE	0
157	3	Cg0007	(gyrB) DNA GYRASE SUBUNIT B	0
100	3	Cg0238	L-GULONOLACTONE OXIDASE	0
84	3	Cg0414	(wzz) cell surface polysaccharide biosynthesis / Chain length determinant protein	2
151	3	Cg0472	conserved hypothetical protein	0
96	3	Cg0610	(rplE) 50S RIBOSOMAL PROTEIN L5	0
72	3	Cg0703	(guaA) PUTATIVE GMP SYNTHASE	0

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
91	3	Cg0896	membrane protein	7
353	3	Cg1164	(lytB) Penicillin tolerance protein	0
239	3	Cg1227	putative membrane protein	5
124	3	Cg1238	putative membrane protein	4
95	3	Cg1525	(polA) DNA POLYMERASE I	0
118	3	Cg1643	(gnd) 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE	0
86	3	Cg1813	(carB) PUTATIVE CARBAMOYL-PHOSPHATE SYNTHASE SUBUNIT	0
311	3	Cg1911	putative secreted protein	0
63	3	Cg2120	(ptsF) SUGAR SPECIFIC PTS SYSTEM, FRUCTOSE/MANNITOL-SPECIFIC TRANSPORT PROTEIN	9
102	3	Cg2166	(gpsI) POLYRIBONUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE / GUANOSINE PENTAPHOSPHATESYNTHETASE	0
475	3	Cg2325	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
127	3	Cg2406	(ctaE) CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 3	5
220	3	Cg2613	(mdh) MALATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN	0
77	3	Cg2900	(ddh) MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE	0
113	3	Cg3195	Flavin-containing monooxygenase (FMO)	0
303	3	Cg4005	putative secreted protein	0
351	2	Cg0040	PUTATIVE SECRETED PROTEIN	0
114	2	Cg0047	conserved hypothetical protein	1
284	2	Cg0153	(hde) PROBABLE ESTERASE/LIPASE PROTEIN	0
115	2	Cg0303	(leuA) 2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE	0
193	2	Cg0326	(nuoL) NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN 5	23
357	2	Cg0451	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN	2
278	2	Cg0508	iron/thiamine transport system, secreted component	0
243	2	Cg0559	(ispB) PUTATIVE OCTAPRENYL-DIPHOSPHATE SYNTHASE PROTEIN (0
69	2	Cg0577	(rpoC) DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA~ CHAIN	0
116	2	Cg0654	(rpsD) RIBOSOMAL PROTEIN S4	0
153	2	Cg0683	permease	9
441	2	Cg0936	(rpf1) RPF PROTEIN PRECURSOR	0
372	2	Cg1005	(moeA2) MOLYBDENUM COFACTOR BIOSYNTHESIS PROTEIN	0
360	2	Cg1128	similar to ribosomal protein S2	1
164	2	Cg1133	(glyA) Serine Hydroxymethyltransferase	0
246	2	Cg1229	ABC-type cobalt transport system, permease component CbiQ	4
71	2	Cg1280	(odhA) 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE	0
138	2	Cg1364	(atpF) ATP synthase B chain	1
236	2	Cg1365	(atpH) H+-ATPASE DELTA SUBUNIT	0
82	2	Cg1451	(serA) Phosphoglycerate Dehydrogenase	0
108	2	Cg1463	(gltS) PUTATIVE GLUTAMYL-TRNA SYNTHETASE	0
88	2	Cg1603	CONSERVED MEMBRANE PROTEIN	1
570	2	Cg1665	putative secreted protein	0
134	2	Cg1725	(mcmB) METHYLMALONYL-COA MUTASE LARGE SUBUNIT	0
349	2	Cg1829	(aroC) PUTATIVE CHORISMATE SYNTHASE	0
196	2	Cg1836	secreted solute-binding protein, aminodeoxychorismate lyase-like	1
756	2	Cg1874	putative membrane protein	4
977	2	Cg1904	putative membrane protein	6
416	2	Cg2052	putative secreted protein	0
122	2	Cg2333	(treZ) MALTO-OLIGOSYLTREHALOSE TREHALOHYDROLASE	0
232	2	Cg2437	(thrC) THREONINE SYNTHASE	0
218	2	Cg2470	SECRETED ABC TRANSPORTER SUBSTRATE-BINDING PROTEIN	0
110	2	Cg2492	(glmS) PROBABLE GLUCOSAMINE-FRUCTOSE-6-PHOSPHATE AMINOTRANSFERASE	0
105	2	Cg2496	putative secreted protein	0
155	2	Cg2571	(lepA) Membrane GTPase LepA	0
137	2	Cg2678	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems	0
269	2	Cg2846	(pstS) ABC-type phosphate transport system, secreted component	0
181	2	Cg2925	(ptsS) ENZYME II SUCROSE PROTEIN	10
121	2	Cg3100	(dnaK) Heat shock protein hsp70	0
123	2	Cg3154	(udgA2) UDP-GLUCOSE 6-DEHYDROGENASE	0
156	2	Cg3237	(sod) MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE	0
228	2	Cg3244	conserved hypothetical protein	0
857	2	Cg3257	conserved hypothetical protein	0

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
244	2	Cg3323	Myo-inositol-1-phosphate synthase	0
674	2	Cg3343	putative secreted membrane protein	2

Tab. 9-1D: nLC-ESI-LIT-Orbitrap, Purpirmembranen, Elastase, 5 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	295	P02945	Bacteriorhodopsin	7
2	214	P00772	Elastase-1	0
3	83	Q9HM69	Cell surface glycoprotein	2
4	45	Q9HMI3	Dipeptide ABC transporter ATP-binding	0
5	38	Q9HQA6	Putative uncharacterized protein	1
6	38	Q9HMW9	Dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	0
7	33	Q9HRU5	Immunogenic protein	0
11	26	Q9HR99	Halocyanin-like	0
10	24	Q9HNI7	Possible phosphate binding protein	0
12	24	P16102	Halorhodopsin	7
9	23	Q9HR20	Putative uncharacterized protein	0
14	19	Q9HHN1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
16	16	Q48302	Precursor proteolipid	2
17	16	Q9HSA8	Bifunctional short chain isoprenyl diphosphate synthase	1
13	15	Q9HS51	Putative uncharacterized protein	0
15	14	Q9HMW4	Oligopeptide binding protein	0
18	14	Q9HRL3	F420H2:quinone oxidoreductase chain L	17
19	13	Q9HPQ5	Htr8 transducer	5
22	11	Q9HRL1	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	11
21	10	Q9HN95	Cytochrome c oxidase subunit I	10
24	9	Q9HMH4	Putative uncharacterized protein	0
25	9	O54610	CydA	9
26	8	Q9HNV1	Putative uncharacterized protein	2
29	8	Q9HHR4	Vng6268c	15
30	8	Q9HMU9	Nitrite/nitrate reduction protein	6
34	8	Q9HN94	Cytochrome c oxidase subunit II	0
23	7	Q9HPP1	Preprotein translocase subunit secY	10
28	7	Q9HS10	Phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-binding	0
33	7	Q9HML5	Phosphate ABC transporter binding	0
40	7	Q9HQP4	Membrane protein	0
20	6	P33741	Sensory rhodopsin I transducer	1
31	6	Q9HR04	Iron-binding protein	0
48	6	P57684	Potassium-transporting ATPase A chain	10
51	6	O54596	CydB	9
35	5	Q9HRR2	Cytochrome b6	5
44	5	P33518	Cytochrome c oxidase polypeptide 1	13
52	5	Q9HN25	Putative uncharacterized protein	0
53	5	P25964	Sensory rhodopsin-1	7
57	5	Q9HRR1	Putative uncharacterized protein	0
65	5	Q9HRR3	Putative uncharacterized protein	4
83	5	Q9HME2	Putative uncharacterized protein	1
88	5	Q9HRQ9	Putative uncharacterized protein	1
93	5	Q9HN93	Halocyanin-like	3
27	4	Q9HRL2	F420H2:quinone oxidoreductase chain M	15
36	4	Q9HND8	V-type ATP synthase subunit I	7
43	4	Q9HS47	Putative uncharacterized protein	7
46	4	Q9HHP3	Vng6297c	0
62	4	O54523	Putative uncharacterized protein	11
76	4	Q9HRS9	Putative uncharacterized protein	12
77	4	Q9HNB9	Putative uncharacterized protein	0

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
118	4	Q9HHE7	Vng6441h	1
128	4	Q9HRF2	Putative uncharacterized protein	12
248	4	Q9HQ64	Membrane anchor	3
32	3	Q9HRT0	Putative uncharacterized protein	16
38	3	Q9HMY1	Sensor protein	0
39	3	Q9HHI2	L-lactate permease	14
47	3	Q9HRL8	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	6
50	3	Q9HN37	Protein export	14
60	3	Q9HR23	Ribose ABC transporter permease	9
67	3	Q9HQY4	Flagella accessory protein J	9
82	3	P82857	Cytochrome-like protein	0
84	3	Q9HNY2	Putative uncharacterized protein	12
89	3	Q9HNN6	Putative uncharacterized protein	7
91	3	Q9HMS7	DNA damage-inducible protein	12
95	3	Q9HMW2	Oligopeptide transport permease protein	8
121	3	O54662	Putative uncharacterized protein	9
123	3	Q9HS59	Putative uncharacterized protein	6
127	3	Q9HP49	Putative uncharacterized protein	0
145	3	Q9HQA7	Putative uncharacterized protein	6
153	3	Q9HMT5	Putative uncharacterized protein	0
155	3	Q9HI34	Vng6345h	0
157	3	Q9HSC3	Putative protease La homolog type	1
212	3	Q9HP06	Cation efflux system protein	5
224	3	Q9HRR0	Putative uncharacterized protein	2
303	3	O51978	Putative uncharacterized protein	4
312	3	Q9HRL4	NADH dehydrogenase/oxidoreductase-like protein	3
445	3	Q9HML1	Putative uncharacterized protein	0
8	2	Q9HH34	Rhodopsin	7
41	2	Q9HRU7	Putative uncharacterized protein	24
42	2	Q9HS86	Htr14 transducer	1
55	2	O52005	Putative uncharacterized protein	10
56	2	Q9HS26	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
58	2	Q9HN17	4-hydroxybutyrate CoA transferase	0
64	2	Q9HML7	Phosphate ABC transporter permease	12
69	2	Q9HP66	Putative uncharacterized protein	8
75	2	Q9HPT7	Putative uncharacterized protein	11
85	2	Q9HNR2	Putative uncharacterized protein	13
87	2	Q9HNF6	Putative uncharacterized protein	13
97	2	Q9HNB6	Putative uncharacterized protein	6
98	2	Q9HN36	Protein export	6
103	2	Q9HNQ2	Probable translation initiation factor IF-2	0
104	2	Q9HNQ5	Putative uncharacterized protein	11
105	2	Q9HSW6	Cell division control protein 6 homolog 1	0
111	2	Q9HQT5	Htr13 transducer	0
122	2	Q9HRN3	Proteinase IV homolog	1
124	2	Q9HMG7	Ferrichrome ABC transporter permease	9
135	2	Q9HP32	CTP synthase	0
137	2	Q9HNS6	Putative uncharacterized protein	8
139	2	Q9HSQ7	ABC transport protein	4
147	2	Q9HS33	Multidrug resistance protein homolog	11
152	2	Q9HSB1	Dolichol-P-glucose synthetase	6
172	2	Q9HPX5	Htr-like protein	7
174	2	Q9HNT7	Subtilisin homolog	0
187	2	Q9HPF9	Putative uncharacterized protein	1
199	2	O73955	Peroxidase/catalase	0
205	2	P71411	Sensory rhodopsin-2	7
209	2	Q9HRJ3	Putative uncharacterized protein	5
225	2	Q9HQ63	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor subunit	3
226	2	Q9HQN5	Glycine betaine transporter	12
232	2	Q9HQQ5	Probable transport protein	11
239	2	Q9HRT5	Putative uncharacterized protein	5

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
246	2	Q9HM75	Cytochrome oxidase subunit I homolog	6
251	2	Q9HRW7	Putative uncharacterized protein	1
254	2	Q9HN92	Putative uncharacterized protein	2
263	2	Q9HM70	Putative uncharacterized protein	2
270	2	Q9HSF1	Putative uncharacterized protein	1
271	2	Q9HMM6	Probable cysteine desulfurase	0
272	2	Q9HRJ8	Heme synthase	12
293	2	Q9HQP1	Putative uncharacterized protein	8
304	2	Q9HSG5	Probable tRNA pseudouridine synthase D	0
306	2	Q9HP92	GTP-binding protein homolog	0
309	2	Q9HRC9	Putative uncharacterized protein	3
311	2	Q9HPU7	Bacteriorhodopsin related protein	7
327	2	Q9HQV9	Putative uncharacterized protein	0
328	2	Q9HR50	Putative uncharacterized protein	1
329	2	Q9HMZ1	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	0
337	2	Q9HMD8	Putative uncharacterized protein	5
349	2	Q9HRZ5	Pyruvate ferredoxin oxidoreductase, subunit alpha	0
385	2	Q9HQ25	Putative uncharacterized protein	4
388	2	Q9HQF0	Acyl-CoA dehydrogenase	0
393	2	Q9HRB8	Putative uncharacterized protein	2
398	2	Q9HNG3	Putative uncharacterized protein	0
399	2	Q9HS00	Putative uncharacterized protein	12
403	2	Q9HMW6	Putative uncharacterized protein	2
415	2	Q9HSY7	Putative uncharacterized protein	0
417	2	Q9HQU0	Putative uncharacterized protein	4
425	2	P05971	50S ribosomal protein L15P	0
440	2	Q9HRW2	Putative uncharacterized protein	2
451	2	Q9HQV6	Putative uncharacterized protein	3
487	2	Q9HQ91	Putative uncharacterized protein	5
518	2	Q9HMW1	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding	0
558	2	Q9HRR5	Putative uncharacterized protein	2
585	2	Q9HRB9	Phosphate regulatory protein homolog	0
604	2	Q9HHP9	Vng6290h	1
628	2	Q9HHJ7	Cell division control protein 6 homolog 6	0
670	2	Q9HQV2	Putative uncharacterized protein	1
739	2	Q9HPZ6	UPF0179 protein VNG1401C	0
859	2	Q9HPK2	UPF0100 protein VNG1595C	0

Tab. 9-1E: nLC-ESI-LIT-Orbitrap, *Corynebacterium* DM1698-Membranen, Elastase, 5 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	144	Cg1537	(ptsG) GLUCOSE-SPECIFIC ENZYME II BC COMPONENT OF PTS	10
2	97	P00772	Elastase-1	0
3	74	Cg0446	(sdhA) succinate dehydrogenase A	0
4	71	Cg2705	(amyE) MALTOSE-BINDING PROTEIN PRECURSOR	0
5	65	Cg3009	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
6	62	Cg2181	ABC-type peptide transport system, secreted component	0
7	47	Cg2120	(ptsF) SUGAR SPECIFIC PTS SYSTEM, FRUCTOSE/MANNITOL-SPECIFIC TRANSPORT PROTEIN	9
8	44	Cg2911	ABC-type Mn/Zn transport system, secreted Mn/Zn-binding (lipo)protein (surface adhesin)	0
11	41	Cg0447	(sdhB) succinate dehydrogenase B	0
10	39	Cg2409	(ctaC) CYTOCHROME C OXIDASE CHAIN II	3
9	39	Cg2925	(ptsS) ENZYME II SUCROSE PROTEIN	10
16	30	Cg2404	(qcrA1) RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN	3
14	29	Cg1366	(atpA) PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN	0
13	28	Cg3138	Membrane protease subunit, stomatin/prohibitin homolog	2

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
19	27	Cg2403	(qcrB) CYTOCHROME B, MEMBRANE PROTEIN	9
15	27	Cg2780	(ctaD) PROBABLE CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE SUBUNIT	12
12	26	Cg2708	(msiK1) ABC-type sugar transport system, ATPase component	0
17	25	Cg2875	hypothetical protein predicted by Glimmer	0
21	23	Cg1332	PUTATIVE SECRETED HYDROLASE	0
27	22	Cg0413	(cmt1) Trehalose corynomycolyl transferase	0
23	22	Cg1363	(atpE) ATP SYNTHASE C CHAIN	2
18	22	Cg3182	(cop1) Trehalose corynomycolyl transferase	1
24	19	Cg0683	permease	9
30	18	Cg0737	ABC-type transport system, secreted lipoprotein component	0
20	18	Cg0953	Na ⁺ /proline, Na ⁺ /panthothenate symporter or related permease	13
31	17	Cg1368	(atpD) ATP SYNTHASE ALPHA SUBUNIT	0
22	16	Cg1656	(ndh) NADH DEHYDROGENASE	1
38	16	Cg3008	(porA) PORIN	1
25	15	Cg1603	CONSERVED MEMBRANE PROTEIN	1
26	15	Cg3186	(cmt2) Trehalose corynomycolyl transferase	1
28	15	Cg3365	(rmpC) putative ribitol transport membrane protein	13
39	14	Cg0834	Bacterial extracellular solute-binding protein, fa	0
35	14	Cg1314	(putP) PROLINE TRANSPORT SYSTEM	13
29	13	Cg1081	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	0
78	13	Cg1362	(atpB) ATP SYNTHASE F0 SUBUNIT 6	6
44	13	Cg1556	conserved hypothetical protein	0
64	12	Cg0359	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN	2
37	12	Cg0756	(cstA) PUTATIVE CARBON STARVATION PROTEIN A	16
34	12	Cg0924	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport sys	0
41	12	Cg1082	putative membrane protein	6
33	12	Cg2843	(pstB) ABC-type phosphate transport system, ATPase component	0
52	11	Cg2262	(ftsY) Signal recognition particle GTPase	1
61	11	Cg2361	Cell division initiation protein - Antigen 84 homolog	0
85	10	Cg0445	(sdhCD) succinate dehydrogenase CD	5
43	10	Cg2195	putative secreted or membrane protein	2
36	10	Cg2810	Na ⁺ /H ⁺ -dicarboxylate symporter family	10
54	10	Cg2912	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport system, ATPase component	0
53	10	Cg3368	ABC-transporter permease protein	12
68	9	Cg0753	secreted protein	0
123	9	Cg1238	putative membrane protein	4
70	9	Cg2211	putative membrane protein	2
63	9	Cg2704	ABC-type sugar transport system, permease component	6
42	9	Cg2845	(pstC) ABC-type phosphate transport system, permease component	6
47	8	Cg0587	(tuf) ELONGATION FACTOR TU	0
59	8	Cg1001	(mscL) LARGE CONDUCTANCE MECHANOSENSITIVE CHANNEL	2
58	8	Cg1169	Na ⁺ -dependent transporters of the SNF family	13
45	8	Cg1228	ABC-type cobalt transport system, ATPase component	0
55	8	Cg1791	(gap) GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE	0
101	8	Cg2157	(terC) TELLURIUM RESISTANCE MEMBRANE PROTEIN	9
48	8	Cg2184	ATPase component of peptide ABC-type transport system, contains duplicated ATPase domains	0
79	8	Cg2405	(qcrC) CYTOCHROME C1	2
56	8	Cg2844	(pstA) ABC-type phosphate transport system, permease component	6
49	8	Cg3395	(proP) PROLINE/ECTOINE CARRIER	11
152	7	Cg1312	putative membrane protein	4
88	7	Cg1429	putative membrane protein	5
100	7	Cg2052	putative secreted protein	0
137	7	Cg2949	putative secreted protein	0
257	7	Cg3244	conserved hypothetical protein	0
109	6	Cg0040	PUTATIVE SECRETED PROTEIN	0
235	6	Cg0047	conserved hypothetical protein	1
73	6	Cg0545	(pitA) PUTATIVE LOW-AFFINITY PHOSPHATE TRANSPORT PROTEIN	7
51	6	Cg0780	membrane protein ribonuclease BN-like family	6
46	6	Cg1345	(narK) PUTATIVE NITRATE/NITRITE TRANSPORTER	12
81	6	Cg1624	NhaP-type Na ⁺ /H ⁺ and K ⁺ /H ⁺ antiporter	11

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
67	6	Cg2137	(gluB) GLUTAMATE SECRETED BINDING PROTEIN	0
153	6	Cg2196	putative secreted or membrane protein	2
265	6	Cg2406	(ctaE) CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 3	5
146	6	Cg2684	membrane protein DedA family	4
62	6	Cg2703	Sugar permease	6
106	6	Cg3255	(uspA3) UNIVERSAL STRESS PROTEIN FAMILY	0
98	5	Cg0229	(gitB) GLUTAMINE 2-OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE LARGE SU	0
191	5	Cg0314	(brnF) branched chain amino acid exporter, large subunit	4
217	5	Cg0561	(secE) SecE subunit of protein translocation complex	1
71	5	Cg0944	Xanthine/uracil permeases family	11
209	5	Cg1364	(atpF) ATP synthase B chain	1
104	5	Cg1367	(atpG) ATP SYNTHASE GAMMA SUBUNIT	0
132	5	Cg1579	putative secreted protein	0
86	5	Cg1604	putative secreted protein	1
127	5	Cg1661	Arsenite efflux pump ACR3 or related permease	10
491	5	Cg2151	Similar to phage shock protein A	0
348	5	Cg2424	putative membrane protein	2
110	5	Cg2425	Predicted permease	9
260	5	Cg2735	putative membrane protein	1
192	5	Cg2812	ABC-type transport system, involved in lipoprotein release, ATPase component	0
208	5	Cg2893	Permease of the major facilitator superfamily	14
164	5	Cg2958	(butA) L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase	0
575	5	Cg3237	(sod) MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE	0
298	4	Cg0061	(rodA) PUTATIVE FTSW/RODA/SPOVE FAMILY CELL CYCLE PROTEIN	12
161	4	Cg0286	CONSERVED HYPOTHETICAL membrane PROTEIN	6
169	4	Cg0324	(mnhD) hydrogenlyase subunit 3/Multisubunit Na ⁺ /H ⁺ antiporter, MnhD subunit	14
76	4	Cg0326	(nuoL) NADH-QUINONE OXIDOREDUCTASE CHAIN 5	23
148	4	Cg0336	(ponA) PENICILLIN-BINDING PROTEIN 1B	1
131	4	Cg0414	(wzz) cell surface polysaccharide biosynthesis / Chain length determinant protein	2
84	4	Cg0456	permease, major facilitator superfamily	14
105	4	Cg0583	(fusA) ELONGATION FACTOR G	0
65	4	Cg0647	(secY) preprotein translocase subunit SecY	10
202	4	Cg0736	ABC-type transporter, ATPase component	0
588	4	Cg0935	conserved hypothetical protein	0
508	4	Cg0952	PUTATIVE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN	2
313	4	Cg0980	secreted protein related to metalloendopeptidases	1
620	4	Cg0982	membrane protein	10
557	4	Cg1109	(porB) Anion-specific porin precursor	0
410	4	Cg1229	ABC-type cobalt transport system, permease component CbiQ	4
220	4	Cg1247	putative secreted protein	0
165	4	Cg1658	Permease of the major facilitator superfamily	11
113	4	Cg1730	secreted protease subunit, stomatin/prohibitin homolog	1
252	4	Cg1867	(secD) Preprotein translocase subunit SecD	6
457	4	Cg2154	(pgsA2) CDP-DIACYLGLYCEROL--GLYCEROL-3-PHOSPHATE 3-PHOSPHATIDYLTRANSFERASE	4
716	4	Cg2325	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
592	4	Cg2362	putative membrane protein	2
119	4	Cg2546	putative membrane protein	11
154	4	Cg2568	(dctM) PUTATIVE C4-DICARBOXYLATE TRANSPORT SYSTEM (PERMEASE LARGE PROTEIN)	11
112	4	Cg2677	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, permease component	6
40	4	Cg2743	(fas-IA) FATTY ACID SYNTHASE	0
340	4	Cg2799	(pknE) putative secreted protein	1
151	4	Cg2846	(pstS) ABC-type phosphate transport system, secreted component	0
542	4	Cg2913	ABC-type Mn ²⁺ /Zn ²⁺ transport system, permease component	9
57	4	Cg2984	(ftsH) CELL-DIVISION PROTEIN (ATP-DEPENDENT ZN METALLOPEPTIDASE)	2
72	4	Cg3024	(mrpA) NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 (chain L)/Multisubunit Na ⁺ /H ⁺ antiporter, A subunit	24
158	4	Cg3060	(cgtS6) probable two component sensor kinase	4
195	4	Cg3301	Permease of the major facilitator superfamily	12
91	4	Cg3356	Na ⁺ /H ⁺ -dicarboxylate symporter	10
914	3	Cg0016	PUTATIVE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN	2

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
469	3	Cg0018	HYPOTHETICAL MEMBRANE PROTEIN	10
182	3	Cg0082	Voltage gated chloride channel	11
210	3	Cg0165	ABC-2 type transporter	10
87	3	Cg0284	drug exporter of the RND superfamily	12
438	3	Cg0327	membrane protein	6
180	3	Cg0417	(capD) PROBABLE DTDP-GLUCOSE 4,6-DEHYDRATASE TRANSMEMBRANE PROTEIN	5
355	3	Cg0470	conserved secreted protein	2
117	3	Cg0486	PUTATIVE ABC TRANSPORTER INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN	10
228	3	Cg0489	hypothetical membrane protein	3
207	3	Cg0508	iron/thiamine transport system, secreted component	0
876	3	Cg0514	hypothetical membrane protein	4
347	3	Cg0568	Permease for amino acids and related compounds, fa	11
77	3	Cg0577	(rpoC) DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA~ CHAIN	0
128	3	Cg0732	PUTATIVE ABC TRANSPORT SYSTEM INTEGRAL MEMBRANE PR	10
500	3	Cg0735	ABC transporter, transmembrane component	5
261	3	Cg0752	PUTATIVE secreted or MEMBRANE PROTEIN	1
533	3	Cg0769	ABC-type cobalamin/Fe3+-siderophores transport system, permease component	9
273	3	Cg0831	SUGAR ABC TRANSPORTER, PERMEASE PROTEIN	6
752	3	Cg0914	(ftsE) CELL DIVISION ATP-BINDING PROTEIN	0
1068	3	Cg0923	membrane protein	5
144	3	Cg1111	(eno) ENOLASE	0
272	3	Cg1225	(benK3) putative benzoate transport transmembrane protein	12
168	3	Cg1227	putative membrane protein	5
173	3	Cg1231	(chaA) Ca2+/H+ antiporter	10
513	3	Cg1350	(mob) PUTATIVE MOLYBDOPTERIN-GUANINE DINUCLEOTIDE BIOSYNTHESIS PROTEIN	0
141	3	Cg1359	membrane protein, UDP-N-acetylmuramyl pentapeptide phosphotransferase/UDP-N-acetylglucosamine-1-pho	11
910	3	Cg1387	(fixB) PUTATIVE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN, ALPHA SUBUNIT	0
364	3	Cg1479	(glgP1) PUTATIVE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE	0
371	3	Cg1483	putative membrane protein	7
120	3	Cg1664	Sulfate permease or related transporter (MFS superfamily)	11
398	3	Cg1665	putative secreted protein	0
754	3	Cg1685	(tatX) Sec-independent protein secretion pathway component	1
1122	3	Cg1741	putative membrane protein	2
241	3	Cg1864	(dciAE) ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, secreted component	0
225	3	Cg1883	putative secreted protein	0
901	3	Cg2096	putative membrane protein	3
421	3	Cg2166	(gpsI) PUTATIVE POLYRIBONUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE / GUANOSINE PENTAPHOSPHATESYNTHEASE	0
246	3	Cg2173	(dinF) PUTATIVE DNA-DAMAGE-INDUCIBLE MEMBRANE PROTEIN	12
243	3	Cg2183	ABC-type peptide transport system, permease component	6
357	3	Cg2370	(ftsW) Bacterial cell division membrane protein	8
186	3	Cg2393	putative membrane protein	18
259	3	Cg2408	putative membrane protein	3
507	3	Cg2412	putative membrane protein	2
99	3	Cg2496	putative secreted protein	0
240	3	Cg2539	(ectP) ectoine/proline/glycine betaine carrier EctP	12
248	3	Cg2563	(lcoP) ECTOINE BETAINE TRANSPORTER	12
92	3	Cg2590	Xanthine/uracil permease	12
194	3	Cg2675	ATPase component of ABC-type transport system, contains duplicated ATPase domains	0
179	3	Cg2739	Permease of the major facilitator superfamily	14
437	3	Cg2777	putative membrane protein	4
266	3	Cg2884	Dipeptide/tripeptide permease	13
107	3	Cg3019	putative secreted protein	2
134	3	Cg3026	(mrpD) NADH-ubiquinone oxidoreductase/Multisubunit Na+/H+ antiporter, D subunit	14
358	3	Cg3068	(fda) fructose-bisphosphate aldolase	0
115	3	Cg3161	putative membrane protein	12
66	3	Cg3187	putative membrane protein	10
452	3	Cg3227	(lldA) PUTATIVE L-LACTATE DEHYDROGENASE	0
203	3	Cg3335	(mez) MALIC ENZYME	0

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1275	3	Cg3366	(rmpA) putative ribitol-specific enzyme II of PTS system	0
305	3	Cg3367	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	0
264	3	Cg3371	Na ⁺ -dependent transporter	9
395	3	Cg3413	(azlC) branched-chain amino acid permease (azaleucine resistance)	4
647	2	Cg0004	(dnaN) DNA POLYMERASE III, BETA SUBUNIT	0
310	2	Cg0057	(pknB) EUKARYOTIC-TYPE SERINE/THREONINE KINASE	0
761	2	Cg0064	conserved hypothetical protein	0
439	2	Cg0088	(citP) Citrate transporter	10
1047	2	Cg0092	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN	1
857	2	Cg0124	(amn) AMP NUCLEOSIDASE	0
82	2	Cg0133	p-aminobenzoyl-glutamate transporter	13
160	2	Cg0161	putative secreted or membrane protein	2
162	2	Cg0206	PROBABLE TRANSPORTER	14
887	2	Cg0216	hypothetical membrane protein	4
143	2	Cg0235	(embC) Probable arabinosyltransferase, membrane protein	14
150	2	Cg0236	membrane protein	13
187	2	Cg0238	L-GULONOLACTONE OXIDASE	0
536	2	Cg0249	polysaccharide/polyol phosphate export systems, permease component	6
539	2	Cg0262	(modB) sulfate/molybdate transport system, permease component	6
94	2	Cg0275	(mgtE2) MG2 ⁺ TRANSPORTER	4
341	2	Cg0331	(cgtS1) PROBABLE TWO-COMPONENT SENSOR HISTIDINE KINASE	2
600	2	Cg0334	secreted phosphohydrolase	1
1341	2	Cg0355	pyrophosphohydrolase	0
727	2	Cg0362	PUTATIVE SEPTUM SITE DETERMINING PROTEIN	0
1042	2	Cg0389	short chain dehydrogenase	0
541	2	Cg0390	permease, major facilitator family	12
423	2	Cg0396	Glycosyl transferase	1
884	2	Cg0448	conserved hypothetical membrane protein	2
80	2	Cg0455	permease, major facilitator superfamily	14
135	2	Cg0468	cobalamin/Fe3 ⁺ -siderophores transport systems, permease component	8
432	2	Cg0469	cobalamin/Fe3 ⁺ -siderophores transport system, ATPase component	0
743	2	Cg0475	conserved hypothetical protein	0
482	2	Cg0480	(fadD5) LONG-CHAIN-FATTY-ACID-COA LIGASE	0
1662	2	Cg0530	hypothetical protein	2
985	2	Cg0534	PUTATIVE INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN	4
2249	2	Cg0612	(dkg) 2,5-DIKETO-D-GLUCONIC ACID REDUCTASE	0
74	2	Cg0668	segregation ATPase FtsK/SpoIIIE family	1
221	2	Cg0722	drug exporter, RND superfamily	12
892	2	Cg0727	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	1
89	2	Cg0738	(dnaE2) PUTATIVE DNA POLYMERASE III ALPHA CHAIN	0
834	2	Cg0759	(prpD2) PROPIONATE CATABOLISM PROTEIN PRPD	0
416	2	Cg0781	membrane protein	3
262	2	Cg0790	(lpdA) DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE	0
121	2	Cg0835	(msiK2) ABC-type sugar transport systems, ATPase component	0
997	2	Cg0862	(mtrA) Response regulator	0
231	2	Cg0864	(mtrB) Signal transduction histidine kinase	2
185	2	Cg0868	(secA) PREPROTEIN TRANSLOCASE SUBUNIT SECA	0
495	2	Cg0893	secreted protein containing a PDZ domain	1
197	2	Cg0896	membrane protein	7
476	2	Cg0926	ABC-type cobalamin/Fe3 ⁺ -siderophores transport system, permease component	9
32	2	Cg0957	(fas-IB) FATTY ACID SYNTHASE	0
75	2	Cg0968	PUTATIVE ATP-DEPENDENT HELICASE	0
163	2	Cg0992	Sulfate permease or related transporter (MFS superfamily)	10
188	2	Cg0998	Trypsin-like serine protease	1
213	2	Cg1016	(betP) glycine betaine transporter	12
463	2	Cg1020	double-stranded beta-helix domain	0
502	2	Cg1064	Branched-chain amino acid ABC-type transport system, permease component	9
382	2	Cg1086	putative membrane protein	6
518	2	Cg1115	(ppx2) EXOPOLYPHOSPHATASE	0
916	2	Cg1128	similar to ribosomal protein S2	1
333	2	Cg1142	Na ⁺ /proline, Na ⁺ /panthothenate symporter	11

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
964	2	Cg1165	Gamma-aminobutyrate permease or related permease	4
1260	2	Cg1190	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
585	2	Cg1203	Mg-chelatase subunit ChII	0
270	2	Cg1212	Permease of the major facilitator superfamily	12
464	2	Cg1245	putative membrane protein	10
953	2	Cg1277	conserved hypothetical membrane protein	2
236	2	Cg1280	(odhA) 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE	0
83	2	Cg1281	ABC-type multidrug/protein/lipid transport system, ATPase component	12
703	2	Cg1282	conserved hypothetical protein	3
349	2	Cg1289	Permease of the major facilitator superfamily	14
277	2	Cg1299	(cydD) ABC-type multidrug/protein/lipid transport system, ATPase component	6
419	2	Cg1305	Amino acid permease	12
856	2	Cg1343	(narH) PROBABLE RESPIRATORY NITRATE REDUCTASE OXIDOREDUCT	0
665	2	Cg1354	(rho) Transcription termination factor Rho	0
361	2	Cg1365	(atpH) H ⁺ -ATPASE DELTA SUBUNIT	0
172	2	Cg1399	Permease of the major facilitator superfamily	14
284	2	Cg1412	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport system, permease component	9
237	2	Cg1424	(lysE) Lysine efflux permease	6
219	2	Cg1456	Predicted signal-transduction protein containing cAMP-binding and CBS domain	0
563	2	Cg1474	putative ATP/GTP-binding protein	0
597	2	Cg1505	putative secreted protein	1
215	2	Cg1506	putative membrane protein	8
867	2	Cg1528	(dkgX) putative 2,5-DIKETO-D-GLUCONIC ACID REDUCTASE	0
822	2	Cg1540	putative secreted protein	0
269	2	Cg1545	Permease of the major facilitator superfamily	14
422	2	Cg1546	(rbsK1) PUTATIVE RIBOKINASE PROTEIN	0
359	2	Cg1577	putative secreted hydrolase	1
741	2	Cg1623	Predicted divalent heavy-metal cations transporter	7
570	2	Cg1643	(gnd) 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE	0
700	2	Cg1647	ABC-type multidrug transport system, permease component	5
627	2	Cg1650	(pctC) ABC-type phosphate/phosphonate transport system, permease component	5
532	2	Cg1657	(ufaA) PUTATIVE CYCLOPROPANE FATTY ACID SYNTHASE (CYCLOPROPANE-FATTY-ACYL-PHOSPHOLIPID SYNTHASE)	0
420	2	Cg1672	(ppmC) polyprenol-phosphate-mannose synthase domain 1	0
377	2	Cg1673	(ppmN) polyprenol-phosphate-mannose synthase domain 2	8
769	2	Cg1806	(metK) S-Adenosylmethionine Synthetase	0
970	2	Cg1865	(secF) Preprotein translocase subunit SecF	6
660	2	Cg1868	(secN) Preprotein translocase subunit YajC homolog	1
386	2	Cg1880	(thrS) THREONYL-TRNA SYNTHETASE	0
50	2	Cg1995	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
1419	2	Cg2010	Permease of the major facilitator superfamily	2
2331	2	Cg2071	(int2~) putative phage Integrase (N-terminal fragment)	0
263	2	Cg2077	putative membrane protein	10
156	2	Cg2095	putative membrane protein	10
312	2	Cg2110	putative membrane protein	5
97	2	Cg2111	(hrpA) PROBABLE ATP-DEPENDENT RNA HELICASE PROTEIN	0
1267	2	Cg2128	putative secreted or membrane protein	1
471	2	Cg2139	(gluD) GLUTAMATE PERMEASE	6
287	2	Cg2158	(ftsK) CELL DIVISION PROTEIN, REQUIRED FOR CELL DIVISION AND CHROMOSOME PARTITIONING	5
1280	2	Cg2186	conserved hypothetical protein	0
288	2	Cg2192	(mqo) MALATE:QUINONE OXIDOREDUCTASE OXIDOREDUCTASE	0
238	2	Cg2201	signal transduction histidine kinase	4
244	2	Cg2212	putative membrane protein	13
777	2	Cg2215	putative membrane protein	2
307	2	Cg2258	(glnD) PROBABLE PROTEIN-PII URIDYLTRANSFERASE	0
181	2	Cg2279	ABC-type multidrug/protein/lipid transport system, transmembrane ATPase component	5
497	2	Cg2291	(pyk) PYRUVATE KINASE	0
971	2	Cg2294	putative membrane protein	4
418	2	Cg2301	Permease of the major facilitator superfamily	12
765	2	Cg2334	(ilvA) THREONINE DEHYDRATASE	0

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1550	2	Cg2350	conserved hypothetical protein	0
290	2	Cg2372	(mraY) PHOSPHO-N-ACETYLMURAMOYL-PENTAPEPTIDE-TRANSFERASE	10
170	2	Cg2388	(pknL) PUTATIVE SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE	1
1202	2	Cg2457	conserved hypothetical protein	0
286	2	Cg2466	(aceE) PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT	0
430	2	Cg2470	SECRETED ABC TRANSPORTER SUBSTRATE-BINDING PROTEIN	0
560	2	Cg2487	conserved hypothetical protein	0
721	2	Cg2535	putative secreted protein	0
1823	2	Cg2547	putative membrane protein	2
325	2	Cg2552	ATPase component of ABC-type transport system, contains duplicated ATPase domain	0
517	2	Cg2558	related to aldose 1-epimerase	0
577	2	Cg2577	Predicted multitransmembrane, metal-binding protein	8
363	2	Cg2618	(vanK) VANILLATE TRANSPORTER VANK	12
1462	2	Cg2620	(clpX) PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEASE (ATP-BINDING SPECIFICITY SUBUNIT)	0
149	2	Cg2641	Bacterial regulatory protein, LuxR family	0
322	2	Cg2643	(benE) BENZOATE MEMBRANE TRANSPORT PROTEIN	11
619	2	Cg2657	putative membrane protein - fragment	1
334	2	Cg2680	Aminotransferase class-III, pyridoxal-phosphate dependent	0
407	2	Cg2695	ABC-type transport system, ATPase component	0
806	2	Cg2701	putative membrane protein	5
661	2	Cg2719	PUTATIVE ENTEROCHELIN ESTERASE	0
903	2	Cg2762	(murI) GLUTAMATE RACEMASE	0
1534	2	Cg2806	putative membrane protein	4
719	2	Cg2809	putative membrane protein	5
95	2	Cg2811	ABC-type transport system, involved in lipoprotein release, permease component	10
431	2	Cg2891	(poxB) PYRUVATE DEHYDROGENASE	0
222	2	Cg2939	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, fused permease and ATPase components	5
224	2	Cg2971	(lmrB) LINCOMYCIN RESISTANCE PROTEIN LMRB	14
1194	2	Cg2973	conserved hypothetical protein	0
451	2	Cg3027	(mrpE) Multisubunit Na ⁺ /H ⁺ antiporter, subunit E	1
183	2	Cg3079	(clpB) PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEASE (HEAT SHOCK PROTEIN)	0
881	2	Cg3119	(cysI) Probable Sulfite Reductase (Flavoprotein)	0
291	2	Cg3132	putative membrane protein	6
574	2	Cg3135	putative membrane protein	6
276	2	Cg3165	putative membrane protein	10
212	2	Cg3179	(fadD2) PUTATIVE ACYL-COA SYNTHETASE	0
171	2	Cg3216	(gntP) GLUCONATE PERMEASE	11
595	2	Cg3226	permease of the major facilitator superfamily	12
166	2	Cg3245	Permease of the major facilitator superfamily	13
190	2	Cg3252	putative preprotein translocase subunit YidC, SpoIIIJ homolog	5
1464	2	Cg3308	(rpsF) RIBOSOMAL PROTEIN S6	0
763	2	Cg3312	putative membrane protein	10
314	2	Cg3334	putative arabinose efflux permease	12
1371	2	Cg3338	putative membrane protein	5
159	2	Cg3346	(leuS) LEUCYL-TRNA SYNTHETASE	0
1801	2	Cg3357	(trpP) tryptophan-specific permease, 5-methyltryptophan resistance	3
1123	2	Cg3399	Permease of the major facilitator superfamily	3

Tab. 9-2A: nLC-MALDI-TOF/TOF, *Corynebacterium* DM1730-Membranen, Elastase, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	21	gi 19553827	ABC-type transporter, periplasmic component	0
2	19	gi 19553194	ABC-type transporter, periplasmic component	0
9	17	gi 19552680	NADH dehydrogenase, FAD-containing subunit	1
4	16	gi 19553397	cytochrome C oxidase subunit II	3
3	15	gi 19553658	ABC-type transporter, periplasmic component	0
5	14	gi 19551617	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	0
6	13	gi 19551739	elongation factor Tu	0
10	11	gi 19552574	phosphotransferase system IIC component, glucose/maltose/N-acetylglucosamine-specific	10
8	11	gi 19552705	twin argininte translocase protein A	1
11	11	gi 19554067	putative esterase	1
12	10	gi 19551618	succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit	0
13	9	gi 19553189	translation initiation factor IF-2	0
7	8	gi 19551738	elongation factor G	0
15	8	gi 19551869	ABC-type transporter, periplasmic component	0
16	6	gi 19553476	glycyl-tRNA synthetase	0
20	5	gi 19551956	ABC-type transporter, periplasmic component	0
14	5	gi 19553220	hypothetical protein NCgl1941	2
21	5	gi 19553660	ABC-type transporter, ATPase component	0
26	5	gi 19554025	putative membrane protease subunit	2
30	4	gi 19551276	hypothetical protein NCgl0025	0
38	4	gi 19551746	50S ribosomal protein L3	0
47	4	gi 19552045	hypothetical protein NCgl0784	0
48	4	gi 19552590	hypothetical protein NCgl1320	0
54	4	gi 19552797	phosphoenolpyruvate carboxylase	0
18	4	gi 19553156	glutamate ABC-type transporter, periplasmic component	0
49	4	gi 19553166	phage shock protein A (IM30)	0
40	4	gi 19553427	hypothetical protein NCgl2145	0
19	4	gi 19553768	ABC-type transporter, ATPase component	0
45	4	gi 19554065	putative esterase	1
25	4	gi 21325295	Heme/copper-type cytochrome/quinol oxidases, subunit 1	0
23	4	gi 50979297	pancreatic elastase I [Sus scrofa]	0
41	3	gi 19551749	50S ribosomal protein L2	0
82	3	gi 19551798	30S ribosomal protein S4	0
22	3	gi 19551816	30S ribosomal protein S9	0
32	3	gi 19552361	hypothetical protein NCgl1090	0
17	3	gi 19553208	hypothetical protein NCgl1929	2
33	3	gi 19553391	cytochrome b subunit of the bc complex	9
50	3	gi 19553392	Rieske Fe-S protein	3
37	3	gi 19554075	K ⁺ transport flavoprotein	0
44	3	gi 19554256	putative proline-betaine transporter	11
46	3	gi 21324961	Cytochrome c, mono- and diheme variants	3
39	2	gi 19551283	hypothetical protein NCgl0032	1
57	2	gi 19551592	esterase	0
63	2	gi 19551616	hypothetical protein NCgl0359	5
52	2	gi 19552063	fatty-acid synthase	0
96	2	gi 19552093	30S ribosomal protein S14	0
27	2	gi 19552104	large-conductance mechanosensitive channel	2
87	2	gi 19552197	hypothetical protein NCgl0933	0
35	2	gi 19552199	phosphopyruvate hydratase	0
75	2	gi 19552305	ABC-type transporter, duplicated ATPase component	0
55	2	gi 19552365	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	0
70	2	gi 19552435	F0F1 ATP synthase subunit beta	0
71	2	gi 19552558	hypothetical protein NCgl1288	0
65	2	gi 19552617	argininosuccinate synthase	0
53	2	gi 19552746	membrane protease subunit	1
59	2	gi 19552821	carbamoyl phosphate synthase large subunit	0
28	2	gi 19552869	preprotein translocase subunit YajC	1
78	2	gi 19553239	50S ribosomal protein L19	0
62	2	gi 19553445	pyruvate dehydrogenase subunit E1	0

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
34	2	gi 19554117	hypothetical protein NCgl2831	0
36	2	gi 21322997	Uncharacterized ACR	0
69	2	gi 21323552	Uncharacterized ACR	0
61	2	gi 21323977	F0F1-type ATP synthase alpha subunit	0
80	2	gi 21324976	Leucyl aminopeptidase	0
76	2	gi 41326894	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	1

Tab. 9-2B: nLC-MALDI-TOF/TOF, *Corynebacterium* DM1730-Membranen, Trypsin, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
2	19	gi 19551617	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	0
1	12	gi 19553194	ABC-type transporter, periplasmic component	0
5	9	gi 19551738	elongation factor G	0
7	9	gi 19552590	hypothetical protein NCgl1320	0
3	9	gi 19554025	putative membrane protease subunit	2
26	8	gi 19551749	50S ribosomal protein L2	0
15	8	gi 19553197	ABC-type transporter, duplicated ATPase component	0
42	7	gi 19551798	30S ribosomal protein S4	0
4	7	gi 19553141	phosphotransferase system, fructose-specific IIC component	9
8	7	gi 19553391	cytochrome b subunit of the bc complex	9
16	7	gi 21325295	Heme/copper-type cytochrome/quinol oxidases, subunit 1	0
11	6	gi 19552680	NADH dehydrogenase, FAD-containing subunit	1
29	6	gi 19552797	phosphoenolpyruvate carboxylase	0
12	6	gi 19553397	cytochrome C oxidase subunit II	3
20	5	gi 19551592	esterase	0
13	5	gi 19551739	elongation factor Tu	0
6	5	gi 19551746	50S ribosomal protein L3	0
30	5	gi 19551869	ABC-type transporter, periplasmic component	0
17	5	gi 19552365	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	0
31	5	gi 19552799	phosphoglycerate kinase	0
14	5	gi 19553427	hypothetical protein NCgl2145	0
9	5	gi 19553660	ABC-type transporter, ATPase component	0
55	5	gi 19554065	putative esterase	1
37	5	gi 19554067	putative esterase	1
23	4	gi 19551691	hypothetical protein NCgl0431	1
47	4	gi 19551731	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	0
22	4	gi 19551747	50S ribosomal protein L4	0
48	4	gi 19551797	30S ribosomal protein S11	0
63	4	gi 19552305	ABC-type transporter, duplicated ATPase component	0
40	4	gi 19552493	ketol-acid reductoisomerase	0
82	4	gi 19552746	membrane protease subunit	1
18	4	gi 19553208	hypothetical protein NCgl1929	2
51	4	gi 19553392	Rieske Fe-S protein	3
10	4	gi 19553827	ABC-type transporter, periplasmic component	0
56	4	gi 19553828	ABC-type transporter, ATPase component	0
19	4	gi 19554075	K ⁺ transport flavoprotein	0
58	4	gi 19554105	L-lactate dehydrogenase	0
72	3	gi 19551276	hypothetical protein NCgl0025	0
71	3	gi 19551616	hypothetical protein NCgl0359	5
53	3	gi 19551618	succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit	0
89	3	gi 19551732	DNA-directed RNA polymerase subunit beta~	0
65	3	gi 19551984	ribosome-associated protein Y	0
100	3	gi 19552143	hypothetical protein NCgl0880	0
41	3	gi 19552215	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	0
104	3	gi 19552407	homoserine dehydrogenase	0
21	3	gi 19552574	phosphotransferase system IIC component, glucose/maltose/N-acetylglucosamine-specific	10

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
79	3	gi 19552869	preprotein translocase subunit YajC	1
39	3	gi 19553166	phage shock protein A (IM30)	0
54	3	gi 19553205	malate:quinone oxidoreductase	0
93	3	gi 19554072	hypothetical protein NCgl2784	1
69	3	gi 19554227	ascorbate-specific PTS system enzyme IIC	13
68	3	gi 21323598	Uncharacterized membrane protein	0
78	3	gi 41325061	FATTY ACID SYNTHASE	0
94	2	gi 19551377	hypothetical protein NCgl0124	1
67	2	gi 19551441	FAD/FMN-containing dehydrogenase	0
34	2	gi 19551717	preprotein translocase subunit SecE	1
101	2	gi 19551752	30S ribosomal protein S3	0
119	2	gi 19551753	50S ribosomal protein L16	0
109	2	gi 19551759	50S ribosomal protein L24	0
88	2	gi 19551799	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	0
118	2	gi 19551816	30S ribosomal protein S9	0
28	2	gi 19551824	hypothetical protein NCgl0565	9
64	2	gi 19551937	detergent sensitivity rescuer dtsR2	1
59	2	gi 19551956	ABC-type transporter, periplasmic component	0
24	2	gi 19552045	hypothetical protein NCgl0784	0
122	2	gi 19552092	30S ribosomal protein S18	0
27	2	gi 19552104	large-conductance mechanosensitive channel	2
86	2	gi 19552148	hypothetical protein NCgl0885	1
62	2	gi 19552219	serine hydroxymethyltransferase	0
35	2	gi 19552314	hypothetical protein NCgl1043	4
61	2	gi 19552403	arginyl-tRNA synthetase	0
38	2	gi 19552487	hypothetical protein NCgl1218	5
81	2	gi 19552504	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0
91	2	gi 19552573	30S ribosomal protein S1	0
128	2	gi 19552608	hypothetical protein NCgl1337	1
105	2	gi 19552617	argininosuccinate synthase	0
97	2	gi 19552775	ABC-type transporter, ATPase component	0
52	2	gi 19552846	hypothetical protein NCgl1572	0
49	2	gi 19553032	hypothetical protein NCgl1756	0
83	2	gi 19553156	glutamate ABC-type transporter, periplasmic component	0
114	2	gi 19553189	translation initiation factor IF-2	0
43	2	gi 19553196	ABC-type transporter, permease component	6
32	2	gi 19553220	hypothetical protein NCgl1941	2
166	2	gi 19553542	30S ribosomal protein S20	0
103	2	gi 19553618	hypothetical protein NCgl2336	1
130	2	gi 19553650	putative ABC transporter ATP-binding protein	0
123	2	gi 19553658	ABC-type transporter, periplasmic component	0
107	2	gi 19553751	ABC-type transporter, ATPase component	0
45	2	gi 19553768	ABC-type transporter, ATPase component	0
70	2	gi 19553840	phosphotransferase system IIC component	10
115	2	gi 41325436	ATP SYNTHASE ALPHA SUBUNIT	0

Tab. 9-3A: nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpurmembranen, Elastase, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
2	42	gi 50979297	pancreatic elastase I	0
4	39	gi 10580964	bacteriorhodopsin	7
1	26	gi 10581760	dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	0
3	15	gi 10580369	halocyanin precursor-like	0
5	14	gi 10581613	halocyanin precursor-like	3
7	11	gi 10581921	dipeptide ABC transporter ATP-binding	0
6	10	gi 10584350	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
9	7	gi 10581945	conserved hypothetical protein	1
8	5	gi 10579949	bifunctional short chain isoprenyl diphosphate synthase	1
10	5	gi 10580168	conserved hypothetical protein	0
12	4	gi 10580181	conserved hypothetical protein	1
21	4	gi 10581559	H ⁺ -transporting ATP synthase subunit I	7
11	4	gi 16554513	cytochrome c oxidase subunit I	13
17	2	gi 10580180	hypothetical protein	2
22	2	gi 10580235	F420H2:quinone oxidoreductase chain L	17
13	2	gi 10580237	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	11
15	2	gi 10580777	hypothetical protein	1
18	2	gi 10581468	hypothetical protein	0
16	2	gi 10581558	H ⁺ -transporting ATP synthase subunit K	2
31	2	gi 10581614	hypothetical protein	2
19	2	gi 10581784	nitrite/nitrate reduction protein	6
28	2	gi 10582055	cell surface glycoprotein	1
20	2	gi 10584336	Vng6297c	0

Tab. 9-3B: nLC-MALDI-TOF/TOF, *Corynebacterium* DM1730-Membranen, Elastase, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	24	Cg2705	(amyE) MALTOSE-BINDING PROTEIN PRECURSOR	0
3	18	Cg2181	ABC-type peptide transport system, secreted component	0
2	15	Cg2911	ABC-type Mn/Zn transport system, secreted Mn/Zn-binding (lipo)protein (surface adhesin)	0
5	10	Cg0737	ABC-type transport system, secreted lipoprotein component	0
4	10	Cg3009	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
7	7	Cg1537	(ptsG) GLUCOSE-SPECIFIC ENZYME II BC COMPONENT OF PTS (EC 2.7.1.69)	10
12	6	P00772	Elastase-1	0
8	5	Cg0040	PUTATIVE SECRETED PROTEIN	0
11	5	Cg0446	(sdhA) succinate dehydrogenase A (EC 1.3.99.1)	0
10	5	Cg0447	(sdhB) succinate dehydrogenase B	0
9	5	Cg2137	(gluB) GLUTAMATE SECRETED BINDING PROTEIN	0
6	5	Cg2195	putative secreted or membrane protein	2
13	5	Cg2409	(ctaC) CYTOCHROME C OXIDASE CHAIN II (EC 1.9.3.1)	3
16	5	Cg3186	(cmt2) Trehalose corynomycolyl transferase (EC 2.3.1.122)	1
17	4	Cg0935	conserved hypothetical protein	0
19	3	Cg0834	Bacterial extracellular solute-binding protein, fa	0
14	3	Cg2211	putative membrane protein	2
21	3	Cg2799	(pknE) putative secreted protein	1
26	2	Cg0044	PROBABLE SOLUTE-BINDING LIPOPROTEIN, signal peptide	0
15	2	Cg0573	(rplL) PROBABLE 50S RIBOSOMAL SUBUNIT PROTEIN L7/L12	0
23	2	Cg1085	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
27	2	Cg1286	conserved hypothetical protein	0
24	2	Cg1787	(ppc) PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE (EC 4.1.1.31)	0
29	2	Cg2444	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
25	2	Cg2875	hypothetical protein predicted by Glimmer	0

Tab. 9-3C: OGE/nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpirmembranen, Elastase, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	101	gi 10581760	dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	0
2	81	gi 10580964	bacteriorhodopsin	7
3	75	gi 10581921	dipeptide ABC transporter ATP-binding	0
4	64	gi 50979297	pancreatic elastase I	0
7	44	gi 10580139	immunogenic protein	0
6	43	gi 10584307	adhesion protein	0
5	40	gi 10580462	conserved hypothetical protein	0
11	22	gi 10579949	bifunctional short chain isoprenyl diphosphate synthase	1
13	16	gi 10582055	cell surface glycoprotein	1
8	15	gi 10581558	H ⁺ -transporting ATP synthase subunit K	2
10	14	gi 10580181	conserved hypothetical protein	1
9	14	gi 10580369	halocyanin precursor-like	0
12	12	gi 10580235	F420H2:quinone oxidoreductase chain L	17
14	12	gi 10580483	iron-binding protein	0
17	11	gi 16554513	cytochrome c oxidase subunit I	13
19	10	gi 10579932	lipoate protein ligase	1
16	10	gi 10584350	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
22	7	gi 10581419	protein-export membrane protein	6
26	6	gi 10580062	phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-binding	0
18	6	gi 10580777	hypothetical protein	1
35	6	gi 10581159	50S ribosomal protein L13P	0
15	6	gi 10581468	hypothetical protein	0
27	6	gi 10581612	cytochrome c oxidase subunit II	0
33	6	gi 10581882	phosphate ABC transporter binding	0
24	5	gi 10580177	conserved hypothetical protein	4
31	5	gi 10580180	hypothetical protein	2
28	5	gi 10580721	membrane protein	0
23	5	gi 10581255	hypothetical protein	0
36	5	gi 10581787	hypothetical protein	5
20	5	gi 16554486	metallo-beta-lactamase superfamily hydrolase	0
29	4	gi 10580210	hypothetical protein	0
50	4	gi 10580230	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	6
34	4	gi 10580237	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	11
38	4	gi 10580676	50S ribosomal protein L13P	0
25	4	gi 10581182	protein translocase	10
32	4	gi 10581371	hypothetical protein	2
21	4	gi 10581613	halocyanin precursor-like	3
61	4	gi 10581945	conserved hypothetical protein	1
45	4	gi 10581997	probable carboxypeptidase	0
39	4	gi 10584333	Vng6296c	0
91	3	gi 10579748	50S ribosomal protein L10E	0
69	3	gi 10579829	halorhodopsin	7
37	3	gi 10580017	hypothetical protein	0
47	3	gi 10580178	cytochrome b6	5
48	3	gi 10580246	cytochrome c oxidase subunit I	13
79	3	gi 10580251	cytochrome c oxidase subunit II	3
52	3	gi 10580517	flagellin B1 precursor	1
82	3	gi 10580828	succinate dehydrogenase subunit C	3
44	3	gi 10580962	bacteriorhodopsin related protein	7
60	3	gi 10581015	daunorubicin resistance ABC transporter ATP-binding protein	13
49	3	gi 10581140	30S ribosomal protein S8E	0
71	3	gi 10581502	possible phosphate binding protein	0
30	3	gi 10581692	conserved hypothetical protein	0
42	3	gi 10581732	heterodisulfide reductase	5
58	3	gi 10581758	dipeptide ABC transporter permease	8
40	3	gi 10581759	dipeptide ABC transporter permease	6
41	3	gi 10581802	conserved hypothetical protein	0
43	3	gi 10581968	hypothetical protein	1
89	3	gi 10584311	Vng6268c	15

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
67	2	gi 10579826	50S ribosomal protein L15E	0
70	2	gi 10579959	hypothetical protein	2
46	2	gi 10580022	conserved hypothetical protein	0
112	2	gi 10580060	phosphate ABC transporter permease	14
88	2	gi 10580166	conserved hypothetical protein	0
65	2	gi 10580175	hypothetical protein	2
54	2	gi 10580211	proteinase IV homolog	1
56	2	gi 10580236	F420H2:quinone oxidoreductase chain M	15
122	2	gi 10580424	conserved hypothetical protein	12
63	2	gi 10580518	flagellin B2 precursor	0
64	2	gi 10580564	flagellin A1 precursor	1
81	2	gi 10580565	flagellin A2 precursor	0
90	2	gi 10580667	putative 2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase (beta)	0
76	2	gi 10581131	Htr1 transducer	1
74	2	gi 10581215	Htr5 transducer	2
87	2	gi 10581350	hypothetical protein	3
51	2	gi 10581420	protein-export membrane protein	6
96	2	gi 10581785	copper transport ATP-binding protein	0
78	2	gi 10581818	hypothetical protein	4
68	2	gi 10581923	dipeptide ABC transporter permease	5
66	2	gi 10582039	30S ribosomal protein S7P	0
53	2	gi 10584332	peroxidase / catalase	0
59	2	gi 16554520	nicotinate phosphoribosyltransferase	0
62	2	gi 2822317	CydA	9

Tab. 9-3D: OGE/nLC-MALDI-TOF/TOF, *Corynebacterium* DM1730-Membranen, Elastase, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	38	Cg0446	(sdhA) succinate dehydrogenase A (EC 1.3.99.1)	0
2	21	Cg2181	ABC-type peptide transport system, secreted component	0
3	20	Cg2911	ABC-type Mn/Zn transport system, secreted Mn/Zn-binding (lipo)protein (surface adhesin)	0
5	18	Cg2404	(qcrA1) RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN	3
6	17	Cg2705	(amyE) MALTOSE-BINDING PROTEIN PRECURSOR	0
7	16	Cg2137	(gluB) GLUTAMATE SECRETED BINDING PROTEIN	0
4	14	P00772	Elastase-1 - Sus scrofa (Pig).	0
9	12	Cg0737	ABC-type transport system, secreted lipoprotein component	0
10	11	Cg1656	(ndh) NADH DEHYDROGENASE (EC 1.6.99.3)	1
16	11	Cg2409	(ctaC) CYTOCHROME C OXIDASE CHAIN II (EC 1.9.3.1)	3
8	10	Cg2195	putative secreted or membrane protein	2
18	9	Cg0413	(cmt1) Trehalose corynomycolyl transferase (EC 2.3.1.122)	0
15	9	Cg0447	(sdhB) succinate dehydrogenase B	0
20	9	Cg2708	(msiK1) ABC-type sugar transport system, ATPase component	0
12	8	Cg0935	conserved hypothetical protein	0
22	8	Cg2780	(ctaD) PROBABLE CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE SUBUNIT (EC 1.9.3.1)	12
14	8	Cg3186	(cmt2) Trehalose corynomycolyl transferase (EC 2.3.1.122)	1
13	7	Cg0040	PUTATIVE SECRETED PROTEIN	0
11	7	Cg1537	(ptsG) GLUCOSE-SPECIFIC ENZYME II BC COMPONENT OF PTS (EC 2.7.1.69)	10
23	7	Cg1787	(ppc) PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE (EC 4.1.1.31)	0
17	7	Cg2403	(qcrB) CYTOCHROME B, MEMBRANE PROTEIN (EC 1.10.2.2)	9
31	6	Cg1081	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	0
26	6	Cg2151	Similar to phage shock protein A	0
21	5	Cg0834	Bacterial extracellular solute-binding protein, fa	0
27	5	Cg1085	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
29	5	Cg2429	(glnA) GLUTAMINE SYNTHETASE I (EC 6.3.1.2)	0
30	5	Cg2925	(ptsS) ENZYME II SUCROSE PROTEIN (EC 2.7.1.69)	10
28	4	Cg0953	Na ⁺ /proline, Na ⁺ /panthothenate symporter or related permease	13

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
19	4	Cg2211	putative membrane protein	2
37	4	Cg3138	Membrane protease subunit, stomatin/prohibitin homolog	2
52	4	Cg3395	(proP) PROLINE/ECTOINE CARRIER	11
38	3	Cg0753	secreted protein	0
41	3	Cg1290	(metE) Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)	0
24	3	Cg2657	putative membrane protein - fragment	1
39	3	Cg2782	(ftn) Ferritin-like protein	0
25	3	Cg3182	(cop1) Trehalose corynomycolyl transferase (EC 2.3.1.122)	1
40	3	Cg3257	conserved hypothetical protein	0
60	2	Cg0577	(rpoC) DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA~ CHAIN (EC 2.7.7.6)	0
42	2	Cg0654	(rpsD) RIBOSOMAL PROTEIN S4	0
46	2	Cg0655	(rpoA) DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ALPHA SUBUNIT (EC 2.7.7.6)	0
94	2	Cg0835	(msiK2) ABC-type sugar transport systems, ATPase component	0
36	2	Cg1001	(mscL) LARGE CONDUCTANCE MECHANOSENSITIVE CHANNEL	2
53	2	Cg1109	(porB) Anion-specific porin precursor	0
48	2	Cg1111	(eno) ENOLASE (EC 4.2.1.11)	0
35	2	Cg1332	PUTATIVE SECRETED HYDROLASE	0
49	2	Cg1363	(atpE) ATP SYNTHASE C CHAIN (EC 3.6.1.34)	2
70	2	Cg1366	(atpA) PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN (EC 3.6.1.34)	0
91	2	Cg1368	(atpD) ATP SYNTHASE ALPHA SUBUNIT (EC 3.6.1.34)	0
98	2	Cg1479	(glgP1) PUTATIVE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE (EC 2.4.1.1)	0
77	2	Cg1654	(thiD1) PHOSPHOMETHYLPYRIMIDINE KINASE / HYDROXYMETHYLPYRI (EC 2.7.4.7,2.5.1.3)	0
97	2	Cg1730	secreted protease subunit, stomatin/prohibitin homolog	1
33	2	Cg1790	(pgk) PHOSPHOGLYCERATE KINASE (EC 2.7.2.3)	0
55	2	Cg1796	(ribX) putative membrane protein - C. ammoniagenes RibX homolog	2
59	2	Cg1836	secreted solute-binding protein, aminodeoxychorismate lyase-like	1
54	2	Cg2325	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	0
44	2	Cg2419	(pepB) LEUCINE AMINOPEPTIDASE (EC 3.4.11.1)	0
43	2	Cg2499	(glyS) GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE--TRNA LIGASE) (EC 6.1.1.14)	0
32	2	Cg2843	(pstB) ABC-type phosphate transport system, ATPase component	0
34	2	Cg2949	putative secreted protein	0
78	2	Cg3149	Aminotransferases class-I	0
47	2	Cg3195	Flavin-containing monooxygenase (FMO)	0
74	2	Cg3343	putative secreted membrane protein	2

Tab. 9-4A: nLC-MALDI-TOF/TOF bzw. -Orbitrap, Purpurmembranen, Elastase, 50 bzw. 5 ppm.

Hit	Accession	Beschreibung	TOF/TOF	Hybrid
1	P02945	Bacteriorhodopsin	25	33
2	P00772	Elastase-1	21	24
3	Q9HM69	Cell surface glycoprotein	5	16
4	Q9HMI3	Dipeptide ABC transporter ATP-binding	8	11
5	Q9HHP4	Vng6296c	4	7
6	Q9HSM4	NADP-specific glutamate dehydrogenase B	6	7
7	Q9HMT7	Probable thiosulfate sulfurtransferase	4	6
8	Q9HMW9	Dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	4	6
9	Q9HSS1	Phosphoglycerate dehydrogenase	4	6
10	Q9HM89	Elongation factor 1-alpha	3	5
11	Q9HHN1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	4	4
12	Q9HMB6	Alcohol dehydrogenase	3	4
13	Q9HN94	Cytochrome c oxidase subunit II	3	4
14	Q9HNW7	Phosphoribosyl transferase	4	4
15	Q9HQD8	Probable urocanate hydratase	2	4
16	Q9HR20	Putative uncharacterized protein	4	4
17	Q9HR99	Halocyanin-like	4	4
18	Q9HMB7	Probable carboxypeptidase	1	3

Hit	Accession	Beschreibung	TOF/TOF	Hybrid
19	Q9HMF1	Aconitase	3	3
20	Q9HMM4	DNA repair and recombination protein radA	2	3
21	Q9HSA8	Bifunctional short chain isoprenyl diphosphate synthase	0	3
22	Q9HMV3	DNA repair protein	1	2
23	Q9HPG8	Ribonucleoside-diphosphate reductase	2	2
24	Q9HQ43	Putative uncharacterized protein	1	2
25	Q9HQJ9	Putative 2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase	1	2
26	Q9HRL9	NADH dehydrogenase/oxidoreductase	2	2
27	Q9HH34	Rhodopsin	2	0
28	O54610	CydA	0	2
29	Q9HHS5	Vng6251h	0	2
30	Q48302	Precursor proteolipid	1	1
31	Q9HHN2	Arginyl-tRNA synthetase	1	1
32	Q9HHS0	Cell division protein	1	1
33	Q9HMB5	Elongation factor 2	1	1
34	Q9HMB4	Repair helicase	1	1
35	Q9HMH0	Aminopeptidase homolog	1	1
36	Q9HMR0	Phosphoglycerate dehydrogenase	1	1
37	Q9HMU8	Copper transport ATP-binding protein	1	1
38	Q9HN08	Thioredoxin reductase	1	1
39	Q9HN93	Halocyanin-like	1	1
40	Q9HN95	Cytochrome c oxidase subunit I	1	1
41	Q9HNP8	Oligopeptidase	1	1
42	Q9HP89	Photolyase/cryptochrome	1	1
43	Q9HQF4	Membrane protein	1	1
44	Q9HQQ9	UDP-glucose dehydrogenase	1	1
45	Q9HQU8	Acetyl-CoA synthetase	1	1
46	Q9HR04	Iron-binding protein	1	1
47	Q9HR49	Phosphoribosylformylglycinamide synthase II	1	1
48	Q9HRB3	Acyl-CoA dehydrogenase	1	1
49	Q9HRN3	Proteinase IV homolog	1	1
50	Q9HRQ9	Putative uncharacterized protein	1	1
51	Q9HS02	Aldehyde reductase	1	1
52	Q9HS25	Putative uncharacterized protein	1	1
53	Q9HS43	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide formyltransferase	1	1
54	Q9HS51	Putative uncharacterized protein	1	1
55	Q9HS84	Putative uncharacterized protein	1	1
56	O51982	Putative uncharacterized protein	1	1

Tab. 9-4B: nLC-MALDI-TOF/TOF bzw. -Orbitrap, C.g. DM1730-Cytosol, Elastase, 50 bzw. 5 ppm.

Hit	Accession	Beschreibung	TOF/TOF	Hybrid
1	Cg2466	(aceE) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT (EC 1.2.4.1)	20	21
2	Cg3068	(fda) [C]: fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	13	20
3	Cg2840	(actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)	11	14
4	Cg0048	(ppiA) [C]: PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE B (EC 5.2.1.8)	9	12
5	Cg0587	(tuf) [C]: ELONGATION FACTOR TU	9	11
6	Cg2613	(mdh) [C]: MALATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN (EC 1.1.1.37)	8	10
7	Cg3237	(sod) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)	8	8
8	Cg0949	(gltA) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)	6	8
9	Cg2121	(ptsH) [C]: PHOSPHOCARRIER PROTEIN HPR	7	7
10	Cg2833	(cysK) [C]: O-Acetylserine (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.8)	6	7
11	Cg1017	(metS) [C]: METHIONYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.10)	4	7
12	Cg0303	(leuA) [C]: 2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE (EC 4.1.3.12)	6	6
13	Cg1630	[C]: PUTATIVE SIGNAL TRANSDUCTION PROTEIN, FHA DOMAIN	5	6
14	Cg0737	[S]: ABC-type transport system, secreted lipoprotein component	4	6

Hit	Accession	Beschreibung	TOF/TOF	Hybrid
15	Cg0750	(foI _D) [C]: METHYLENETETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE (EC 1.5.1.5)	4	6
16	Cg1123	(greA) [C]: Transcription elongation factor	5	5
17	Cg2291	(pyk) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)	5	5
18	Cg2429	(glnA) [C]: GLUTAMINE SYNTHETASE I (EC 6.3.1.2)	5	5
19	Cg2902	[C]: Predicted hydrolases of the HAD superfamily	5	5
20	Cg0766	(icd) [C]: ISOCITRATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.42)	4	5
21	Cg1774	(tkt) [C]: TRANSKETOLASE (EC 2.2.1.1)	4	5
22	Cg3050	[C]: acyltransferase	4	5
23	Cg1790	(pgk) [C]: PHOSPHOGLYCERATE KINASE (EC 2.7.2.3)	3	5
24	Cg1531	(rpsA) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S1	2	5
25	Cg2217	(frr) [C]: RIBOSOME RECYCLING FACTOR	4	4
26	Cg2661	[C]: putative dithiol-disulfide isomerase involved in polyketide biosynthesis	4	4
27	Cg0948	(serC) [C]: Phosphoserine Transaminase (EC 2.6.1.52)	3	4
28	Cg1789	(tpi) [C]: TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.1)	3	4
29	Cg2337	[C]: similar to methionine synthase II (cobalamin-independent)	3	4
30	Cg2603	(ndk) [C]: NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE (EC 2.7.4.6)	3	4
31	Cg3096	[C]: ALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.3)	3	4
32	Cg3100	(dnaK) [C]: Heat shock protein hsp70	3	4
33	P00772	Elastase-1	3	4
34	Cg1479	(glgP1) [C]: PUTATIVE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE (EC 2.4.1.1)	2	4
35	Cg0854	(pmmA) [C]: PHOSPHOMANNOMUTASE (EC 5.4.2.8)	3	2
36	Cg1718	[C]: Phospholipid-binding protein	3	2
37	Cg0339	[C]: translation initiation inhibitor	3	3
38	Cg1145	(fum) [C]: FUMARATE HYDRATASE (EC 4.2.1.2)	3	3
39	Cg1811	(ihf) [C]: putative integration host factor cIHF	3	3
40	Cg2181	[S]: ABC-type peptide transport system, secreted component	3	3
41	Cg2800	(pgm) [C]: PHOSPHOGLUCOMUTASE (EC 5.4.2.2)	3	3
42	Cg2880	[C]: HIT family hydrolase	3	3
43	Cg3201	(serS) [C]: SERYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.11)	3	3
44	Cg0655	(rpoA) [C]: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ALPHA SUBUNIT (EC 2.7.7.6)	2	3
45	Cg1268	(glgA) [C]: GLYCOSYL TRANSFERASE	2	3
46	Cg1437	(ilvC) [C]: KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE (EC 1.1.1.86)	2	3
47	Cg2591	(dkgA) [C]: 2,5-DIKETO-D-GLUCONIC ACID REDUCTASE (EC 1.1.1.-)	2	3
48	Cg2708	(msiK1) [C]: ABC-type sugar transport system, ATPase component	2	3
49	Cg2792	(nadE) [C]: NAD-SYNTHETASE (EC 6.3.5.1)	2	3
50	Cg0350	[C]: TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, CRP/FNR FAMILY	1	3
51	Cg1044	[C]: conserved hypothetical protein	1	3
52	Cg2166	(gpsI) [C]: PUTATIVE POLYRIBONUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE / GUANOSINE PENTAPHOSPHATESYNTHETASE (EC 2.7.7.8)	1	3
53	Cg2305	(hisD) [C]: HISTIDINOL DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.23)	1	3
54	Cg0803	(thtR) [C]: THIOSULFATE SULFURTRANSFERASE (EC 2.8.1.1)	2	2
55	Cg1740	[C]: putative nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	2	1
56	Cg1801	(rpe) [C]: RIBULOSE-5-PHOSPHATE-3-EPIMERASE (EC 5.1.3.1)	2	2
57	Cg2437	(thrC) [C]: THREONINE SYNTHASE (EC 4.2.99.2)	2	2
58	Cg0475	[C]: conserved hypothetical protein	2	2
59	Cg0648	(adk) [C]: ADENYLATE KINASE (EC 2.7.4.3)	2	2
60	Cg0963	[C]: hypothetical protein	2	2
61	Cg1423	[C]: putative oxidoreductase (related to aryl-alcohol dehydrogenases)	2	2
62	Cg2280	(gdh) [C]: NADP-SPECIFIC GLUTAMATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.4)	2	2
63	Cg2418	(ilvE) [C]: BRANCHED-CHAIN AMINO ACID AMINOTRANSFERASE (EC 2.6.1.42)	2	2
64	Cg2536	(aecD) [C]: Cystathionine beta-Lyase (EC 4.4.1.8, 4.4.1.-)	2	2
65	Cg2705	(amyE) [S]: MALTOSE-BINDING PROTEIN PRECURSOR	2	2
66	Cg2862	(purL) [C]: PHOSPHORIBOSYLFORMYLGLYCINAMIDINE SYNTHASE (EC 6.3.5.3)	2	2
67	Cg2891	(poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)	2	2
68	Cg2958	(butA) [C]: L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase (EC 1.1.1.5)	2	2
69	Cg3079	(clpB) [C]: PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEASE (HEAT SHOCK PROTEIN) (EC 3.-.-.-)	2	2
70	Cg0294	(aspB) [C]: ASPARTATE AMINOTRANSFERASE (EC 2.6.1.1)	1	2
71	Cg0307	(asd) [C]: ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.11)	1	2
72	Cg0755	(metY) [C]: O-Acetylhomoserine (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.10)	1	2
73	Cg0834	[S]: Bacterial extracellular solute-binding protein, fa	1	2

Hit	Accession	Beschreibung	TOF/TOF	Hybrid
74	Cg1133	(glyA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	1	2
75	Cg1280	(odhA) [C]: 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.4.2)	1	2
76	Cg1290	(metE) [C]: Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)	1	2
77	Cg1737	(acn) [C]: ACONITASE (EC 4.2.1.3)	1	2
78	Cg1776	(tal) [C]: TRANSALDOLASE (EC 2.2.1.2)	1	2
79	Cg1791	(gap) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.12)	1	2
80	Cg2222	(rpsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2	1	2
81	Cg2523	(malQ) [C]: 4-ALPHA-GLUCANOTRANSFERASE (EC 2.4.1.25)	1	2
82	Cg2846	(pstS) [S]: ABC-type phosphate transport system, secreted component	1	2
83	Cg2911	[S]: ABC-type Mn/Zn transport system, secreted Mn/Zn-binding (lipo)protein (surface adhesin)	1	2
84	Cg3315	[C]: Bacterial regulatory protein, MarR family	1	2
85	Cg3318	[C]: Uncharacterized enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides	1	2
86	Cg0131	[C]: PUTATIVE OXIDOREDUCTASE	0	2
87	Cg2876	(purB) [C]: ADENYLOSUCCINATE LYASE (EC 4.3.2.2)	0	2
88	Cg0247	[C]: conserved hypothetical protein	1	1
89	Cg0551	(menC) [C]: similar to o-succinylbenzoate-coa synthase	1	0
90	Cg1604	[S]: putative secreted protein	1	0
91	Cg1693	(pepC) [C]: Aspartyl aminopeptidase	1	1
92	Cg2962	[C]: Uncharacterized enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides	1	1
93	Cg0107	[S]: secreted protein	1	1
94	Cg0141	[C]: Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase	1	1
95	Cg0282	[C]: conserved hypothetical protein	1	1
96	Cg0349	[C]: METALLO-BETA-LACTAMASE SUPERFAMILY PROTEIN	1	1
97	Cg0373	(topA) [C]: DNA TOPOISOMERASE (EC 5.99.1.2)	1	1
98	Cg0387	(adhE) [C]: PUTATIVE ZINC-TYPE ALCOHOL DEHYDROGENASE TRANSMEMB (EC 1.1.1.1)	1	1
99	Cg0410	[C]: PUTATIVE PROLYL ENDOPEPTIDASE (EC 3.4.21.26)	1	1
100	Cg0441	(lpd) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)	1	1
101	Cg0482	(gpmA) [C]: PHOSPHOGLYCEROMUTASE 1 (EC 5.4.2.1)	1	1
102	Cg0498	(hemC) [C]: PORPHOBILINOGEN DEAMINASE (EC 4.3.1.8)	1	1
103	Cg0573	(rplL) [C]: PROBABLE 50S RIBOSOMAL SUBUNIT PROTEIN L7/L12	1	1
104	Cg0576	(rpoB) [C]: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA CHAIN (EC 2.7.7.6)	1	1
105	Cg0577	(rpoC) [C]: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA~ CHAIN (EC 2.7.7.6)	1	1
106	Cg0654	(rpsD) [C]: RIBOSOMAL PROTEIN S4	1	1
107	Cg0674	(rpsI) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S9	1	1
108	Cg0684	(papA) [C]: PROLYL AMINOPEPTIDASE A (EC 3.4.11.5)	1	1
109	Cg0703	(guaA) [C]: PUTATIVE GMP SYNTHASE (EC 6.3.5.2)	1	1
110	Cg0773	[C]: PUTATIVE EXODEOXYRIBONUCLEASE (EC 3.1.11.2)	1	1
111	Cg0859	[C]: conserved hypothetical protein	1	1
112	Cg0973	(pgi) [C]: GLUCOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.9)	1	1
113	Cg1012	[C]: CYCLOMALTODEXTRINASE (EC 3.2.1.54)	1	1
114	Cg1073	[C]: Predicted lactoylglutathione lyase	1	1
115	Cg1111	(eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)	1	1
116	Cg1171	[C]: Predicted GTPase	1	1
117	Cg1252	(fdxC) [C]: FERREDOXIN	1	1
118	Cg1375	[C]: PUTATIVE THIOREDOXIN	1	1
119	Cg1404	(gatA) [C]: PROBABLE GLU-TRNA (GLN) AMIDOTRANSFERASE (SUBUNIT A) (EC 6.3.5.-)	1	1
120	Cg1432	(ilvD) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)	1	1
121	Cg1458	[C]: 2-HYDROXYHEPTA-2,4-DIENE- 1,7-DIOATE ISOMERASE (EC 5.3.3.-)	1	1
122	Cg1698	(hisG) [C]: ATP PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (EC 2.4.2.17)	1	1
123	Cg1699	(hisE) [C]: PHOSPHORIBOSYL-ATP CYCLOHYDROLASE (EC 3.6.1.39)	1	1
124	Cg1809	[C]: DNA-directed RNA polymerase subunit K/omega	1	1
125	Cg2117	(ptsI) [C]: PHOSPHOENOLPYRUVATE:SUGAR PHOSPHOTRANSFERASE SYSTEM ENZYMEI (EC 2.7.3.9)	1	1
126	Cg2198	(map2) [C]: METHIONINE AMINOPEPTIDASE (EC 3.4.11.18)	1	1
127	Cg2283	[C]: conserved hypothetical protein	1	1
128	Cg2499	(glyS) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE--TRNA LIGASE) (EC 6.1.1.14)	1	1
129	Cg2558	[C]: related to aldose 1-epimerase	1	1
130	Cg2587	[C]: Phosphoglycerate dehydrogenase or related dehydrogenase	1	1
131	Cg2657	[MS]: putative membrane protein - fragment	1	1

Hit	Accession	Beschreibung	TOF/TOF	Hybrid
132	Cg2658	(rpi) [C]: POSSIBLE PHOSPHOPENTOSE ISOMERASE (EC 5.3.1.6)	1	1
133	Cg2662	(pepN) [C]: AMINOPEPTIDASE N (EC 3.4.11.7)	1	1
134	Cg2674	[C]: Alkylhydroperoxidase AhpD family core domain	1	1
135	Cg2782	(ftn) [C]: Ferritin-like protein	1	1
136	Cg2794	[C]: conserved hypothetical protein	1	1
137	Cg2874	(purC) [C]: PHOSPHORIBOSYLAMINOIMIDAZOLE-SUCCINOCARBOXAMIDE SYNTHASE (EC 6.3.2.6)	1	1
138	Cg2900	(ddh) [C]: MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.16)	1	1
139	Cg2927	(scrB) [C]: PUTATIVE SUCROSE-6-PHOSPHATE HYDROLASE (EC 3.2.1.26)	1	1
140	Cg2963	(clpC) [C]: PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEASE (HEAT SHOCK PROTEIN) (EC 3.-.-.-)	1	1
141	Cg3021	[C]: Peptidase M20/M25/M40 family	1	1
142	Cg3149	[C]: Aminotransferases class-I	1	1
143	Cg3307	(ssb) [C]: SINGLE-STRANDED DNA-BINDING PROTEIN	1	1
144	Cg3343	[M]: putative secreted membrane protein	1	1
145	Cg3427	(parA1) [C]: ATPases involved in chromosome partitioning	1	1

Tab. 9-5: nLC-MALDI-TOF/TOF, Purpirmembranen, Pepsin, 30 ppm.

Hit	Peptide	Accession	Beschreibung	TMH
1	81	Q9HM69	Cell surface glycoprotein	2
2	68	P02945	Bacteriorhodopsin	7
4	58	Q9HMI3	Dipeptide ABC transporter ATP-binding	0
3	57	Q9HMH9	Dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	0
5	47	Q9HP49	Putative uncharacterized protein	0
6	25	Q9HHR6	Adhesion protein	0
7	21	Q9HML5	Phosphate ABC transporter binding	0
11	10	Q9HR99	Halocyanin-like	0
8	10	Q9HRQ9	Putative uncharacterized protein	1
15	8	Q9HSA8	Bifunctional short chain isoprenyl diphosphate synthase	1
16	7	Q9HRR1	Putative uncharacterized protein	0
17	6	Q9HR04	Iron-binding protein	0
10	6	Q9HR20	Putative uncharacterized protein	0
12	6	Q9HRU5	Immunogenic protein	0
9	6	Q9HS10	Phosphate ABC transporter periplasmic phosphate-binding	0
23	5	P00791	Pepsin A	0
21	5	Q9HH34	Rhodopsin	7
20	5	Q9HPP3	Putative uncharacterized protein	1
19	4	Q9HHN1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	11
27	4	Q9HPD4	50S ribosomal protein L3P	0
14	4	Q9HQA6	Putative uncharacterized protein	1
13	4	Q9HRS0	Putative uncharacterized protein	0
38	3	Q48302	Precursor proteolipid	2
37	3	Q9HND9	H ⁺ -transporting ATP synthase subunit K	2
25	3	Q9HQP2	Transmembrane oligosaccharyl transferase	16
26	2	Q9HMK0	Putative uncharacterized protein	1
30	2	Q9HNI7	Possible phosphate binding protein	0
41	2	Q9HNR0	Protein-export membrane protein	6
28	2	Q9HPD1	50S ribosomal protein L2P	0
46	2	Q9HPJ9	Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 1	0
56	2	Q9HQ59	Putative uncharacterized protein	0
18	2	Q9HR50	Putative uncharacterized protein	1
49	2	Q9HR54	Putative uncharacterized protein	12
54	2	Q9HRT0	Putative uncharacterized protein	16

9.2 Peptidtabellen

In den Tabellen dieses Abschnitts sind die identifizierten Peptide einiger ausgewählter PMF- und nLC-MS/MS-Experimente aufgeführt. Neben den Peptidsequenzen enthalten die Tabellen auch die berechneten Peptidmassen und die Massenabweichung zur tatsächlichen Messung. In den PMF-Peptidlisten ist zusätzlich noch die Position des Peptids in der Proteinsequenz angegeben, in MS/MS-Peptidlisten der *Mascot-Ions Score*, der berechnete *GRAVY-Score* und der isoelektrische Punkt des Peptids.

Tab. 9-6A: MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Trypsin, 30 ppm.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
986,6277	0,0006	217	225	VGFGILLR
1119,523	-0,0031	31	41	GMGVSDPDAKK
1451,7079	0,0002	160	172	AESMRPEVASTFK
1467,7028	-0,0048	160	172	AESMRPEVASTFK
1819,9615	0,0011	160	175	AESMRPEVASTFKVLR
1835,9564	-0,0335	160	175	AESMRPEVASTFKVLR
1917,8592	-0,0172	228	248	AIFGEAEPEPSAGDAAAATS
2160,9924	0,0003	226	248	SRAIFGEAEPEPSAGDAAAATS
3328,8046	-0,1793	1	30	QAQITGRPEWIWLALGTALMGLGTLFLVK

Tab. 9-6B: MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 10 ppm.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
762,4024	-0,0069	227	233	RAIFGEA
788,3851	-0,0062	163	169	MRPEVAS
828,3919	0,0002	79	84	YWARYA
917,4277	0,001	161	168	ESMRPEVA
1070,5185	-0,0016	82	89	RYADWLFT
1126,5924	0,0014	6	14	GRPEWIWLA
1187,5645	-0,0108	68	78	MVPFGGEQNPI
1227,64	-0,0022	5	14	TGRPEWIWLA
1361,8031	-0,0121	169	180	STFKVLRNVTVV
1372,6623	-0,0028	227	239	RAIFGEAEPEPS
1381,703	0,0012	82	92	RYADWLFTTPL
1397,7456	-0,0139	3	13	QITGRPEWIWL
1468,7827	-0,0099	3	14	QITGRPEWIWLA
1498,7932	0,0004	5	17	TGRPEWIWLALGT
1615,7954	-0,0016	225	239	RSRAIFGEAEPEPS
1650,8518	0,003	1	14	QAQITGRPEWIWLA
1720,9552	0,001	82	95	RYADWLFTPLLLL
1727,8553	0,0062	29	44	VKGMGVSDPDAKKFYA
1739,9359	-0,0082	3	17	QITGRPEWIWLALGT
1801,8828	0,0054	79	92	YWARYADWLFTTPL
1901,0563	-0,013	175	190	RNVTVVLSAYPVVWL
1922,005	0,0056	1	17	QAQITGRPEWIWLALGT
1922,0183	-0,0077	113	132	GADGIMIGTGLVGALTKVYS
1997,9458	0,0107	68	84	MVPFGGEQNPIYWARYA
2020,1033	0,0031	82	98	RYADWLFTPLLLDLA

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
2329,243	-0,0005	218	239	GFGILLRSRAIFGEAEAPEPS
3229,6266	-0,009	49	78	VPAIAFTMYLSMLLGYGLTMVFPFGGEQNPI

Tab. 9-7A: MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 20 ppm, 60% *n*-Butanol.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
828,3919	0,0004	79	84	YWARYA
843,4854	0,0124	12	19	WLALGTAL
882,4521	-0,0078	60	67	MLLGYGLT
1125,603	-0,0025	192	203	GSEGAGIVPLNI
1133,6557	-0,0026	168	177	ASTFKVLRNV
1256,7241	0,0081	174	184	LRNVTVWLWSA
1262,7347	0,01	169	179	STFKVLRNVTV
1314,8136	0,0051	218	229	GFGILLRSRAI
1381,703	0,0013	82	92	RYADWLFTTPL
1625,8568	0,0237	145	157	MLYILYVLFPGFT
1718,9832	-0,0027	218	233	GFGILLRSRAIFGEA
1720,9552	0,0222	82	95	RYADWLFTTPLLLL
1801,8828	0,0021	79	92	YWARYADWLFTTPL
1855,994	-0,0298	18	35	ALMGLGTYFLVKGMGVS
2020,1033	0,0017	82	98	RYADWLFTTPLLLDLA
2074,1285	0,0231	118	136	MIGTGLVGALTKVYSYRFV
2141,135	0,0054	79	95	YWARYADWLFTTPLLLL
2141,1402	0,0002	104	126	DQGTILALVGADGIMIGTLVGA
2345,3399	-0,0012	82	101	RYADWLFTTPLLLDLALLV
2440,2883	-0,0087	102	127	DADQGTILALVGADGIMIGTLVGA
2494,3123	0,0159	133	152	YRFVWVAISTAAMLYILYVL
2765,5196	-0,0086	79	101	YWARYADWLFTTPLLLDLALLV
3148,697	-0,0068	6	34	GRPEWIWALGTALMGLGTYFLVKGMGV
3164,6919	0,0159	6	34	GRPEWIWALGTALMGLGTYFLVKGMGV
3249,7447	-0,008	5	34	TGRPEWIWALGTALMGLGTYFLVKGMGV
3265,7396	0,0085	5	34	TGRPEWIWALGTALMGLGTYFLVKGMGV
3271,8142	-0,058	192	223	GSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSAKVGFLIL
3287,8091	-0,0588	192	223	GSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSAKVGFLIL
3385,8247	0,0286	184	215	AYPVVWLGSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSA
3473,8884	-0,0226	189	221	WLIGSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSAKVGFL
3489,8694	-0,0227	208	240	FMVLDVSAKVGFLILLRSRAIFGEAEAPEPSA
3672,9564	0,0062	1	34	QAQITGRPEWIWALGTALMGLGTYFLVKGMGV
3688,9514	0,0033	1	34	QAQITGRPEWIWALGTALMGLGTYFLVKGMGV
3728,964	0,024	147	178	YILYVLFPGFTSKAESMRPEVASTFKVLRNVT
5011,5849	0,0343	125	167	GALTKVYSYRFVWVAISTAAMLYILYVLFPGFTSKAESMRPEV

Tab. 9-7B: MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 20 ppm, 60% Acetonitril.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
701,353	0,0008	163	168	MRPEVA
762,4024	-0,0009	227	233	RAIFGEA
828,3919	0,0015	79	84	YWARYA
857,4357	0,0036	52	58	IAFTMYL
873,4306	-0,0131	52	58	IAFTMYL
917,4277	-0,0012	161	168	ESMRPEVA
933,4226	0,0149	161	168	ESMRPEVA
948,5354	0,0011	206	213	LLFMVLDV
974,5913	0,0007	218	226	GFGLLIRS
1004,4711	0,0141	54	61	FTMYLSML
1029,5205	0,0004	20	28	MGLGTYFL
1062,6186	-0,0034	169	177	STFKVLRNV
1070,5185	0,0015	82	89	RYADWLFT
1126,5924	0,0024	6	14	GRPEWIWLA
1173,7234	-0,0119	171	180	FKVLRNVTVV
1227,64	-0,0006	5	14	TGRPEWIWLA
1274,7711	-0,0003	170	180	TFKVLNRNVTVV
1361,8031	0,0001	169	180	STFKVLRNVTVV
1372,6623	0,0024	227	239	RAIFGEAEPEPS
1381,703	-0,0016	82	92	RYADWLFTTPL
1397,7456	-0,011	3	13	QITGRPEWIWL
1498,7932	-0,0006	5	17	TGRPEWIWLALGT
1559,8593	0,0057	115	130	DGIMIGTGLVGALTKV
1615,7954	0,0181	225	239	RSRAIFGEAEPEPS
1650,8518	-0,0116	1	14	QAQITGRPEWIWLA
1718,9832	-0,0056	218	233	GFGLLIRSRAIFGEA
1720,9552	0,0134	82	95	RYADWLFTTLLLL
1725,876	0,0047	30	45	KGMGVSDPDAKKFYAI
1727,8553	0,0054	29	44	VKGMGVSDPDAKKFYA
1747,9985	-0,0173	169	183	STFKVLRNVTVVLWS
1770,9914	-0,0071	112	130	VGADGIMIGTGLVGALTKV
1804,9301	-0,0226	128	141	TKVYSYRFVWWAIS
1901,0563	-0,0198	175	190	RNVTVVLWSAYPVVWL
1922,0183	-0,0179	113	132	GADGIMIGTGLVGALTKVYS
2020,1033	-0,0033	82	98	RYADWLFTTLLLLDLA
2043,0427	-0,0015	141	158	STAAMLVLYLVLFPGFTS
2115,1306	0,0291	122	139	GLVGALTKVYSYRFVWWA
2178,2201	-0,013	169	187	STFKVLRNVTVVLWSAYPV
2312,2297	0,024	100	123	LVDADQGTILALVGADGIMIGTGL
2329,243	0,0011	218	239	GFGLLIRSRAIFGEAEPEPS
2571,3335	-0,0212	140	162	ISTAAMLVLYLVLFPGFTSKAES

Tab. 9-8: MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 10 ppm, "in-Gel"-Verdau.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
869,5011	-0,0062	40	46	KKFYAIT
897,5171	-0,006	199	206	VPLNIETL
917,4277	0,0011	161	168	ESMRPEVA
981,5495	0	194	203	EGAGIVPLNI
1126,5924	-0,0076	6	14	GRPEWIWLA
1156,6029	-0,0105	5	13	TGRPEWIWL
1187,5645	-0,0082	68	78	MVPFGGQNP
1227,64	-0,0023	5	14	TGRPEWIWLA
1259,6294	0,0053	56	66	MYLSMLLYGL

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
1274,7711	-0,0088	170	180	TFKVLNRNVTVV
1281,6526	-0,0082	204	214	ETLLFMVLDVS
1354,6769	-0,0072	35	46	SDPDAKKFYAIT
1361,8031	-0,0008	169	180	STFKVLNRNVTVV
1372,6623	-0,0009	227	239	RAIFGAEAEPEPS
1381,703	-0,0022	82	92	RYADWLFTTPL
1498,7932	0,0106	5	17	TGRPEWIWLALGT
1527,7781	-0,0012	102	117	DADQGTILALVGADGI
1615,7954	0,0047	225	239	RSRAIFGAEAEPEPS
1650,8518	0,004	1	14	QAQITGRPEWIWLA
1694,7974	0,0139	63	78	GYGLTMVPGGEQNPI
1718,9832	0,0094	218	233	GFGLLILRSRAIFGEA
1727,8553	0,0051	29	44	VKGMGVSDPDAKKFYA
1741,8709	-0,0032	30	45	KGMGVSDPDAKKFYAI
1802,9198	-0,0026	46	61	TTLVPAIAFTMYLSML
1841,9636	0,0106	223	239	LLRSRAIFGAEAEPEPS
1986,9283	0,0106	227	247	RAIFGAEAEPEPSAGDGAAAT
2329,243	-0,0001	218	239	GFGLLILRSRAIFGAEAEPEPS

Tab. 9-9: MALDI-TOF-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, manuell, negativer Reflektormodus.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
957,4556	0,0004	70	78	PFGGEQNPI
974,5913	-0,0003	218	226	GFGLLILRS
1014,6073	-0,0073	120	130	GTGLVGALTKV
1114,587	0	100	110	LVDADQGTILA
1126,5924	-0,0004	6	14	GRPEWIWLA
1156,6029	0,0001	5	13	TGRPEWIWL
1187,5645	-0,0005	68	78	MVPGGEQNPI
1203,5594	-0,0004	68	78	MVPGGEQNPI
1227,64	0,031	5	14	TGRPEWIWLA
1296,6979	0,0001	6	16	GRPEWIWLALG
1314,8136	0,0004	218	229	GFGLLILRSRAI
1361,8031	-0,0001	169	180	STFKVLNRNVTVV
1372,6623	-0,0003	227	239	RAIFGAEAEPEPS
1377,6354	-0,0004	70	81	PFGGEQNPIYWA
1381,703	0	82	92	RYADWLFTTPL
1397,7456	0,0004	3	13	QITGRPEWIWL
1409,7919	0,0001	188	201	VWLIGSEGAGIVPL
1468,7827	0,0003	3	14	QITGRPEWIWLA
1498,7932	-0,0002	5	17	TGRPEWIWLALGT
1514,8749	0,0001	86	98	WLFTTPLLLDLA
1607,8712	-0,0002	82	94	RYADWLFTTPLLL
1615,7954	-0,0004	225	239	RSRAIFGAEAEPEPS
1678,8025	-0,0005	63	78	GYGLTMVPGGEQNPI
1767,8369	0,0001	70	84	PFGGEQNPIYWARYA
1801,8828	0,0002	79	92	YWARYADWLFTTPL
1866,0714	-0,0004	93	110	LLLDLALLVDADQGTILA
2020,1033	-0,0003	82	98	RYADWLFTTPLLLDLA
2329,243	0	218	239	GFGLLILRSRAIFGAEAEPEPS

Tab. 9-10: MALDI-TOF-PMF, BSA, Elastase, 20 ppm.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
729,4246	0,0014	192	197	SARQL
816,4818	0,0009	427	434	RSLGKVG
834,4348	-0,0032	203	209	QKFGERA
927,4675	0,0006	335	341	RRHPEYA
935,4396	-0,0008	482	488	NRRPCFS
958,5243	-0,0149	194	200	RQLRCA
981,3709	0,0147	264	272	CDNQDTISS
1026,5359	-0,0001	335	342	RRHPEYAV
1034,5509	-0,0056	201	209	SIQKFGERA
1059,572	-0,0105	193	201	ARQLRCAS
1073,6346	-0,0168	217	225	RLSQKFPKA
1110,5346	-0,0167	398	407	GEYGFQNALI
1113,5679	-0,0069	335	343	RRHPEYAVS
1116,5934	-0,0104	193	201	ARQLRCAS
1141,5074	-0,0106	79	88	SLRETYGDMA
1147,635	-0,0071	201	210	SIQKFGERAL
1232,699	-0,0234	409	418	RYTRKVPQVS
1268,5707	0,0069	261	270	KYICDNQDTI
1448,814	-0,0199	217	228	RLSQKFPKAEFV
1531,8471	-0,0254	409	421	RYTRKVPQVSTPT
1560,8201	0,0005	143	154	RRHPYFYAPELL
1582,7549	0,0301	539	551	TEEQLKTVMENFV
1627,6541	-0,0107	241	253	HKECCHGDLECA
1631,8572	-0,0023	142	154	ARRHPYFYAPELL
1676,9144	-0,0239	198	212	RCASIQKFGERALKA
1711,8794	-0,0035	9	22	HRFKDLGEEHFKGL
1777,9727	-0,013	217	231	RLSQKFPKAEFVEVT
1788,9087	-0,0274	129	142	DEKKFWGKYLVEIA
1810,9479	-0,0045	9	23	HRFKDLGEEHFKGLV
1854,8054	0,0029	254	269	DDRADLAKYICDNQDT
1881,985	-0,0219	8	23	AHRFKDLGEEHFKGLV
1899,9288	0,0256	539	554	TEEQLKTVMENFVAFV
1902,9298	-0,0228	29	43	QYLQCCPFDEHVKLV
1915,9217	0,0182	329	343	FLYEYSRRHPEYAVS
1917,0427	-0,0219	176	192	CLLPKIETMREKVLASS
1924,0319	-0,0093	9	24	HRFKDLGEEHFKGLVL
1988,0248	0,0047	511	527	DICTLPDTEKQIKKQTA
2029,021	-0,0151	142	157	ARRHPYFYAPPELLYYA
2037,116	-0,0001	9	25	HRFKDLGEEHFKGLVLI
2059,1426	-0,0049	409	426	RYTRKVPQVSTPTLVEVS
2108,1531	0,002	9	26	HRFKDLGEEHFKGLVLIA
2116,0412	0,026	362	379	KDDPHACYSTVFDKLLKHL
2124,1116	-0,0007	6	23	EIAHRFKDLGEEHFKGLV
2137,0303	-0,0144	27	43	FSQYLQCCPFDEHVKLV
2174,9691	0,0016	388	405	KQNCQDFEKLGEYGFQNA
2179,1902	-0,0017	8	26	AHRFKDLGEEHFKGLVLIA
2184,0991	-0,0243	489	507	ALTPDETYVPKAFDEKLFT
2208,0674	-0,0129	26	43	AFSQYLQCCPFDEHVKLV
2237,1957	-0,0113	6	24	EIAHRFKDLGEEHFKGLVL
2288,0532	-0,0199	388	406	KQNCQDFEKLGEYGFQNAL
2315,1436	0,0276	272	290	SKLKECCDKPLLEKSHCIA
2327,9998	0,0459	250	269	LECADDRADLAKYICDNQDT
2342,2535	-0,0264	9	28	HRFKDLGEEHFKGLVLIASF
2350,2798	0,0064	6	25	EIAHRFKDLGEEHFKGLVLI
2376,226	0,0023	480	500	LVNRRPCFSALTPDETYVPKA
2383,9944	0,0164	241	260	HKECCHGDLECCADDRADLA
2421,3169	-0,0434	6	26	EIAHRFKDLGEEHFKGLVLIA
2440,0933	-0,0196	239	260	KVHKECCHGDLECCADDRADLA
2448,1862	0,0282	322	341	KDAFLGSFLYEYSRRHPEYA

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
2547,2547	-0,0163	322	342	KDAFLGSFLYEYSRRHPEYAV
2595,3115	0,0245	377	397	KHLVDEPQNLIKQNCDFEKL
2634,2867	0,0217	322	343	KDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVS
2660,3084	0,0446	457	479	NRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTES
2779,3487	-0,0335	105	128	HKDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKA
3018,3885	0,0341	53	80	CVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASL
3079,4267	0,0382	32	58	QQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADES
3278,625	-0,0332	533	560	KHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAA
3461,7244	0,0407	275	305	KECCDKPILLEKSHCIAEVEKDAIPENLPLT
3613,7547	0,0344	430	461	GKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCV
3902,0151	0,054	455	488	ILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFS

Tab. 9-11A: nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Trypsin, 30 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
986,6277	0,0279	72,2	VGFLILLR	2,0	10,6
1451,7078	0,0058	80,3	AESMRPEVASTFK	-0,5	6,5
1467,7028	-0,0013	31,3	AESMRPEVASTFK	-0,5	6,5
2276,0193	0,0074	57,5	SRAIFGAEAPEPSAGDGAATSD	-0,4	3,6

Tab. 9-11B: nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 30 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
713,4799	0,0194	28,4	LILLRS	1,8	10,6
731,4582	-0,0034	57,7	GFLGILL	2,6	6,0
741,4061	-0,0184	40,5	KFYAIT	0,5	9,3
762,4024	0,0147	50,5	RAIFGEA	0,4	6,3
781,4738	-0,0142	30,0	LYFLVK	1,6	9,3
799,4916	0,0054	38,5	LRNVTVV	1,1	10,6
829,4182	-0,005	54,7	LLVDADQG	0,3	3,5
835,4514	-0,0102	28,5	LFMVLDV	2,5	3,8
849,4344	0,0018	41,5	SRAIFGEA	0,2	6,3
857,4395	-0,0035	32,2	TGRPEWI	-1,0	6,3
866,5477	0,0032	68,0	PLLLDLA	2,0	3,8
869,4391	-0,0058	26,9	MYLSMLL	1,9	6,0
876,4745	-0,0128	39,0	WLFTTPL	0,9	6,0
887,4786	-0,0229	60,2	LVGADGIMI	1,8	3,8
887,5593	0,0039	62,2	GFLGILLR	1,7	10,6
914,4174	-0,0153	33,9	YADWLFT	0,3	3,8
917,4276	0,0001	37,9	ESMRPEVA	-0,8	4,3
930,4811	-0,0058	68,7	VWLGISEGA	0,9	3,9
957,4556	0,0095	73,4	PFGGEQNPI	-0,8	3,9
958,6215	-0,0058	44,1	KVGFGLILL	2,0	9,7
967,5954	-0,0053	64,7	TPLLLDLA	1,7	3,8
974,5913	-0,0059	63,7	GFLGILLRS	1,4	10,6
986,6277	-0,0034	74,8	VGFLILLR	2,0	10,6
999,4736	-0,0218	63,1	GYGLTMVPPF	0,9	6,0
1005,5356	-0,0018	37,5	RSRAIFGEA	-0,3	10,5
1015,4651	-0,0234	39,3	YADWLFTT	0,2	3,8
1032,44	-0,0186	80,2	FGAEAPEPS	-0,9	3,5
1043,5499	-0,0021	72,5	LLVDADQGTI	0,7	3,5

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pi
1055,5552	-0,0116	38,6	GRPEWIWL	-0,4	6,3
1062,6186	-0,0027	56,9	STFKVLRNV	0,2	11,7
1069,5709	-0,0048	45,9	RPEWIWLA	-0,2	6,3
1070,5185	0,0262	61,3	RYADWLFT	-0,3	6,2
1081,5556	0,0021	61,4	QITGRPEWI	-0,7	6,3
1098,5822	0,0027	50,6	QITGRPEWI	-0,7	6,3
1109,6485	-0,0142	84,1	GLGTYFLVK	1,2	9,3
1116,6907	0,0055	53,5	SAKVGFLILL	1,7	9,7
1126,5923	0,0188	51,6	GRPEWIWLA	-0,2	6,3
1130,6924	-0,0017	44,1	GFLILLRSR	0,8	12,5
1133,5142	-0,0284	69,3	GGEQNPIYWA	-0,9	3,9
1145,524	-0,0291	79,0	IFGEAEPEPS	-0,4	3,5
1156,6029	0,0072	56,0	TGRPEWIWL	-0,5	6,3
1156,634	0,0003	106,5	LLVDADQGTIL	0,9	3,5
1159,6635	-0,0098	84,1	MIGTGLVGALTK	1,1	9,7
1171,5662	-0,002	63,2	RYADWLFTT	-0,4	6,2
1173,7234	0,0033	18,7	FKVLRNVTVV	1,1	11,7
1187,5645	-0,025	93,9	MVPPFGGEQNPI	-0,1	3,9
1203,5594	-0,0231	81,4	MVPPFGGEQNPI	-0,1	3,9
1215,7115	-0,0097	62,7	FTTPLLLDLA	1,6	3,8
1216,5612	-0,0254	114,2	AIFGEAEPEPS	-0,2	3,5
1225,6019	-0,0216	73,1	YADWLFTTPL	0,4	3,8
1227,64	0,0274	56,7	TGRPEWIWLA	-0,2	6,3
1227,6711	-0,0296	113,1	LLVDADQGTILA	1,0	3,5
1239,6764	-0,0032	37,1	GRPEWIWLA	0,2	6,3
1242,5822	-0,0037	36,3	YWARYADWL	-0,6	6,2
1253,6292	-0,001	66,4	SDPDAKKFYAI	-0,7	6,3
1274,7711	0,0038	61,6	TFKVLRNVTVV	0,9	11,7
1280,6513	0,0046	72,7	QAQITGRPEWI	-0,7	6,3
1285,6302	-0,0035	30,3	RAIFGEAEPEP	-0,5	4,0
1289,6153	-0,0005	87,9	GGEQNPIYWAR	-1,2	6,3
1296,6979	-0,0092	43,9	GRPEWIWLAG	0,2	6,3
1296,7152	-0,019	35,0	ALMGLGTYFLV	1,9	6,0
1306,5982	-0,0055	47,0	PFGGEQNPIYW	-0,9	3,9
1314,8136	-0,0034	70,3	GFLILLRSRAI	1,2	12,5
1354,6769	0,008	75,7	SDPDAKKFYAIT	-0,7	6,3
1361,8031	0,0025	76,5	STFKVLRNVTVV	0,8	11,7
1372,6623	0,007	109,7	RAIFGEAEPEPS	-0,5	4,0
1377,6353	0,0072	93,1	PFGGEQNPIYWA	-0,6	3,9
1380,719	-0,0043	71,8	QITGRPEWIWL	-0,3	6,3
1381,703	0,0222	74,5	RYADWLFTTPL	-0,1	6,2
1397,7456	-0,0006	55,3	TGRPEWIWLAG	0,1	6,3
1409,7919	-0,0216	111,2	VWLIGSEGAGIVPL	1,3	3,9
1424,8101	-0,0047	43,6	ALMGLGTYFLVK	1,5	9,3
1443,6994	0,0002	83,6	RAIFGEAEPEPSA	-0,4	4,0
1451,7561	0,0015	88,0	QITGRPEWIWLA	-0,1	6,3
1452,7401	-0,0034	26,9	ARYADWLFTTPL	0,1	6,2
1459,6943	0,0019	126,7	SRAIFGEAEPEPS	-0,5	4,0
1468,7827	0,0161	61,8	QITGRPEWIWLA	-0,1	6,3
1469,7952	-0,0197	95,7	GLGTYFLVKMGV	1,2	9,3
1490,6983	0,0035	53,0	YWARYADWLFT	-0,3	6,2
1498,7932	0,0005	89,2	TGRPEWIWLAGT	0,0	6,3
1510,7668	-0,0007	99,5	GVSDPDAKKFYAIT	-0,3	6,3
1514,8748	0,0005	48,1	WLFTTPLLLDLA	1,5	3,8
1523,7157	0,0142	42,6	GGEQNPIYWARA	-1,0	6,5
1530,7314	-0,0007	74,9	SRAIFGEAEPEPSA	-0,4	4,0
1533,7365	0,0045	122,7	PFGGEQNPIYWAR	-0,9	6,3
1540,7596	-0,0073	61,1	MGVSDPDAKKFYAI	-0,1	6,3
1572,8545	-0,0113	38,0	GADGIMIGTGLVGALTK	0,9	6,2
1579,8147	0,0003	81,9	QAQITGRPEWIWL	-0,4	6,3
1591,746	0,0025	32,2	YWARYADWLFTT	-0,3	6,2

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1597,781	0,0021	49,2	GMGVSDPDAKKFYAI	-0,2	6,3
1607,7442	0,0055	64,3	MVPPFGGEQNPIYWA	-0,1	3,9
1607,8712	0,0066	77,8	RYADWLFTTPLL	0,5	6,2
1615,7954	0,002	108,0	RSRAIFGEAEAPEPS	-0,8	4,5
1629,9018	0,0073	64,6	DWLFTTPLLDDLA	1,2	3,5
1641,8072	-0,0103	95,7	MGVSDPDAKKFYAIT	-0,2	6,3
1650,8518	0,0179	106,1	QAQITGRPEWIWLA	-0,2	6,3
1671,923	-0,0202	91,6	GADGIMIGTGLVGALTKV	1,1	6,2
1678,8025	-0,0058	123,4	GYGLTMVPPFGGEQNPI	0,0	3,9
1686,8325	-0,0081	82,3	RSRAIFGEAEAPEPSA	-0,6	4,5
1694,7974	-0,0122	115,0	GYGLTMVPPFGGEQNPI	0,0	3,9
1698,8287	-0,0179	60,3	GMGVSDPDAKKFYAIT	-0,2	6,3
1718,9832	0,0013	57,5	GFLILLRSRAIFGEA	0,9	10,5
1720,9552	-0,003	101,0	RYADWLFTTPLL	0,7	6,2
1722,9093	0,0139	98,0	QITGRPEWIWLALGT	0,1	6,3
1739,9359	0,0064	70,5	QITGRPEWIWLALGT	0,1	6,3
1743,8064	-0,004	54,0	RAIFGEAEAPEPSAGDGA	-0,4	3,8
1763,8454	0,0049	102,9	MVPPFGGEQNPIYWAR	-0,4	6,3
1763,9359	-0,0147	21,2	QAQITGRPEWIWLA	0,0	6,3
1767,8369	0,002	79,9	PFGGEQNPIWARYA	-0,8	6,5
1779,8403	0,0041	59,9	MVPPFGGEQNPIYWAR	-0,4	6,3
1785,007	-0,0083	161,0	LVGADGIMIGTGLVGALTK	1,2	6,2
1801,8828	0,0019	76,1	YWARYADWLFTTPL	-0,1	6,2
1820,9574	-0,0413	49,8	QAQITGRPEWIWLALG	0,0	6,3
1826,9237	0,022	39,8	KGMGVSDPDAKKFYAIT	-0,4	9,2
1835,9669	-0,0083	95,0	SDPDAKKFYAITTLVPA	0,0	6,3
1841,9635	-0,0213	64,1	LLRSRAIFGEAEAPEPS	-0,3	4,5
1864,0022	0,0275	81,3	YADWLFTTPLLDDLA	1,1	3,5
1884,0754	0,0009	110,6	LVGADGIMIGTGLVGALTKV	1,4	6,2
1885,8806	-0,0095	28,5	RAIFGEAEAPEPSAGDAAA	-0,2	3,8
1922,005	-0,0042	101,8	QAQITGRPEWIWLALGT	0,0	6,3
1955,0476	-0,0069	58,1	ILLRSRAIFGEAEAPEPS	0,0	4,5
1993,0421	0	21,6	QAQITGRPEWIWLALGTA	0,1	6,3
2020,1033	-0,0051	127,6	RYADWLFTTPLLDDLA	0,7	4,1
2073,9603	-0,001	57,1	RAIFGEAEAPEPSAGDAAAATS	-0,2	3,8
2141,135	0,0009	20,2	YWARYADWLFTTPLL	0,6	6,2
2160,9923	-0,0089	48,2	SRAIFGEAEAPEPSAGDAAAATS	-0,3	3,8
2210,1484	-0,0082	44,2	AVEGVSAQITGRPEWIWLA	0,1	4,3
2317,0934	-0,0055	31,7	RSRAIFGEAEAPEPSAGDAAAATS	-0,4	4,2
2329,243	-0,0113	119,5	GFLILLRSRAIFGEAEAPEPS	0,3	4,5
2382,2327	0,0176	62,1	ALMGLGLTYFLVKMGVSDPDAK	0,6	6,3
2440,2831	-0,0004	75,3	YWARYADWLFTTPLLDDLA	0,6	4,1
2497,2066	0,01	37,9	GGEQNPIYARYADWLFTTPL	-0,5	4,2

Tab. 9-11C: nLC-ESI-LIT-Orbitrap, Bacteriorhodopsin, Elastase, 5 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
499,2278	-0,0003	27,3	APEPS	-1,1	3,9
505,29	-0,0009	32,2	GFGLI	2,1	6,0
542,27	-0,0003	29,1	QAQIT	-0,3	6,0
543,3268	-0,0004	32,6	DLALL	1,9	3,8
555,3632	0,0002	27,1	TPLL	1,8	6,0
568,3584	0,0003	27,8	AGIVPL	2,1	6,0
585,3737	0,0006	29,2	LLLDL	2,3	3,8
586,3479	0,0001	27,1	VWLIG	2,2	6,0
587,3643	0,0002	33,0	GALTKV	0,8	9,7

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
609,3196	-0,0005	25,4	AMLYI	2,1	6,0
612,3847	-0,0005	27,3	TLVPAI	2,0	6,0
613,3112	0,0002	29,0	FYAIT	1,4	6,0
621,356	-0,0002	27,2	LFMVL	3,3	6,0
626,4479	0,0002	14,5	LILLR	2,3	10,6
628,2704	0,0012	26,0	EAPEPS	-1,5	3,6
628,416	0	42,4	TILALV	2,9	6,0
642,3952	-0,0003	44,7	DLALLV	2,3	3,8
643,2709	0,0003	26,6	MYLSM	1,1	6,0
643,3541	0,0002	46,5	LVGADGI	1,4	3,8
653,3788	-0,0012	26,5	LYFLV	2,7	6,0
656,4109	0,0007	43,1	LLDLA	2,3	3,8
659,3643	0,0004	43,6	WLALGT	1,2	6,0
661,3224	0,0001	26,0	WWAIS	0,7	6,0
668,4473	0,0009	27,3	TPLLL	2,2	6,0
669,3737	0,001	24,4	YILYV	2,0	6,0
673,3799	0,0007	42,4	VWLIGS	1,7	6,0
674,4367	-0,0007	24,6	FGLILL	3,1	6,0
680,317	-0,0002	30,6	DWLFT	0,3	3,8
683,4218	0,0003	32,9	TLVPAIA	2,0	6,0
689,3782	0,0004	33,0	MIGTGLV	1,8	6,0
693,4061	0,0008	19,1	STFKVL	0,9	9,7
701,3959	-0,0007	38,2	NIETLL	0,7	3,9
703,3905	0,0001	28,0	TVVLWS	1,6	6,0
703,3938	-0,0001	41,1	LMGLGTL	1,7	6,0
704,317	0,0006	31,6	FFGFTS	1,1	6,0
705,3731	-0,0012	29,5	MIGTGLV	1,8	6,0
714,3588	-0,0003	39,2	FYAITT	1,1	6,0
714,3912	0	29,3	ALVGADGI	1,5	3,8
721,3435	-0,0004	25,9	WSAYPV	0,2	6,0
722,3673	-0,0008	41,7	FMVLDV	2,2	3,8
725,4476	-0,0005	24,7	PVVWLI	2,4	6,0
730,4225	-0,0009	34,0	TGLVGALT	1,4	6,0
731,4582	-0,0006	36,5	GFLILL	2,6	6,0
732,4534	0,0003	35,7	KVGFGLI	1,5	9,7
734,4401	0,0001	22,5	LLFMVL	3,4	6,0
738,3622	-0,0021	41,1	FMVLDV	2,2	3,8
739,3575	-0,0005	30,6	GYGLTMV	1,0	6,0
741,4061	0,0013	17,0	KFYAIT	0,5	9,3
754,4265	-0,0002	23,9	TLYFLV	2,1	6,0
755,4793	-0,0006	30,0	LDLALLV	2,5	3,8
756,355	-0,0002	41,7	MYLSML	1,6	6,0
759,3763	-0,0005	33,4	AVEGVSQA	0,5	3,9
762,4024	0,0014	40,2	RAIFGEA	0,4	6,3
769,4949	-0,0011	32,3	LLDLALL	2,5	3,8
769,4949	0,0002	44,4	LLLLDLA	2,5	3,8
769,4949	-0,0008	29,5	TTPLLLL	1,7	6,0
774,431	-0,0009	37,6	ALMGLGTL	1,7	6,0
781,3647	0,0002	38,8	DWLFTT	0,1	3,8
784,4695	-0,0013	34,2	TTLVPAIA	1,6	6,0
803,4905	0,0023	34,3	AKVGFGLI	1,6	9,7
820,4272	0,0013	22,2	FVWWAI	1,9	6,0
827,4753	0,001	26,9	LALVGADGI	1,7	3,8
828,3918	-0,0002	23,2	YWARYA	-0,7	9,2
831,4127	0,0001	44,2	WLGSEGA	0,5	3,9
834,4276	0,0011	34,0	LWSAYPV	0,7	6,0
835,4514	-0,0008	53,1	LFMVLDV	2,5	3,8
849,4783	0,0015	20,4	FLVKGMGV	1,5	9,7
851,4463	-0,0005	31,7	LFMVLDV	2,5	3,8
856,5382	0,0008	49,5	GLVGALTKV	1,4	9,7
859,444	0,0012	47,7	VWLIGSEG	0,8	3,9

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
866,5477	-0,0001	52,2	PLLLDLA	2,0	3,8
869,4391	0,0011	39,8	MYLSMLL	1,9	6,0
882,579	-0,0007	17,5	LLLDLALL	2,6	3,8
887,5593	-0,0002	56,6	GFGILLR	1,7	10,6
896,5583	-0,0003	44,4	TPLLLLDL	1,7	3,8
898,476	0,0013	30,0	GSEGAGIVPL	0,7	3,9
914,4174	0,0001	30,2	YADWLFT	0,3	3,8
916,5634	-0,0007	18,3	LFTTPLLL	1,9	6,0
917,4276	0,0004	41,5	ESMRPEVA	-0,8	4,3
922,4834	-0,0015	33,8	LFMVLDS	2,1	3,8
926,6025	0,0008	34,1	GLILLRSR	0,7	12,5
930,4811	0,0008	71,6	VWLGISEGA	0,9	3,9
932,5001	-0,0003	28,7	LG TALMGLGT	1,3	6,0
948,5354	0,0001	29,5	LLFMVLDV	2,6	3,8
953,4892	-0,0012	38,9	SMLLYGLT	1,1	6,0
957,4556	0,0001	56,8	PFGGEQNPI	-0,8	3,9
957,5859	0,0007	59,7	TGLVGALTKV	1,2	9,7
958,5157	0,0007	35,3	ALVGADGIMI	1,8	3,8
958,6215	0,0007	29,1	KVGFGLILL	2,0	9,7
959,548	0,0013	31,3	AYPVVWLI	1,8	6,0
964,5303	-0,0001	40,9	ETLLFMVL	2,0	3,9
967,5954	-0,0005	57,2	TPLLLLDLA	1,7	3,8
969,4841	-0,0016	34,4	SMLLYGLT	1,1	6,0
969,5358	0,0014	42,4	LYFLVKGM	1,4	9,3
974,5107	-0,0006	50,5	DGIMIGTGLV	1,4	3,8
974,5913	0,0001	44,6	GFGILLR	1,4	10,6
979,5048	0,0001	32,8	NIETLLFM	1,1	3,9
981,6474	0,0012	45,7	LLLDLALLV	2,8	3,8
984,5354	0,0008	30,1	AMLYILYV	2,2	6,0
986,6277	0,0006	81,9	VGFGILLR	2,0	10,6
991,5015	0,0009	67,2	DWLFTTPL	0,4	3,8
1001,5029	0,0024	32,7	VDADQGTILA	0,5	3,5
1012,5416	-0,0005	47,1	YFLVKMGV	1,2	9,3
1014,6074	0,0008	54,3	GTGLVGALTKV	1,0	9,7
1029,6586	0,0006	43,9	AKVGFGLILL	2,0	9,7
1031,5685	0,0002	82,5	MIGTGLVGALT	1,6	6,0
1032,44	-0,0005	35,9	FGAEAEPEPS	-0,9	3,5
1032,5856	-0,0005	34,2	TTLVPAIAFT	1,5	6,0
1043,5499	0,0007	81,0	LLVDADQGTI	0,7	3,5
1045,5478	0,0005	33,3	LVGADGIMIGT	1,4	3,8
1045,5842	-0,002	28,8	LG TALMGLGTL	1,5	6,0
1055,5552	0,0006	33,4	GRPEWIWL	-0,4	6,3
1062,5386	0,0013	33,7	ADWLFTTPL	0,5	3,8
1067,6227	-0,0026	27,7	GIVPLNIETL	1,1	3,9
1070,5185	0,0001	43,5	RYADWLFT	-0,3	6,2
1078,5733	0,0001	32,0	NIETLLFMV	1,5	3,9
1094,5682	-0,0006	47,8	NIETLLFMV	1,5	3,9
1096,5661	-0,0014	48,8	MLLYGLTMV	1,7	6,0
1097,5216	-0,0002	27,3	GYGLTMVPFGG	0,7	6,0
1102,5693	-0,0004	32,8	GADGIMIGTGLV	1,2	3,8
1103,6015	-0,0003	26,5	AYPVVWLIGS	1,4	6,0
1109,6485	-0,0001	31,1	GLGTLYFLVK	1,2	9,3
1112,561	-0,0017	26,5	MLLYGLTMV	1,7	6,0
1114,587	-0,0012	56,5	DADQGTILALV	0,8	3,5
1114,587	0,0015	34,2	LVDADQGTILA	0,8	3,5
1116,5849	-0,0015	32,8	ALVGADGIMIGT	1,4	3,8
1116,6907	0,0008	48,0	SAKVGFLILL	1,7	9,7
1117,5552	0,0017	48,8	FTMYLSMLL	1,7	6,0
1125,6256	-0,0005	43,9	LYFLVKMGV	1,5	9,3
1126,5923	0,0027	40,8	GRPEWIWLA	-0,2	6,3
1126,6023	0,0004	45,3	PVVWLIGSEGA	1,0	3,9

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1130,6924	0,0008	15,7	GFGILLRSR	0,8	12,5
1133,5501	-0,0012	33,9	FTMYLSMLL	1,7	6,0
1133,6121	0,0015	67,2	TVVLWSAYPV	1,3	6,0
1145,524	-0,0008	85,9	IFGEAEAPEPS	-0,4	3,5
1152,6179	0,0026	36,7	PDAKKFYAIT	-0,4	9,3
1156,634	0,0011	105,9	LLVDADQGTIL	0,9	3,5
1159,6635	0,0006	89,8	MIGTGLVGALTK	1,1	9,7
1166,67	0,0004	81,2	GLGTLYFLVKG	1,0	9,3
1171,5662	-0,0007	29,1	RYADWLFTT	-0,4	6,2
1173,7234	0,0008	19,9	FKVLRNVTVV	1,1	11,7
1180,7067	-0,0002	38,5	GIVPLNIETLL	1,4	3,9
1183,5981	0,0003	68,8	SMLLGYGLTMV	1,4	6,0
1185,687	0,001	23,3	LRNVTVVLWS	1,0	10,6
1187,5645	0,0003	76,5	MVPPFGGEQNPI	-0,1	3,9
1191,6573	0,001	56,6	NIETLLFMVL	1,7	3,9
1199,593	-0,001	36,2	SMLLGYGLTMV	1,4	6,0
1199,655	0,0025	61,8	VWLVIGSEGAGIV	1,4	3,9
1215,6533	0,0016	76,5	DGIMIGTGLVGAL	1,4	3,8
1215,7115	0,0012	45,0	FTTPLLLDLA	1,6	3,8
1216,5612	0,0011	78,8	AIFGEAEAPEPS	-0,2	3,5
1217,6696	0,001	38,7	DWLFTTPLLL	1,1	3,8
1225,6019	0,0005	62,8	YADWLFTTPL	0,4	3,8
1225,6781	0,001	36,5	LMGLGTLYFLV	1,9	6,0
1227,64	0,0006	29,7	TGRPEWIWLA	-0,2	6,3
1227,6711	0,0011	101,3	LLVDADQGTILA	1,0	3,5
1241,673	0,0006	28,0	LMGLGTLYFLV	1,9	6,0
1242,6456	0,0014	60,0	DADQGTILALVGA	0,7	3,5
1253,6292	0,0009	27,5	SDPDAKKFYAI	-0,7	6,3
1258,7319	-0,0012	106,6	MIGTGLVGALTKV	1,4	9,7
1274,7268	-0,002	92,6	MIGTGLVGALTKV	1,4	9,7
1274,7711	0,001	60,7	TFKVLNRNVTVV	0,9	11,7
1280,6513	0,0013	34,8	QAQITGRPEWI	-0,7	6,3
1285,7316	0,0007	56,2	TILALVGADGIMI	2,0	3,8
1288,6122	-0,0019	39,0	TMVPPFGGEQNPI	-0,2	3,9
1296,7152	-0,0002	55,9	ALMGLGTLYFLV	1,9	6,0
1297,7104	-0,0027	31,0	GLGTLYFLVKG	1,1	9,3
1301,7265	0,0023	51,7	TILALVGADGIMI	2,0	3,8
1310,7234	0,0009	61,4	WLVIGSEGAGIVPL	1,1	3,9
1312,7101	-0,0016	32,1	ALMGLGTLYFLV	1,9	6,0
1314,7217	0,0011	79,1	LVGADGIMIGTGLV	1,6	3,8
1316,701	0,0006	72,3	DGIMIGTGLVGALT	1,3	3,8
1326,7395	0,0017	40,7	LVDADQGTILALV	1,3	3,5
1330,7167	-0,0007	34,1	LVGADGIMIGTGLV	1,6	3,8
1330,7537	0,0026	46,6	DWLFTTPLLL	1,3	3,8
1338,7257	-0,0015	31,0	TLVPAIAFTMYL	1,7	6,0
1341,714	0,0028	81,6	DQGTILALVGADGI	0,9	3,5
1343,7119	0,001	26,8	GADGIMIGTGLVGAL	1,3	3,8
1345,7434	0,0014	55,7	LWSAYPVVWLI	1,5	6,0
1353,773	-0,0002	40,1	LMGLGTLYFLVK	1,5	9,3
1354,6769	0,0002	44,3	SDPDAKKFYAIT	-0,7	6,3
1360,6771	0,0003	67,0	MYLSMLLGYGLT	1,2	6,0
1360,7027	-0,0016	37,0	AYPVVWLVIGSEGA	0,9	3,9
1361,8031	-0,0009	35,2	STFKVLRNVTVV	0,8	11,7
1371,7432	-0,0003	40,4	LVGADGIMIGTGLVG	1,5	3,8
1372,6623	-0,0014	87,2	RAIFGEAEAPEPS	-0,5	4,0
1377,6353	-0,0016	48,6	PFGGEQNPIYWA	-0,6	3,9
1381,703	0,0007	43,5	RYADWLFTTPL	-0,1	6,2
1397,7456	-0,0016	43,4	QITGRPEWIWL	-0,3	6,3
1397,7629	0,0002	37,9	TALMGLGTLYFLV	1,7	6,0
1401,6962	-0,0012	45,1	LTMVPPFGGEQNPI	0,2	3,9
1405,7527	0,0014	30,5	NIETLLFMVLDV	1,5	3,6

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1409,7191	-0,001	32,6	GVSDPDAKKFYAI	-0,3	6,3
1409,7919	0,0011	57,6	VWLGSEGAGIVPL	1,3	3,9
1421,7476	-0,0008	35,4	NIETLLFMVLDV	1,5	3,6
1424,8101	0,0005	70,5	ALMGLGTLVFLVK	1,5	9,3
1427,6755	0,0019	42,7	MGVSDPDAKKFYA	-0,5	6,3
1439,8235	0,001	106,6	LLVDADQGTILALV	1,4	3,5
1440,8051	0,0007	77,3	ALMGLGTLVFLVK	1,5	9,3
1442,7803	0,0042	26,7	LVGADGIMIGTGLVGA	1,5	3,8
1444,7596	0,0014	83,2	GADGIMIGTGLVGALT	1,2	3,8
1453,8003	-0,0031	51,1	GLGTLVFLVKGGMV	1,2	9,3
1455,7245	0,0003	31,5	SDPDAKKFYAITT	-0,7	6,3
1455,7821	0,001	35,4	DLALLVDADQGTIL	0,9	3,3
1458,7752	0,0015	36,3	LVGADGIMIGTGLVGA	1,5	3,8
1459,6943	0,0006	106,9	SRAIFGEAEPEPS	-0,5	4,0
1467,8185	0,0011	37,7	LLLDLALLVDADQG	1,2	3,3
1468,7773	-0,0019	42,6	GSEGAGIVPLNIETL	0,5	3,6
1468,7827	0,0001	44,6	QITGRPEWIWLA	-0,1	6,3
1481,8316	-0,0002	60,1	ALMGLGTLVFLVKG	1,3	9,3
1489,7969	0,0004	57,7	LWSAYPVVWLIGS	1,2	6,0
1492,7847	0,0012	34,4	NIETLLFMVLDVS	1,3	3,6
1498,7932	-0,0001	54,0	TGRPEWIWLAGT	0,0	6,3
1508,7796	0,0006	28,5	NIETLLFMVLDVS	1,3	3,6
1510,7668	-0,0025	41,1	GVSDPDAKKFYAIT	-0,3	6,3
1513,8174	-0,0003	43,9	ALVGADGIMIGTGLVGA	1,5	3,8
1533,7365	0,0007	58,9	PFGGEQNPIYWAR	-0,9	6,3
1540,7596	0,0013	43,2	MGVSDPDAKKFYAI	-0,1	6,3
1543,8644	0,0001	64,5	DGIMIGTGLVGALTKV	1,1	6,2
1559,8593	0,0004	42,2	DGIMIGTGLVGALTKV	1,1	6,2
1567,8684	0,0006	37,1	LGTALMGLGTLVFLV	1,7	6,0
1567,8821	0,0007	38,0	LLVDADQGTILALVGA	1,3	3,5
1571,8593	-0,0018	30,3	LVGADGIMIGTGLVGAL	1,7	3,8
1583,8633	-0,0003	35,7	LGTALMGLGTLVFLV	1,7	6,0
1607,7442	-0,0028	71,8	MVPFGEQNPIYWA	-0,1	3,9
1615,9086	-0,0007	40,8	LRNVTVVLSAYPV	0,9	9,3
1623,7392	-0,0023	40,6	MVPFGEQNPIYWA	-0,1	3,9
1629,9018	-0,0002	33,1	DWLFTTPLLDDLA	1,2	3,5
1636,9188	0,0013	27,9	VWLGSEGAGIVPLNI	1,2	3,9
1638,8882	0,0013	29,4	QITGRPEWIWLAG	0,1	6,3
1641,8072	-0,0021	32,7	MGVSDPDAKKFYAIT	-0,2	6,3
1644,928	0,0013	48,6	TVVLSAYPVVWLI	1,8	6,0
1656,9121	0,0008	73,1	LVGADGIMIGTGLVGALT	1,5	3,8
1671,923	0,0006	72,2	GADGIMIGTGLVGALTKV	1,1	6,2
1675,861	0,0001	52,8	LWSAYPVVWLIGSEG	0,8	3,9
1678,8025	-0,0004	62,4	GYGLTMVPFGEQNPI	0,0	3,9
1681,9502	-0,0008	23,9	LLLDLALLVDADQGTI	1,3	3,3
1687,9179	-0,0007	59,7	GADGIMIGTGLVGALTKV	1,1	6,2
1698,8287	0	45,5	GMGVSDPDAKKFYAIT	-0,2	6,3
1720,9552	-0,0025	39,3	RYADWLFTTPLLLL	0,7	6,2
1722,9093	-0,0007	28,0	QITGRPEWIWLAGT	0,1	6,3
1727,9492	0,0001	27,3	ALVGADGIMIGTGLVGALT	1,5	3,8
1738,9717	0	48,9	DLALLVDADQGTILALV	1,3	3,3
1739,9359	-0,0013	55,4	QITGRPEWIWLAGT	0,1	6,3
1742,8549	0,0009	46,9	MGVSDPDAKKFYAITT	-0,2	6,3
1746,8981	0,0009	100,4	LWSAYPVVWLIGSEGA	0,8	3,9
1768,962	0,0012	45,0	ALMGLGTLVFLVKGGMV	1,4	9,3
1771,9026	0,0009	68,6	DADQGTILALVGADGIMI	0,9	3,3
1784,9569	0,0006	40,7	ALMGLGTLVFLVKGGMV	1,4	9,3
1785,007	0,0008	54,0	LVGADGIMIGTGLVGALTK	1,2	6,2
1791,8866	0,0017	41,1	LYGLTMVPFGEQNPI	0,2	3,9
1801,8828	-0,0013	35,2	YWARYADWLFTTPL	-0,1	6,2
1826,9237	-0,0027	51,7	KGMGVSDPDAKKFYAIT	-0,4	9,2

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1835,9669	0,0033	32,0	SDPDAKKFYAITTLVPA	0,0	6,3
1840,0135	0,0002	47,9	AYPVVWLVIGSEGAGIVPL	1,2	3,9
1845,9665	-0,0004	38,6	VLWSAYPVVWLVIGSEGA	1,0	3,9
1853,0146	0,001	123,6	LLVDADQGTILALVGADGI	1,2	3,3
1856,0441	-0,0005	77,4	ALVGADGIMIGTGLVGALTK	1,3	6,2
1858,0393	0,0002	50,3	NVTVVWLVWSAYPVVWLI	1,6	6,0
1864,0022	0,0014	62,1	YADWLFSTPLLLDLA	1,1	3,5
1866,0714	0	75,8	LLLDLALLVDADQGTILA	1,4	3,3
1867,0091	0,0019	47,0	VWLVIGSEGAGIVPLNIET	0,9	3,6
1884,0754	-0,001	130,4	LVGADGIMIGTGLVGALTKV	1,4	6,2
1885,0635	0,0024	83,1	GIVPLNIETLLFMVLDV	1,7	3,6
1900,0704	-0,0026	79,2	LVGADGIMIGTGLVGALTKV	1,4	6,2
1911,0003	-0,0018	34,7	GVSQAQITGRPEWIWLA	0,0	6,3
1955,1125	-0,0022	105,1	ALVGADGIMIGTGLVGALTKV	1,4	6,2
1955,1383	-0,003	29,8	DWLFSTPLLLDLALLV	1,7	3,5
1971,1075	-0,0001	83,1	ALVGADGIMIGTGLVGALTKV	1,4	6,2
1972,0955	0,0003	52,6	GIVPLNIETLLFMVLDVS	1,5	3,6
1980,0932	0,0001	47,0	VWLVIGSEGAGIVPLNIETL	1,0	3,6
2020,1033	-0,0011	85,3	RYADWLFSTPLLLDLA	0,7	4,1
2036,0111	-0,0008	66,7	MLLGYGLTMVFPFGGEQNPI	0,5	3,9
2046,0826	0,0012	43,8	TVVWLVWSAYPVVWLVIGSEGA	1,1	3,9
2052,006	-0,0032	42,7	MLLGYGLTMVFPFGGEQNPI	0,5	3,9
2072,1228	0,0001	30,7	GSEGAGIVPLNIETLLFMVL	1,2	3,6
2097,1391	0,0022	59,8	LLVDADQGTILALVGADGIMI	1,4	3,3
2098,9823	-0,0007	49,7	GYGLTMVFPFGGEQNPIYWA	0,0	3,9
2113,1341	-0,0021	66,2	LLVDADQGTILALVGADGIMI	1,4	3,3
2114,9772	-0,0012	54,0	GYGLTMVFPFGGEQNPIYWA	0,0	3,9
2123,0431	-0,002	63,9	SMLLGYGLTMVFPFGGEQNPI	0,4	3,9
2123,0973	0,0017	35,4	MGVSDPDAKKFYAITTLVPA	0,2	6,3
2127,2245	-0,001	70,4	LRNVTVVWLVWSAYPVVWLI	1,4	9,3
2139,0381	-0,0026	49,3	SMLLGYGLTMVFPFGGEQNPI	0,4	3,9
2141,135	0,0006	42,7	YWARYADWLFSTPLLL	0,6	6,2
2189,2388	-0,0006	65,1	YADWLFSTPLLLDLALLV	1,5	3,5
2226,2089	0,0006	39,0	LWSAYPVVWLVIGSEGAGIVPL	1,1	3,9
2274,2044	0,0003	54,1	TLVPAIAFTMYLSMLLGYGLT	1,4	6,0
2329,243	-0,0023	28,8	GFLILLRSRAIFGEAEPEPS	0,3	4,5
2440,2831	-0,0008	52,3	YWARYADWLFSTPLLLDLA	0,6	4,1
2528,3791	-0,0018	59,3	LRNVTVVWLVWSAYPVVWLVIGSEGA	0,9	6,3
2839,5623	0,0008	26,8	DWLFSTPLLLDLALLVDADQGTILA	1,1	3,2
3051,7148	-0,0057	25,8	DWLFSTPLLLDLALLVDADQGTILALV	1,3	3,2
3158,7267	-0,0005	37,6	RYADWLFSTPLLLDLALLVDADQGTIL	0,8	3,7
3229,7638	-0,0069	39,0	RYADWLFSTPLLLDLALLVDADQGTILA	0,8	3,7

Tab. 9-12: nLC-MALDI-TOF/TOF, Cytochrom c-Oxidase I, Elastase, 30 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
765,4061	0,003	50,5	PFFGIVS	1,6	6,0
839,433	0,0014	33,5	KFFNWV	0,3	9,7
890,4651	0,0028	39,4	GFHGTFLI	1,2	7,6
921,4708	0,0117	37,1	WRYGELV	-0,4	6,3
995,5076	0,0029	60,6	SPPLDFHLA	0,2	5,3
997,5022	0,0029	44,7	KFFNWVGT	0,1	9,7
1118,5259	0,0006	44,8	YFWFPKMT	-0,1	9,3
1123,5774	-0,0039	57,1	NGGSLWQHL	-0,1	7,6
1185,5641	0,0051	58,5	FELHYPHMI	0,0	6,5
1201,559	0,0025	44,1	FELHYPHMI	0,0	6,5

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1222,6387	-0,0059	40,2	LYGTPIVWGFA	1,1	6,0
1274,6158	0,004	45,9	GVYFWFKMT	0,3	9,3
1297,6125	0,005	77,1	HSPGLGSDMWIV	0,2	5,3
1390,7609	-0,0022	74,2	RAELFTPGLQFL	0,4	6,3
1395,646	-0,0138	55,4	GFLTPGGAADFGWT	0,3	3,8
1453,7024	0,0042	67,5	HSPGLGSDMWIVGV	0,5	5,3
1467,7663	-0,0008	62,2	FPRLNAFGFWIT	0,6	10,6
1616,8311	0,0026	87,1	LYDRKLGGLYDPA	-0,7	7,5
1725,8911	-0,0077	44,4	APRVDGHVAPQRPEPT	-1,1	7,6
1751,7937	0,005	92,9	SNEQFNQLFMHGTV	-0,5	5,4
1824,9595	-0,0056	58,9	VAPRVDGHVAPQRPEPT	-0,8	7,6
969,3981	-0,0008	47,0	YFGNDHFA	-0,6	5,3
1156,5149	0,0044	76,9	AGEYKNFNTN	-1,6	6,3
1269,5989	-0,0056	70,6	LAGEYKNFNTN	-1,1	6,3
1427,6681	0,0007	120,3	LAGEYKNFNTNSA	-0,8	6,3
1470,6204	0,0032	86,1	YFGNDHFAEFAPG	-0,4	4,2
1493,8354	-0,0068	69,8	DGAPQVLPFGKRL	-0,3	9,7
1550,8569	-0,0079	91,1	DGAPQVLPFGKRLG	-0,3	9,7
1606,9195	-0,0303	38,2	LLDGAPQVLPFGKRL	-0,1	9,7
1663,8066	-0,0053	65,7	HRTLAGEYKNFNTN	-1,5	9,3
1720,0036	-0,0048	80,4	LLDGAPQVLPFGKRL	0,2	9,7
1777,025	-0,008	81,0	LLDGAPQVLPFGKRLG	0,2	9,7
1821,8758	-0,0093	47,5	HRTLAGEYKNFNTNSA	-1,2	9,3
1859,9305	-0,0015	43,7	SLGEFTRVFEYDSLIV	0,4	3,9
1890,1091	-0,0122	43,0	ILLDGAPQVLPFGKRLG	0,4	9,7
1960,9966	-0,0005	43,5	SSDLPIELRDNRFGSK	-1,2	6,5
2118,2062	-0,0568	58,3	LLDGAPQVLPFGKRLGRNA	-0,2	11,5
2448,0829	0,0119	56,2	EAEVEGRSNTEREAFDYFDKG	-1,5	4,0
2586,1737	0,0021	110,2	YFGNDHFAEFAPGMSIDDALEI	-0,2	3,9

Tab. 9-13A: nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 30 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
762,4024	-0,0085	44,9	RAIFGEA	0,4	7,0
876,4745	-0,025	39,1	WLFTTPL	0,9	6,0
887,5593	-0,0041	42,2	GFLILLR	1,7	11,0
957,4556	-0,0083	64,0	PFGGEQNPI	-0,8	3,3
974,5913	-0,0048	49,2	GFLILLRS	1,4	11,0
1032,44	-0,0186	80,5	FGAEAPEPS	-0,9	3,0
1070,5185	-0,0003	48,2	RYADWLFT	-0,3	6,7
1081,5556	-0,006	54,3	QITGRPEWI	-0,7	7,0
1098,5822	-0,0051	49,5	QITGRPEWI	-0,7	7,0
1126,5923	0,0021	39,8	GRPEWIWLA	-0,2	7,0
1156,6029	-0,0071	43,6	TGRPEWIWL	-0,5	7,0
1171,5662	-0,0056	43,1	RYADWLFTT	-0,4	6,7
1187,5645	-0,0258	83,6	MVPFGGEQNPI	-0,1	3,3
1203,5594	-0,024	52,7	MVPFGGEQNPI	-0,1	3,3
1215,7115	-0,034	49,6	FTTPLLLDLA	1,6	3,1
1227,6711	-0,029	41,1	LLVDADQGTILA	1,0	2,9
1227,64	0,0114	52,0	TGRPEWIWLA	-0,2	7,0
1280,6513	0,0014	75,1	QAQITGRPEWI	-0,7	7,0
1314,8136	-0,0034	70,7	GFLILLRSRAI	1,2	12,4
1354,6769	-0,0121	66,3	SDPDAKKFYAIT	-0,7	6,7
1361,8031	-0,0018	75,7	STFKVLRNVTVV	0,8	11,2
1372,6623	0,0123	107,9	RAIFGEAEAPEPS	-0,5	4,0
1377,6353	-0,0127	85,7	PFGGEQNPIYWA	-0,6	3,3

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1443,6994	0,0001	78,3	RAIFGEAEAPEPSA	-0,4	4,0
1451,7561	0,0015	88,5	QITGRPEWIWLA	-0,1	7,0
1459,6943	0,0012	104,9	SRAIFGEAEAPEPS	-0,5	4,0
1468,7827	-0,0014	52,1	QITGRPEWIWLA	-0,1	7,0
1498,7932	-0,0028	71,8	TGRPEWIWLALGT	0,0	7,0
1579,8147	0,001	61,3	QAQITGRPEWIWL	-0,4	7,0
1615,7954	0,0011	94,6	RSRAIFGEAEAPEPS	-0,8	4,6
1650,8518	0,0103	90,8	QAQITGRPEWIWLA	-0,2	7,0
1678,8025	-0,0138	113,0	GYGLTMVPPFGGEQNPI	0,0	3,3
1694,7974	-0,0112	65,5	GYGLTMVPPFGGEQNPI	0,0	3,3
1720,9552	0,0094	84,0	RYADWLFTTPLL	0,7	6,7
1801,8828	0,0103	72,2	YWARYADWLFTTPL	-0,1	6,6
1922,005	0,0022	98,0	QAQITGRPEWIWLALGT	0,0	7,0
2020,1033	0,0039	122,4	RYADWLFTTPLLDDLA	0,7	3,9
2329,243	0,0095	119,9	GFGILLRSRAIFGEAEAPEPS	0,3	4,6
2440,2831	-0,0004	75,8	YWARYADWLFTTPLLDDLA	0,6	3,9

Tab. 9-13B: OGE/nLC-MALDI-TOF/TOF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 30 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
731,4582	-0,0008	53,1	GFGILL	2,6	6,0
857,4357	-0,0019	40,0	IAFTMYL	1,8	5,9
887,5593	-0,0011	60,2	GFGILLR	1,7	11,0
917,4276	0,0063	38,2	ESMRPEVA	-0,8	4,3
930,4811	-0,0063	63,0	VWLVIGSEGA	0,9	3,3
957,4556	0,0072	67,3	PFGGEQNPI	-0,8	3,3
958,6215	-0,0028	62,7	KVGFGLILL	2,0	9,7
981,5535	-0,0009	41,7	GLGTLYFLV	1,7	5,9
1005,5356	-0,005	48,4	RSRAIFGEA	-0,3	10,9
1029,6586	-0,0062	59,1	AKVGFGLILL	2,0	9,7
1070,5185	0,0042	50,0	RYADWLFT	-0,3	6,7
1116,6907	-0,0046	79,9	SAKVGFLILL	1,7	9,7
1126,5923	-0,0037	47,5	GRPEWIWLA	-0,2	7,0
1133,5142	-0,0096	53,2	GGEQNPIYWA	-0,9	3,3
1156,6029	-0,0239	42,7	TGRPEWIWL	-0,5	7,0
1171,5662	0,0024	57,9	RYADWLFTT	-0,4	6,7
1177,6707	-0,0075	52,3	GTGLVGALTKVY	0,8	9,5
1187,5645	-0,0075	71,6	MVPPFGGEQNPI	-0,1	3,3
1203,5594	-0,0068	78,4	MVPPFGGEQNPI	-0,1	3,3
1227,64	0,0088	61,1	TGRPEWIWLA	-0,2	7,0
1253,6292	0,0064	52,1	SDPDAKKFYAI	-0,7	6,7
1268,619	0,0025	58,9	RYADWLFTTP	-0,5	6,7
1280,6513	0,0041	41,9	QAQITGRPEWI	-0,7	7,0
1289,6153	0,0054	47,0	GGEQNPIYWAR	-1,2	6,9
1296,7152	-0,0008	40,9	ALMGLTLYFLV	1,9	5,9
1330,786	-0,0034	68,3	DVSAKVGFGLILL	1,5	6,7
1340,7241	0,0018	48,1	ITGRPEWIWLA	0,2	7,0
1354,6769	0	71,5	SDPDAKKFYAIT	-0,7	6,7
1361,8031	0	60,4	STFKVLRNVTVV	0,8	11,2
1372,6623	-0,0017	110,9	RAIFGEAEAPEPS	-0,5	4,0
1377,6353	-0,0016	87,5	PFGGEQNPIYWA	-0,6	3,3
1381,703	0,0396	77,4	RYADWLFTTPL	-0,1	6,7
1397,7456	-0,0018	68,8	GRPEWIWLALGT	0,1	7,0
1409,7191	0,0023	62,7	GVSDPDAKKFYAI	-0,3	6,7
1421,7952	-0,0044	39,6	MIGTGLVGALTKVY	1,2	9,5
1451,7561	-0,0019	53,8	QITGRPEWIWLA	-0,1	7,0

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1452,7401	-0,0061	45,6	ARYADWLFTTPL	0,1	6,7
1455,7245	0,0012	44,4	SDPDAKKFYAITT	-0,7	6,7
1468,7827	0,0003	51,9	QITGRPEWIWLA	-0,1	7,0
1490,6983	-0,0016	39,0	YWARADWLFT	-0,3	6,6
1494,7871	-0,0034	62,9	RYADWLFTTPLL	0,2	6,7
1498,7932	-0,0249	85,8	TGRPEWIWLALGT	0,0	7,0
1510,7668	0,0007	71,9	GVSDDPAKKFYAIT	-0,3	6,7
1523,7157	-0,0032	89,9	GGEQNPIYWARYA	-1,0	6,8
1533,7365	0,0064	51,1	PFGGEQNPIYWAR	-0,9	6,9
1540,7596	-0,0006	73,1	MGVSDPDAKKFYAI	-0,1	6,7
1543,8644	-0,0029	60,4	DGIMIGTGLVGALTKV	1,1	6,7
1579,8147	-0,0024	85,8	QAQITGRPEWIWL	-0,4	7,0
1607,8712	-0,0023	84,5	RYADWLFTTPLLL	0,5	6,7
1615,7954	0,0013	123,6	RSRAIFGEAEPEPS	-0,8	4,6
1641,8072	0,0041	100,8	MGVSDPDAKKFYAIT	-0,2	6,7
1650,8518	0,0016	80,0	QAQITGRPEWIWLA	-0,2	7,0
1671,923	-0,0026	176,0	GADGIMIGTGLVGALTKV	1,1	6,7
1678,8025	0,0005	66,5	GYGLTMVFPFGGEQNPI	0,0	3,3
1720,9552	-0,0035	100,7	RYADWLFTTPLLLL	0,7	6,7
1725,876	0,0059	71,6	KMGVSDPDAKKFYAI	-0,4	9,2
1739,9359	-0,004	43,7	QITGRPEWIWLALGT	0,1	7,0
1743,8064	0,0033	53,6	RAIFGEAEPEPSAGDGA	-0,4	3,7
1754,9104	-0,0057	40,6	SQAQITGRPEWIWLA	-0,3	7,0
1767,8369	-0,0061	110,1	PFGGEQNPIYWARYA	-0,8	6,8
1801,8828	0,0041	83,9	YWARADWLFTTPL	-0,1	6,6
1820,9574	0,0039	40,0	QAQITGRPEWIWLALG	0,0	7,0
1826,9237	0,0014	73,6	KMGVSDPDAKKFYAIT	-0,4	9,2
1834,9863	-0,0073	150,0	GADGIMIGTGLVGALTKVY	1,0	6,6
1835,9669	-0,0028	89,5	SDPDAKKFYAITTLVPA	0,0	6,7
1835,9822	-0,0076	73,6	RYADWLFTTPLLLLD	0,5	3,9
1841,9635	-0,004	113,2	LLRSRAIFGEAEPEPS	-0,3	4,6
1842,9186	0,0051	42,6	KMGVSDPDAKKFYAIT	-0,4	9,2
1884,0754	-0,0042	141,1	LVGADGIMIGTGLVGALTKV	1,4	6,7
1911,0003	-0,0076	67,9	GVSQAQITGRPEWIWLA	0,0	7,0
1922,005	0,0012	57,0	QAQITGRPEWIWLALGT	0,0	7,0
1955,0476	-0,0068	82,2	ILLRSRAIFGEAEPEPS	0,0	4,6
1955,1125	-0,0065	104,6	ALVGADGIMIGTGLVGALTKV	1,4	6,7
2020,0881	-0,0046	97,1	SDPDAKKFYAITTLVPAIA	0,3	6,7
2020,1033	-0,0051	123,8	RYADWLFTTPLLLDLA	0,7	3,9
2047,1388	-0,0042	90,7	LVGADGIMIGTGLVGALTKVY	1,3	6,6
2123,0973	-0,0087	42,7	MGVSDPDAKKFYAITTLVPA	0,2	6,7
2139,1113	-0,0153	67,8	AVEGVSQAQITGRPEWIWL	0,0	4,3
2210,1484	-0,0317	70,4	AVEGVSQAQITGRPEWIWLA	0,1	4,3
2329,243	0,0007	124,9	GFGILLRSRAIFGEAEPEPS	0,3	4,6
2497,2066	-0,0169	39,1	GGEQNPIYWARYADWLFTTPL	-0,5	4,1

Tab. 9-14A: MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Chymotrypsin, 5 ppm.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
985,5709	-0,0012	175	182	RNVTVVLW
1040,508	-0,0014	81	88	ARYADWLF
1062,4771	-0,0009	72	80	GGEQNPIYW
1278,7224	0,0014	43	54	YAITTLVPAIAF
1325,8183	-0,0013	172	182	KVLRNVTVVLW
1466,7306	-0,0033	1	12	QAQITGRPEWIW
1579,8147	0,0018	1	13	QAQITGRPEWIWL
1753,9073	-0,0009	27	42	FLVKGMGVSDPDAKKF
1824,822	-0,002	72	86	GGEQNPIYWARYADW
1834,9943	-0,0046	139	154	AISTAAMLYILYVLF
1900,9757	-0,0025	27	43	FLVKGMGVSDPDAKKFY
1916,9706	-0,0029	27	43	FLVKGMGVSDPDAKKFY
1934,0547	-0,0021	112	131	VGADGIMIGTGLVGALTKVY
2084,9745	-0,0033	72	88	GGEQNPIYWARYADWLF
2118,1759	-0,0025	110	131	ALVGADGIMIGTGLVGALTKVY
2134,1708	-0,0028	110	131	ALVGADGIMIGTGLVGALTKVY
2841,4888	-0,0034	1	26	QAQITGRPEWIWLALGTALMGLGLTY

Tab. 9-14B: MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Proteinase K, 5 ppm.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
918,4712	0,0009	76	82	NPIYWAR
942,4712	0,0012	6	12	GRPEWIW
1046,5298	0,0014	75	82	QNPIYWAR
1055,5552	0,001	6	13	GRPEWIWL
1126,5924	0,001	6	14	GRPEWIWLA
1191,5594	-0,0054	66	76	LTMVPGGGEQN
1239,6764	0,0017	6	15	GRPEWIWLAL
1245,6315	-0,0041	57	67	YLSMLLGYGLT
1287,5983	0,0027	228	240	AIFGEAEPEPSA
1289,6153	0,0016	72	82	GGEQNPIYWAR
1397,7456	0,0004	6	17	GRPEWIWLALGT
1453,8082	0,0003	4	15	ITGRPEWIWLAL
1581,8667	0,0024	6	19	GRPEWIWLALGTAL
1632,8049	0,0008	69	82	VFPFGGEQNPIYWAR
1691,932	-0,0064	11	26	IWLALGTALMGLGLTY
1704,83	-0,0071	78	90	IYWARYADWLFTT
1738,864	-0,0074	149	163	LYVLFPGFTSKAESM
1763,8454	0,0018	68	82	MVFPFGGEQNPIYWAR
1779,8403	-0,0002	68	82	MVFPFGGEQNPIYWAR
1836,8712	-0,0007	55	70	TMYLSMLLGYGLTMVP
1839,0005	-0,009	12	28	WLALGTALMGLGLTYFL
1864,893	0,0002	67	82	TMVFPFGGEQNPIYWAR
2062,0638	0,0023	135	151	FVWWAISTAAMLYILYV
2320,1557	-0,0029	50	70	PAIAFTMYLSMLLGYGLTMVP

Tab. 9-14C: MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Pepsin, 5 ppm.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
861,5185	0,0007	224	230	LRSRAIF
918,5399	0,001	224	231	LRSRAIFG
948,495	-0,0017	16	25	GTALMGLGTL
966,4348	0,0007	80	86	WARYADW
975,5865	0,001	171	178	FKVLRNVT
1013,5393	0,0027	97	106	LALLVDADQG
1047,5825	0,0007	224	232	LRSRAIFGE
1079,5189	0,0008	80	87	WARYADWL
1118,6196	0,0013	224	233	LRSRAIFGEA
1156,6029	0,0004	4	12	ITGRPEWIW
1167,5673	0,001	1	10	QAQITGRPEW
1219,5873	0,0002	69	79	VFPFGGEQNPIY
1284,6615	0,0014	3	12	QITGRPEWIW
1466,7306	0,0008	1	12	QAQITGRPEWIW
1502,7347	-0,0071	78	88	IYWARYADWLF
1516,7306	-0,0026	59	72	SMLLGYGLTMVPPFG
1603,7824	-0,006	78	89	IYWARYADWLFT
1844,919	0,0076	102	120	DADQGTILALVGADGIMIG
1856,9381	0,0018	224	241	LRSRAIFGEAEAPEPSAG
1857,8607	0,0059	63	79	GYGLTMVPPFGGEQNPIY
1880,0506	0,003	90	107	TPLLLLDLALLVDADQGT
1993,1347	0,0032	90	108	TPLLLLDLALLVDADQGTI
2024,9661	-0,0099	55	72	TMYSMLLGYGLTMVPPFG
2041,9853	0,0008	58	76	LSMLLGYGLTMVPPFGGEQN
2100,0236	0,008	224	244	LRSRAIFGEAEAPEPSAGDGA
2171,0607	0,0013	224	245	LRSRAIFGEAEAPEPSAGDGAA
2366,1617	-0,0008	150	170	YVLFPGFTSKAESMRPEVAST
2430,1775	-0,0046	224	248	LRSRAIFGEAEAPEPSAGDGAAATS
2876,5398	0,0133	24	49	TLYFLVKMGVSDPDAKKFYAITLV

Tab. 9-14D: MALDI-Orbitrap-PMF, Bacteriorhodopsin, Elastase, 5 ppm.

Masse	Diff.	Start	Ende	Peptidsequenz
828,3919	0,0002	79	84	YWARYA
917,4277	0,0002	161	168	ESMRPEVA
933,4226	-0,0002	161	168	ESMRPEVA
974,5913	0,0003	218	226	GFGILLRS
1062,6186	0	169	177	STFKVLRNV
1070,5185	-0,0002	82	89	RYADWLFT
1172,6151	0,0052	142	151	TAAMLVILYV
1187,5645	-0,0002	68	78	MVPPFGGEQNPI
1227,64	0,0004	5	14	TGRPEWIWLA
1274,7711	0,0001	170	180	TFKVLNRNVTVV
1354,6769	0,0002	35	46	SDPDAKKFYAIT
1361,8031	0,0001	169	180	STFKVLRNVTVV
1372,6623	0,0004	227	239	RAIFGEAEAPEPS
1381,703	0,0004	82	92	RYADWLFTTPL
1397,7456	0,0029	3	13	QITGRPEWIWL
1431,7796	-0,0049	12	25	WLALGTALMGLGTL
1468,7827	0,0027	3	14	QITGRPEWIWLA
1476,719	0,003	131	141	YSYRFVWVAIS
1490,6983	-0,0001	79	89	YWARYADWLFT
1498,7932	0	5	17	TGRPEWIWLALGT
1607,8712	0,0005	82	94	RYADWLFTTPLL

1615,7954	0,0035	225	239	RSRAIFGEAEPEPS
1650,8518	0,0021	1	14	QAQITGRPEWIWLA
1718,9832	0,0009	218	233	GFGILLRSRAIFGEA
1727,8553	0,0042	29	44	VKGMGVSDPDACKFYA
1739,9359	0,0039	3	17	QITGRPEWIWALGT
1784,8655	-0,0041	23	39	GTLYFLVKGMGVSDPDA
1801,8828	-0,0002	79	92	YWARYADWLFTTPL
1922,005	0,0012	1	17	QAQITGRPEWIWALGT
2020,1033	-0,0003	82	98	RYADWLFTPLLLDLA
2178,2201	0,0022	169	187	STFKVLRNVTVVLSAYPV
2324,2086	-0,0069	30	51	KGMGVSDPDACKFYAITLVPA
2329,243	0,0025	218	239	GFGILLRSRAIFGEAEPEPS

Tab. 9-15: nLC-MALDI-TOF/TOF, Pepsin-Verdau von Bacteriorhodopsin, 30 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
753,3731	-0,0189	50,66	MGLGTLY	1,0	5,9
756,329	-0,0111	31,88	EAEPEPSAG	-1,0	3,1
758,3923	0,0224	37,85	RPEVAST	-0,7	7,0
775,4269	-0,0226	46,43	YPVVWL	1,4	5,9
803,4793	-0,0133	34,52	FTTPLLL	1,6	6,0
821,4283	0,0046	39,78	DVSAKVGf	0,6	6,7
827,3661	-0,0201	43,22	AEAPEPSAG	-0,7	3,1
828,5181	-0,0054	44,69	KVLRNVT	-0,1	11,2
830,4902	-0,0199	52,63	TLVPAIAF	2,1	6,0
845,5375	0,0151	48,42	KVGfGLIL	1,8	9,7
861,5184	0,0096	29,17	LRSRAIF	0,4	12,4
878,4498	0,0183	62,7	DVSAKVGfG	0,4	6,7
900,4415	-0,0111	54,14	MGLGTLYF	1,2	5,9
913,4732	-0,0201	35,55	YFLVKGMG	0,8	9,5
916,4364	-0,0072	59,57	MGLGTLYF	1,2	5,9
916,5634	-0,0249	58,85	LFTTPLLL	1,9	6,0
918,5399	0,0218	34,09	LRSRAIFG	0,3	12,4
956,4087	-0,0055	74,04	EAEPEPSAG	-1,0	3,0
975,5865	0,025	42,57	FKVLRNVT	0,3	11,2
989,5586	-0,0236	58,64	WLFTTPLL	1,3	6,0
1005,5131	-0,005	65,37	VSDPDACKF	-0,9	6,7
1013,4301	-0,0073	90,45	GEAEPEPSAG	-0,9	3,0
1043,5189	0,0017	40,03	TGRPEWIW	-1,0	7,0
1047,5825	0,0287	33,7	LRSRAIFGE	-0,1	10,9
1074,655	0,0083	30,24	FKVLRNVTV	0,7	11,2
1079,5188	0,0214	42,61	WARYADWL	-0,5	6,7
1102,6427	-0,0162	35,57	WLFTTPLLL	1,6	6,0
1118,6196	0,0157	43,79	LRSRAIFGEA	0,1	10,9
1119,5753	-0,0057	48,57	WSAYPVVWL	0,9	5,9
1120,5189	0,015	67,75	PFGGEQNPIY	-0,9	3,3
1156,6029	0,025	41,73	ITGRPEWIW	-0,4	7,0
1167,5673	-0,0021	72,47	QAQITGRPEW	-1,2	7,0
1185,4786	0,01	94,08	GEAEPEPSAGDG	-1,1	2,9
1219,5873	-0,0182	95,06	VPPFGGEQNPIY	-0,4	3,3
1256,5157	-0,0326	32,04	GEAEPEPSAGDGA	-0,9	2,9
1267,635	0,026	71,62	QITGRPEWIW	-0,7	7,0
1280,6513	0,0108	36,06	QAQITGRPEWI	-0,7	7,0
1284,6615	-0,0065	51,81	QITGRPEWIW	-0,7	7,0
1284,6615	0,0237	51,81	QITGRPEWIW	-0,7	7,0
1286,8074	-0,0086	41,42	FKVLRNVTVVLL	1,3	11,2
1329,5684	-0,0164	57,02	EAEPEPSAGDGAATS	-0,5	2,9
1350,6278	-0,0145	59,51	MVPPFGGEQNPIY	-0,2	3,3

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1355,6986	-0,0114	48,3	AQITGRPEWIW	-0,5	7,0
1405,6667	-0,0183	68,79	VPFGEQNPIYW	-0,4	3,3
1451,6755	-0,0269	107,32	TMVFPFGGEQNPIY	-0,2	3,3
1466,7307	-0,0006	84,96	QAQITGRPEWIW	-0,7	7,0
1467,6704	-0,0201	58,46	TMVFPFGGEQNPIY	-0,2	3,3
1483,7572	0,0082	57,82	QAQITGRPEWIW	-0,7	7,0
1564,7596	-0,0281	97,5	LTMVFPFGGEQNPIY	0,0	3,3
1579,8147	-0,0155	69,16	QAQITGRPEWIWL	-0,4	7,0
1580,7545	-0,0204	65,86	LTMVFPFGGEQNPIY	0,0	3,3
1586,6696	0,0045	163,78	GEAEPEPSAGDGAAATS	-0,6	2,9
1590,844	-0,039	75,22	LVKGMGVSDPDAKKF	-0,2	9,3
1694,9454	-0,0216	52,73	IGSEGAGIVPLNIETLL	0,9	3,1
1726,8791	0,0172	75,91	GVSQAQITGRPEWIW	-0,4	7,0
1737,9124	-0,0469	134,31	FLVKGMGVSDPDAKKF	0,0	9,3
1743,854	-0,0014	92,74	RSRAIFGEAEPEPSAG	-0,6	4,6
1753,9073	-0,0052	48,24	FLVKGMGVSDPDAKKF	0,0	9,3
1856,938	0,0062	88,15	LRSRAIFGEAEPEPSAG	-0,4	4,6
1900,9757	-0,0073	76,93	YFLVKGMGVSDPDAKKF	-0,1	9,2
1970,9448	-0,0574	98,28	LGYGTLTMVFPFGGEQNPIY	0,1	3,3
2028,9865	0,0006	135,59	LRSRAIFGEAEPEPSAGDG	-0,5	4,2
2057,9766	0,0121	90,05	RSRAIFGEAEPEPSAGDGAA	-0,5	4,2
2100,0236	0,0222	99,03	LRSRAIFGEAEPEPSAGDGA	-0,4	4,2
2168,0116	0,0294	38,13	VPFGEQNPIYWARYADW	-0,7	4,1
2171,0607	0,0252	137,72	LRSRAIFGEAEPEPSAGDGAA	-0,3	4,2
2317,0934	-0,0471	111,82	RSRAIFGEAEPEPSAGDGAAATS	-0,4	4,2
2430,1775	0,0267	129,61	LRSRAIFGEAEPEPSAGDGAAATS	-0,3	4,2

Tab. 9-16: nLC-MALDI-TOF/TOF, Elastase-Autoproteolyse, 30 ppm.

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
711,3228	0,0044	36,8	YWGSTV	0,0	6,0
747,3698	0,0044	37,5	SRLGCNV	0,2	8,6
752,3817	0,0042	36,6	SLQYRS	-1,2	9,3
761,3854	0,0046	45,5	RLGCNVT	0,2	8,6
772,3868	0,0066	48,3	QYAVHGV	0,3	7,5
789,4133	-0,0046	45,1	TGWGLTR	-0,5	10,6
798,3548	-0,0058	35,3	SYWGSTV	-0,1	6,0
800,3851	0,0074	46,1	HTCGGTLI	0,7	7,4
809,3378	0,0013	40,5	NNSPCYI	-0,5	6,0
809,4032	0,0049	38,6	SLQYRSG	-1,1	9,3
816,3555	0,0046	32,6	HPYWNT	-1,9	7,5
825,5072	0,0055	34,9	VLPRAGTI	0,9	10,6
828,4494	-0,0047	39,7	WINNVIA	1,0	6,0
848,4174	0,0097	45	SRLGCNVT	0,1	8,6
873,4093	0,0157	41,9	QRNSWPS	-2,2	10,6
882,5287	0,0005	30,2	GVLPRAGTI	0,7	10,6
885,3869	0,0015	63,5	SSYWGSTV	-0,2	6,0
890,461	0,0142	49,7	TGWGLTRT	-0,6	10,6
896,4352	0,0048	40,5	SLQYRSGS	-1,0	9,3
898,56	0,0059	36,2	LLRLAQSV	1,1	10,6
909,5396	-0,0083	42,3	QLGVLPRAG	0,4	10,6
913,4446	0,0018	37,0	VVHPYWN	-0,3	7,5
915,4239	0,0001	43,5	VHPYWNT	-1,0	7,5
915,4814	-0,0038	54,0	SWINNVIA	0,8	6,0
933,4491	0,0003	40,2	RQNWVMT	-1,0	10,6
936,4916	-0,0093	49,6	TLNSYVQL	0,3	6,0

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
940,4542	-0,0064	51,2	YLPTVDYA	0,2	3,8
943,4512	-0,0068	49,9	NGQYAVHGV	-0,2	7,5
948,5393	0,0074	34,5	TRKPTVFT	-0,6	11,7
972,4189	-0,0075	31,6	SSSYWGSTV	-0,3	6,0
974,4968	0,0007	45,2	GCNVTRKPT	-1,0	9,8
993,5131	-0,0131	43,5	TLNSYVQLG	0,2	6,0
996,4699	0,0069	68,0	DSGGPLHCLV	0,4	5,3
1000,5665	0,0088	55,3	RLAQSVTLN	0,1	10,6
1004,4862	-0,0025	45,0	RQNWVMTA	-0,7	10,6
1008,608	-0,0053	35,3	VQLGVLPRAG	0,7	10,6
1009,6284	-0,008	31,2	VLPRAGTILA	1,3	10,6
1013,4818	-0,0058	38,8	SSYWGSTVK	-0,6	9,3
1014,4923	0,0107	50,0	VVHPYWNT	-0,4	7,5
1029,5203	0,0043	56,9	VVGTEAQRN	-0,6	6,3
1040,4675	0,0042	44,3	QYRSGSSWA	-1,2	9,3
1042,4866	0,0028	54,4	AHCVDRELT	-0,3	5,5
1043,6128	-0,008	32,0	YVQLGVLPR	0,5	9,3
1050,5458	0,0033	45,4	QISLQYRSG	-0,7	9,3
1066,6499	0	54,4	GVLPRAGTILA	1,1	10,6
1087,5986	-0,0013	60,9	RLAQSVTLNS	0,0	10,6
1093,592	0,003	50,4	RVSAYISWI	0,7	9,3
1097,5254	0,004	71,2	QRNSWPSQI	-1,6	10,6
1123,6713	-0,0057	39,3	QLGVLPRAGTI	0,6	10,6
1127,5247	0,0016	72,7	SSYWGSTVKN	-0,9	9,3
1130,6448	-0,0039	82,6	SYVQLGVLPR	0,4	9,3
1133,6193	0,0038	46,1	DRELTFRVV	-0,2	6,5
1145,4778	0,0016	63,6	HPYWNTDDV	-1,6	4,1
1153,5516	0,0023	45,3	LQYRSGSSWA	-0,7	9,3
1155,6037	-0,0012	75,4	LVNGQYAVHGV	0,5	7,5
1170,5993	-0,0058	87,7	NGQLAQTLLQA	-0,7	6,0
1171,6713	-0,0075	53,0	YVQLGVLPRAG	0,6	9,3
1206,6033	0,004	72,4	QYAVHGVTSFV	0,7	7,5
1214,5568	-0,0108	66,0	SSYWGSTVKNS	-0,9	9,3
1226,7347	0,0014	58,9	LLRLAQSVTLN	0,7	10,6
1240,5836	-0,0003	63,7	SLQYRSGSSWA	-0,7	9,3
1244,5462	0,0077	72,5	VHPYWNTDDV	-1,0	4,1
1250,6507	-0,0084	42,5	QSVTLNSYVQL	0,2	6,0
1258,7034	0,0044	98,0	SYVQLGVLPRAG	0,4	9,3
1262,6659	-0,02	41,0	AYISWINNVIA	1,0	6,0
1267,6085	-0,0147	86	QQAYLPTVDYA	-0,3	3,8
1271,647	-0,0043	67,7	TNGQLAQTLLQA	-0,7	6,0
1287,552	0,008	75,3	HPYWNTDDVAA	-0,9	4,1
1307,7925	-0,0203	56,1	QLGVLPRAGTILA	1,0	10,6
1315,5833	0,0143	62,6	VHPYWNTDDVA	-0,7	4,1
1321,6813	-0,0109	42,9	GCNVTRKPTVFT	-0,2	9,8
1343,6146	-0,0029	75,5	VVHPYWNTDDV	-0,5	4,1
1372,7463	0,0013	83,3	NSYVQLGVLPRAG	0,1	9,3
1373,7052	-0,003	56,9	TGWGLTRTNGQLA	-0,5	10,6
1374,7078	-0,0007	44,3	GGTLIRQNWVMT	0,0	10,6
1385,8031	-0,0036	51,2	YVQLGVLPRAGTI	0,8	9,3
1386,6204	0,0061	96,8	VHPYWNTDDVAA	-0,5	4,1
1393,611	0,0126	57,5	NLNQNDGTEQYV	-1,6	3,6
1414,6517	0,0023	81,2	VVHPYWNTDDVA	-0,3	4,1
1417,7929	-0,0009	55,5	GYDIALLRLAQSV	0,7	6,2
1427,7481	-0,0056	56,7	RTNGQLAQTLLQA	-1,0	10,6
1443,6419	0,0069	81,6	VHPYWNTDDVAAG	-0,5	4,1
1444,6657	0,0029	45,1	SSYWGSTVKNSMV	-0,3	9,3
1445,7449	-0,0079	36,2	GGTLIRQNWVMTA	0,1	10,6
1456,6987	-0,01	53,0	IVVHPYWNTDDV	-0,1	4,1
1458,8195	-0,0007	96,7	TLNSYVQLGVLPR	0,3	9,3
1463,7408	0,013	40,8	AYISWINNVIASN	0,5	6,0

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
1472,8351	0,0004	59,9	SYVQLGVLPRAGTI	0,7	9,3
1478,6902	0,0003	42,8	SLQYRSGSSWAHT	-0,9	9,4
1481,7263	-0,0075	45,2	QISLQYRSGSSWA	-0,6	9,3
1485,6889	-0,0026	89,6	VVHPYWNTDDVA	-0,2	4,1
1486,7165	0,002	66,5	VVGTEAQRNSWPS	-0,7	6,3
1507,7419	-0,0004	43,0	SWPSQISLQYRSG	-0,8	9,3
1529,7223	0,0076	69,8	GGTEAQRNSWPSQI	-1,3	6,3
1542,7103	0,0097	103,0	VVHPYWNTDDVAAG	-0,2	4,1
1543,7929	0,0005	58,0	AHCVDRELFTRVV	0,3	7,4
1549,7009	-0,0052	102,3	NLNQNDGTEQYVGV	-1,1	3,6
1553,6706	0,0015	92,2	VGEHNLNQNNDGTEQ	-1,8	3,9
1559,8671	-0,0067	69,4	AAGYDIALRLAQSV	0,9	6,2
1560,6441	0,006	59,8	EHNLNQNNDGTEQY	-2,3	3,9
1586,878	0,0061	125,4	TLNSYVQLGVLPRAG	0,3	9,3
1590,8729	-0,0043	116,5	RLAQSVTLNSYVQL	0,2	9,3
1602,8114	-0,0051	46,8	TGWGLTRTNGQLAQT	-0,7	10,6
1604,8674	0,0042	77,9	RVSAYISWINNVIA	0,7	9,3
1614,83	-0,0033	44,6	AAHCVDRELFTRVV	0,4	7,4
1628,7907	-0,0037	47,6	VGGTEAQRNSWPSQI	-0,9	6,3
1647,8944	-0,008	111,3	RLAQSVTLNSYVQLG	0,2	9,3
1652,739	-0,0003	118,3	VVEHNLNQNNDGTEQ	-1,4	3,9
1656,9563	-0,0016	53,2	SYVQLGVLPRAGTILA	0,9	9,3
1659,7125	-0,0048	132,6	EHNLNQNNDGTEQYV	-1,8	3,9
1677,8985	-0,0016	41,6	SRLGCNTRKPTVFT	-0,3	11,5
1698,9013	-0,0008	107,9	GLTRTNGQLAQTLLQA	-0,6	10,6
1705,7737	-0,0045	91,7	VVHPYWNTDDVAAGY	-0,2	4,1
1712,8522	-0,0294	92,1	QKIVVHPYWNTDDV	-0,6	5,4
1715,8955	0,0003	67,8	TGWGLTRTNGQLAQTLL	-0,4	10,6
1716,7339	0,0014	113,1	VGEHNLNQNNDGTEQY	-1,7	3,9
1727,8591	-0,0002	99,3	VVGTEAQRNSWPSQI	-0,6	6,3
1770,9992	0,0006	37,3	NSYVQLGVLPRAGTILA	0,7	9,3
1772,9785	-0,0031	44,5	QSVTLNSYVQLGVLPR	0,2	9,3
1783,8893	-0,0012	88,4	QKIVVHPYWNTDDVA	-0,4	5,4
1786,8607	-0,0065	58,4	HTCGGTLIRQNVWMTA	0,0	8,6
1801,0098	-0,001	127,3	TLNSYVQLGVLPRAGTI	0,5	9,3
1805,9424	-0,0074	72,8	RVSAYISWINNVIASN	0,4	9,3
1806,7849	0,0016	115,7	HPYWNTDDVAAGYDIA	-0,6	3,8
1815,8024	0,0091	102,5	VVEHNLNQNNDGTEQY	-1,4	3,9
1815,8024	0,0072	120,7	VGEHNLNQNNDGTEQYV	-1,4	3,9
1854,9265	-0,0046	92,6	QKIVVHPYWNTDDVA	-0,3	5,4
1872,8238	0,0014	67,2	VGEHNLNQNNDGTEQYVG	-1,3	3,9
1872,8238	0,0061	115,9	GEHNLNQNNDGTEQYVGV	-1,3	3,9
1901,0371	0	55,09	QSVTLNSYVQLGVLPRAG	0,3	9,3
1905,8533	-0,0011	119,3	VHPYWNTDDVAAGYDIA	-0,3	3,8
1914,0938	-0,0108	67,6	TLNSYVQLGVLPRAGTIL	0,7	9,3
1914,8708	0,0019	132,8	VVEHNLNQNNDGTEQYV	-1,0	3,9
1927,9752	-0,0033	62,4	VVGTEAQRNSWPSQISL	-0,4	6,3
1933,8847	-0,004	55,9	VVHPYWNTDDVAAGYDI	-0,2	3,8
1938,9224	-0,006	86,3	SWPSQISLQYRSGSSWA	-0,7	9,3
1971,8923	-0,0117	50,6	VVEHNLNQNNDGTEQYVG	-1,0	3,9
1971,8923	0,0081	147,4	VGEHNLNQNNDGTEQYVGV	-1,0	3,9
1985,131	-0,0073	109,7	TLNSYVQLGVLPRAGTILA	0,8	9,3
2004,9218	0,05	140,4	VVHPYWNTDDVAAGYDIA	-0,1	3,8
2013,9392	-0,0191	35,6	VVEHNLNQNNDGTEQYV	-0,7	3,9
2022,9582	-0,005	50,1	SLQYRSGSSWAHTCGGTLI	-0,1	8,5
2043,0498	0,0066	103,5	TGWGLTRTNGQLAQTLLQA	-0,6	10,6
2070,9607	-0,0051	154,5	VVEHNLNQNNDGTEQYVGV	-0,7	3,9
2099,9508	-0,0033	145,8	VGEHNLNQNNDGTEQYVGVQ	-1,1	3,9
2115,1688	-0,0181	126,1	QSVTLNSYVQLGVLPRAGTI	0,4	9,3
2118,0058	0,0039	103,8	IVVHPYWNTDDVAAGYDIA	0,2	3,8
2170,0291	0,0039	121,3	VVEHNLNQNNDGTEQYVGV	-0,5	3,9

Masse	Diff.	Score	Peptidsequenz	GRAVY	pI
2185,04	0,0041	154,6	EHNLNQNDGTEQYVGVQKI	-1,3	4,4
2186,2059	-0,0101	80,8	AQSVTLNSYVQLGVLPRAGTI	0,5	9,3
2199,0193	-0,0026	142,2	VVGEHNLNQNNDGTEQYVGVQ	-0,9	3,9
2231,0899	0,0085	103,9	VVHPYWNNTDDVAAGYDIALL	0,3	3,8
2241,2593	-0,0215	151,1	RLAQSVTLNSYVQLGVLPRAG	0,3	11,2
2299,29	-0,0092	116,1	QSVTLNSYVQLGVLPRAGTILA	0,6	9,3
2317,1087	0,0153	119,1	FRVVVGEHNLNQNNDGTEQYV	-0,8	4,4
2341,1299	-0,0133	96,7	VGEHNLNQNNDGTEQYVGVQKI	-1,0	4,4
2370,3271	-0,0104	98,1	AQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILA	0,7	9,3
2374,1594	-0,0008	130,5	QKIVVHPYWNNTDDVAAGYDIA	-0,2	4,3
2440,1983	0,0103	110,4	VVGEHNLNQNNDGTEQYVGVQKI	-0,8	4,4
2455,3911	-0,0173	123,9	RLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTI	0,4	11,2
2467,4275	-0,0077	95,2	LLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAG	0,6	11,2
2473,1986	-0,0113	142,5	FRVVVGEHNLNQNNDGTEQYVGV	-0,5	4,4
2519,2517	-0,0075	91,7	VVGTEAQRNSWSPQISLQYRSG	-0,7	9,3
2574,2463	-0,0136	88,0	TFRVVVGEHNLNQNNDGTEQYVGV	-0,5	4,4
2606,2837	-0,0005	105,9	VVGTEAQRNSWSPQISLQYRSGS	-0,7	9,3
2639,5123	-0,0158	139,9	RLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILA	0,6	11,2
2681,5592	-0,0125	93,6	LLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTI	0,7	11,2
2842,4362	-0,0087	52,5	FRVVVGEHNLNQNNDGTEQYVGVQKI	-0,6	5,6
2865,6804	-0,0236	83,8	LLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILA	0,8	11,2
2885,4712	0,0257	66,9	VVHPYWNNTDDVAAGYDIALLRLAQSV	0,3	4,3
2950,4322	-0,021	47,7	VVGTEAQRNSWSPQISLQYRSGSSWA	-0,7	9,3
3128,7346	-0,0388	71,7	AAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAG	0,6	9,2
3200,7921	-0,0113	76,3	GYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTI	0,6	9,2
3254,7088	-0,0037	59,6	QKIVVHPYWNNTDDVAAGYDIALLRLAQSV	0,2	5,5
3342,8663	-0,0289	67,06	AAGYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTI	0,7	9,2
3384,9133	0,0054	43,19	GYDIALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGTILA	0,8	9,2
3666,7339	-0,0371	62,79	VGEHNLNQNNDGTEQYVGVQKIVVHPYWNNTDDV	-0,8	4,2

9.3 Proteolyseprotokolle

Der folgende Abschnitt enthält zusammengefasst die in dieser Arbeit vorgestellten Abläufe zur Proteolyse von Membranproteinen/-proteomen mit den vorgestellten Enzymen.

Tab. 9-17: Protokoll zum Verdau von Membranproteomen mit Elastase/Trypsin in Methanol.

Schritt	Beschreibung
Start	Ausgangsmaterial: Membran-Suspension mit 50-100 µg Proteingehalt
1	Waschen der Membranen
1.1	Zentrifugation 2 min bei 12.000 g – Überstand verwerfen
1.2	200 µl H ₂ O (alternativ 25 mM NH ₄ HCO ₃) hinzugeben – vorsichtig resuspendieren
1.3	Zentrifugation 2 min bei 12.000 g – Überstand verwerfen
(2)	Optional: Vorverdau der Membran zur Entfernung löslicher Proteinbestandteile
(2.1)	200 µl 25 mM NH ₄ HCO ₃ hinzugeben – vorsichtig resuspendieren
(2.2a)	5-10 µg Elastase hinzugeben (Stammlösung 1 µg/µl in kaltem H ₂ O) – vorsichtig mischen
(oder 2.2b)	1-2 µg Trypsin hinzugeben (Stammlösung 1 µg/µl in kaltem H ₂ O) – vorsichtig mischen
(2.3)	Inkubation für 12 h bei 22°C
(2.4)	Zentrifugation 5 min bei 12.000 g – Überstand (1) entnehmen/verwerfen
3	Proteolyse der Membranproteine
3.1	120 µl Methanol hinzugeben – vorsichtig resuspendieren
3.2	2 x 10 min Behandlung im Ultraschallbad
3.3	79 µl mM NH ₄ HCO ₃ hinzugeben – vorsichtig mischen
3.4a	5-10 µg Elastase hinzugeben (Stammlösung 1 µg/µl in kaltem H ₂ O) – vorsichtig mischen
oder 3.4b	1-2 µg Trypsin hinzugeben (Stammlösung 1 µg/µl in kaltem H ₂ O) – vorsichtig mischen
3.5	Inkubation für 16-24 h bei 22°C
3.6	Zentrifugation 5 min bei 12.000 g – Überstand (2) entnehmen
(4)	Optional: Nachextraktion der Membranen
(4.1)	100 µl Acetonitril hinzugeben – gut mischen
(4.2)	Zentrifugation 2 min bei 12.000 g – Überstand (3) entnehmen
(4.3)	Überstände (2) und (3) vereinen
5	Lagerung bei -20°C

Die eigentlichen Membranpeptide befinden sich in den Überständen (2) und (3), welche zusammen analysiert werden können. Überstand (1) enthält zusätzlich die löslichen Peptide, die auch in wässrigen Milieu zugänglich waren und kann getrennt untersucht oder verworfen werden.

Tab. 9-18: Protokoll zum Verdau von Membranproteomen mit Pepsin.

Schritt	Beschreibung
Start	Ausgangsmaterial: Membran-Suspension mit 50-100 µg Proteingehalt
1	Waschen der Membranen
1.1	Zentrifugation 2 min bei 12.000 g – Überstand verwerfen
1.2	200 µl H ₂ O hinzugeben – vorsichtig resuspendieren
1.3	Zentrifugation 2 min bei 12.000 g – Überstand verwerfen
2	Proteolyse der Membranproteine
2.1	20 µl Methanol hinzugeben – vorsichtig resuspendieren
2.2	2 x 10 min Behandlung im Ultraschallbad
2.3	180 µl mM 0,11% TFA hinzugeben – vorsichtig mischen
2.4	0,5-1 µg Pepsin hinzugeben (Stammlösung 1 µg/µl in kaltem H ₂ O) – vorsichtig mischen
2.5	Inkubation für 16-24 h bei 22°C
2.6	Zentrifugation 5 min bei 12.000 g – Überstand (1) entnehmen
(3)	Optional: Nachextraktion der Membranen
(3.1)	100 µl Acetonitril hinzugeben – gut mischen
(3.2)	Zentrifugation 2 min bei 12.000 g – Überstand (2) entnehmen
(3.3)	Überstände (1) und (2) vereinen
4	Lagerung bei -20°C

Die Peptide befinden sich in den Überständen (1) und (2), welche zusammen analysiert werden können. Natürlich kann auch hier analog zum Elastaseprotokoll eine Vorverdau der Membranen mit Pepsin oder einer alternativen Protease durchgeführt werden.

Tab. 9-19: Protokoll zum Verdau mit Elastase in einem Polyacrylamidgel.

Schritt	Beschreibung
Start	Ausgangsmaterial: Proteinbande (500 fmol-2 pmol Proteingehalt); Coomassie-Färbung
1	Entfärben
1.1	500 µl 50% Acetonitril zum Gelstück hinzugeben
1.2	Inkubation 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln
1.3	Überstand verwerfen
1.4	Schritte 1.1 bis 1.3 dreimal wiederholen
2	Äquilibrieren
2.1	500 µl 25 mM NH ₄ HCO ₃ hinzugeben
2.2	Inkubation 5 min bei 22°C unter leichtem Schütteln
2.3	Überstand verwerfen
2.4	500 µl Acetonitril hinzugeben
2.5	Inkubation 5 min bei 22°C unter leichtem Schütteln
2.6	Überstand verwerfen
2.7	Schritte 2.1 bis 2.6 wiederholen
2.8	Acetonitril vollständig an der Luft verdampfen lassen
3	Proteolyse im Gel
3.1	Proben auf Eis stellen
3.2	20 µl Elastase-Lösung (2,5 ng/µl in 25 mM NH ₄ HCO ₃) hinzugeben (50 ng/Bande)
3.3	30 µl 25 mM NH ₄ HCO ₃ hinzugeben
3.4	Inkubation 16 h bei 22°C
3.5	Überstand (1) entnehmen
4	Nachextraktion
4.1	100 µl 50% Acetonitril/0,1% TFA hinzugeben
4.2	Inkubation 15 min unter leichtem Schütteln
4.3	Überstand (2) entnehmen
4.4	100 µl 90% Acetonitril/0,1% TFA hinzugeben
4.5	Inkubation 15 min unter leichtem Schütteln
4.6	Überstand (3) entnehmen
4.7	Überstände (1)-(3) vereinen
4.8	Überstände komplett in Vakuumzentrifuge eintrocknen
5	Lagerung bei -20°C oder Rücklösen in 50% Acetonitril/0,1% TFA

9.4 Publikationsverzeichnis

9.4.1 Artikel in Fachzeitschriften

Rietschel B., Arrey T.N., Meyer B., Bornemann S., Schuerken M., Karas M., Poetsch A. (2009) **Elastase digests: new ammunition for shotgun membrane proteomics**, *Mol Cell Proteomics*, 8(5), 1029-1043

Rietschel B., Baeumlisberger D., Arrey T.N., Bornemann S., Rohmer M., Schuerken M., Karas M., Meyer B. (2009) **The benefit of combining nLC-MALDI-Orbitrap MS data with nLC-MALDI-TOF/TOF data for proteomic analyses employing elastase**, *J Proteome Res*, 8(11), 5317-5324

Rietschel B., Bornemann S., Arrey T.N., Baeumlisberger D., Karas M., Meyer B. (2009) **Membrane protein analysis using an improved peptic *in-solution* digestion protocol**, *Proteomics*, 9(24), 5553-5557

Bornemann S., Rietschel B., Baltruschat S., Karas M., Meyer B. (2010) **A novel polyacrylamide gel system for proteomic use offering controllable pore expansion by crosslinker cleavage**, *Electrophoresis*, 31(4), 585-592

Arrey T.N., Rietschel B., Papatotiriou D.G., Bornemann S., Baeumlisberger D., Karas M., Meyer B. (2010) **Approaching the Complexity of Elastase-Digested Membrane Proteomes using Off-Gel IEF/nLC-MALDI-MS/MS**, *Anal Chem*, in press
DOI: 10.1021/ac902776h

9.4.2 Vorträge

Rietschel B., Karas M. (2009) **Elastase digests: new ammunition for shotgun membrane proteomics**, *MALDI TOF TOF Seminar*, 27. Januar 2009, *Applied Biosystems, Darmstadt*

9.4.3 Posterpräsentationen

Rietschel B., Arrey T.N., Meyer B., Karas M., Poetsch A. (2008) **An alternative method for investigation of whole membrane samples using elastase as digestive protease**, 56. *ASMS Jahrestagung, 01. Juni – 05. Juni 2008, Denver, CO*

Rietschel B., Arrey T.N., Meyer B., Bornemann S., Poetsch A., Karas M. (2009) **Elastase-an optimal protease for membrane shotgun proteomics**, 42. *DGMS Jahrestagung, 08. März – 11. März 2009, Konstanz*

Baeumlisberger D., Jaskolla T.W., Arrey T.N., Rietschel B., Meyer B., Karas M. (2009) **Optimization of negative-ion mode MALDI-MS**, 42. *DGMS Jahrestagung, 08. März – 11. März 2009, Konstanz*

Rietschel B., Arrey T.N., Bornemann S., Meyer B., Papatiriu D., Poetsch A., Karas M. (2009) **Approaching the complexity of membrane proteomes digested with elastase using off-gel IEF/nanoLC-MALDI-MS/MS**, 57. *ASMS Jahrestagung, 31. Mai – 04. Juni 2009, Philadelphia, PA*

Baeumlisberger D., Rietschel B., Arrey T.N., Bornemann S., Meyer B., Karas M. (2009) **Proteomics workflow for less specific digests using a MALDI-TOF/TOF and MALDI-LTQ-Orbitrap**, 18. *IMSC Konferenz, 30. August – 04. September 2009, Bremen*

Baeumlisberger D., Arrey T.N., Rohmer M., Rietschel B., Beckhaus T., Meyer B., Karas M. (2010), **Labeling elastase digests with TMT – informational gain by identification of hydrophobic, very acidic and small peptides**, 43. *DGMS Jahrestagung, 07. März – 10. März 2009, Halle*

9.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

- **Name:** Benjamin Rietschel
- **Geburtsdatum:** 17. Dezember 1979
- **Geburtsort:** Offenbach am Main
- **Staatsangehörigkeit:** deutsch
- **Familienstand:** ledig

Schulbildung

- **1986 – 1990** Anne-Frank-Grundschule, Offenbach am Main
- **1990 – 1999** Albert-Schweitzer-Gymnasium, Offenbach am Main
- **06/1999** Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

- **09/1999 – 06/2000** Studium der Humanmedizin
Goethe Universität, Frankfurt am Main
- **09/2000 – 01/2006** Studium der Biologie (Diplom)
Goethe Universität, Frankfurt am Main
- **08/2002** Diplom-Vorprüfung
- **12/2004** Diplomprüfung in den Schwerpunktfächern
Genetik, Biochemie und Pflanzenphysiologie
- **04/2005 - 12/2005** Diplomarbeit im Fach Genetik
im Institut für Molekulare Biowissenschaften
AG Prof. Dr. K.D. Entian
Titel: „*Charakterisierung von Mutanten der ribosomalen Biogenese*“

Promotionsstudium

- **03/2006-03/2010** Dissertation
im Institut für Pharmazeutische Chemie
AG Prof. Dr. M. Karas
Titel: „*Massenspektrometrische Untersuchung von Membranproteinen durch den Einsatz weniger spezifischer Proteasen*“

9.6 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die „Massenspektrometrische Untersuchung von Membranproteinen durch den Einsatz weniger spezifischer Proteasen“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften, mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Offenbach, den 15. März 2010



Benjamin Rietschel