

**Entwicklung von massenspektrometrischen und
chromatographischen Mikro-Methoden zur
Analyse von Proteinphosphorylierungen**

Anwendungen im Bereich der Insulin-Signaltransduktion

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Alexander Beck

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2002
Dekan: Professor Dr. H. Probst
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. W. Voelter
2. Berichterstatter: Privat-Dozentin Dr. S. Stoeva

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Voelter in der Zeit von April 1998 bis März 2002 an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen (Abteilung Innere Medizin IV) und an der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Voelter danke ich herzlich für die Stellung des interessanten Themas, seine freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. H.U. Häring und Prof. Dr. E. Schleicher, Abteilung Innere Medizin IV der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen, für die großzügige Nutzung der Laborausstattung und das Interesse an meiner Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Lehmann für die vielen hilfreichen Diskussionen, zahlreiche konstruktive Anregungen und seine freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Bei den Herren Dr. M. Deeg und Dr. E. Schmidt möchte ich mich für die freundschaftliche und fruchtbare Zusammenarbeit im MS-Labor in Derendingen ganz herzlich bedanken.

Herrn Klaus Möschel und Herrn Dr. V. Strack danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und für die Bereitstellung der Proteinproben sowie Herrn E. Rapp für die Zusammenarbeit bei der IMAC/ESI-MS-Kopplung.

Frau P.D. Dr. S. Stoeva danke ich für zahlreiche konstruktive Anregungen und ihre freundliche Unterstützung, besonders zu Beginn der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. B. Houdali für die gute Kameradschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

In dankbarer Erinnerung bleibt mir die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit mit den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h.c. Voelter, mit Herrn Dr. J. Kohlbau, Herrn Dr. H. Echner, Frau M. Fecker und allen Auszubildenden sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.U. Häring und allen nicht namentlich genannten. Frau Doris Behr danke ich außerdem ganz herzlich für die Durchsicht des Manuskriptes.

Im Zeitraum dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

A. Beck, K. Möschel, M. Deeg, W. Voelter, H.U. Häring, E.D. Schleicher and R. Lehmann: Investigation of insulin receptor substrate-1 phosphorylation sites using negative-ion μ LC/ESI-sCID-MS hybrid-scan technique. J. Americ. Soc. Mass Spec., 2002, eingereicht.

R. Lehmann, U. Friess, H.-U. Häring, W. Voelter 2, H. Liebich1, and A. Beck: Investigation of a capillary electrophoretic approach for direct quantification of apolipoprotein A-I in serum. Electrophoresis, eingereicht 2002.

Lehmann R., Beck A., Möschel K., Schmidt E.K., Deeg M., Rapp E., Sun X.J., Kellerer M., Voelter W., Schleicher E.D., Häring H.U.: Protein kinase C- ζ specifically phosphorylates serine/threonine residues in the C-terminal part of insulin receptor substrate 1. Sign. Transduct.3, 1-6, Published Online: 24 May 2002

Beck A., Deeg M., Möschel K., Schmidt E.K., Schleicher E.D., Voelter W., Häring H.U., Lehmann R.: Alkaline liquid chromatography electrospray-ionization skimmer collision-induced dissociation mass spectrometry for phosphopeptide screening. Rapid Commun. Mass Spec. 15, 2324-2333, 2001.

Lehmann R., Beck A., Schindera T., Huber M., Rinkler T., Houdali B., Weigert C., Häring H.-U., Voelter W., Schleicher E.D.: Simultaneous, quantitative analysis of UDP-N-acetylglucosamine UDP-N-acetylgalactosamine, UDP-glucose and UDP-galactose in human peripheral blood cells, muscle biopsies and cultured mesangial cells by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis 21, 3010-3015, 2000.

Voelter W., Stoeva S., Echner H., Beck A., Schütz J., Lehmann R., Häring H.-U., Schleicher E., Mullen A.M., Casserly U., Troy D.J., Tsitsilonis O.E., Lymberi P., Baxevanis C.N., Papamichail M.: Analytical tools for rapid, sensitive, quantitative identification of potential meat quality markers. J. Prakt. Chem. 342: 179-191, 2000.

Beck A., Lehmann R., Gambaro G., Häring H.-U., Schleicher E.D., Voelter W., Ceol M.: Advances in reverse transcription polymerase chain reaction -Analysis of cellular mRNA levels of Transforming Growth Factor- β 1 by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Clin. Chem. Lab. Med., 37: 527-532, 1999.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1. ESI-Massenspektrometrie	3
2.1.1. Die Elektrospray-Ionisierung (ESI)	3
2.1.2. Mechanistische Aspekte der ESI und ihre Funktion als elektrolytische Flusszelle	4
2.1.3. Eigenschaften der ESI-Ionen	8
2.1.4. Ionisierung, Signalintensität und 'Wrong-Way-Round'	8
2.1.4.1. Die Ionisierung	8
2.1.4.2. Die Signalintensität	9
2.1.4.3. 'The Wrong-Way-Round'	9
2.1.5. Kopplung von LC und ESI-MS, Sensitivität und Miniaturisierung	10
2.1.5.1. HPLC-Säulen für LC/ESI-MS	10
2.1.5.2. Systeme mit niedrigen Flussraten	11
2.1.6. Mikro-ESI und Nanoelektrospray (NanoES)	12
2.1.7. Einfluss der Isotopie auf das Signal	14
2.2. Das Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer	15
2.2.1. Radiofrequenz Quadrupol-Massenfilter	15
2.2.2. Der Scanvorgang	16
2.2.3. Aufbau des Tripel-Quad-MS (Q1q2Q3)	17
2.2.4. Der rf-only Quadrupol (q) als Reaktionszelle	17
2.2.5. Besonderheiten und Scantechniken des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers	18
2.2.5.1. Die Niederenergie-Stoßaktivierung	18
2.2.5.2. Das allgemeine Konzept der Tandem-Massenspektrometrie	18
2.2.5.3. Die Produktionen-Analyse (Tochterionen-Scan)	19
2.2.5.4. Die Vorläuferionen-Analyse (<i>Parent-Ion-Scan</i>)	19
2.2.5.5. Die Neutralverlust-Analyse	20
2.2.6. API-CID	20
2.2.7. Hybrid-Scantechniken	21
2.3. Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	21
2.2.1. Desorption und Ionisierung	22
2.2.3. Flugzeit-Massenanalysatoren (TOF-MS)	22
2.4. MS-basierende Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen und Peptiden	24
2.4.1. Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen	24
2.4.2. Der Verdau im Gel	25
2.4.3. Identifizierung von Proteinen mit Hilfe des Peptidmassen-Mappings	26
2.4.4. Sequenzierung und Identifizierung von Peptiden mit Hilfe der Tandem-MS/MS	28
2.4.5. Mikro-Techniken zur Aufreinigung und Konzentration von Peptidmischungen	31
2.4.6. Bioinformatik und Proteinanalyse	31
2.4.7. Korrelation von MS/MS-Daten mit Peptidsequenzen aus Datenbanken	31
2.5. Phospho-Proteomics	33

2.5.1.	Konventionelle Analyse von Phosphoproteinen mit Hilfe der Radiomarkierung	33
2.5.2.	Konventionelle radioaktivitätsfreie Methoden	34
2.5.2.1.	Phosphoaminosäure-Detektion mit Antikörpern und Fluoreszenzmarkierung	34
2.5.2.2.	Edman-Sequenzierung und basenkatalysierte β -Eliminierung	35
2.5.3.	Massenspektrometrische Methoden	35
2.5.3.1.	Phosphopeptid-Mapping und Tandem-MS (MS/MS)	36
2.5.3.1.1.	Einsatz von anti-Phosphotyrosin-Antikörpern und $^{32/33}\text{P}$ -Markierung	36
2.5.3.1.2.	Umsetzung mit alkalischer Phosphatase	37
2.5.3.1.3.	Chemische Dephosphorylierung	37
2.5.3.1.4.	Gasphasen-Dephosphorylierung von Phosphopeptiden MS ³ -Experimente (MS/MS/MS)	37
2.5.3.2.	Spezifische Anreicherung von Phosphopeptiden mit Hilfe der IMAC	38
2.5.3.3.	Massenspektrometrische Scantechniken	38
2.5.3.3.1.	Die Phosphatgruppen-spezifische Fragmentierung	39
2.5.3.3.2.	Skimmer-CID	40
2.5.3.3.3.	Neutralverlust-Analyse	41
2.5.3.3.4.	Vorläuferionen-Analyse	41
2.6.	<i>Die Signaltransduktion des Insulinrezeptors</i>	42
2.6.1.	Glucose, Insulin und Diabetes	42
2.6.2.	Rezeptor-Tyrosinkinasen	42
2.6.3.	Der Insulinrezeptor	43
2.6.3.1.	Die Insulinbindung	44
2.6.3.2.	Die Transmembranregion	44
2.6.3.3.	Die Tyrosinkinasedomäne	44
2.6.3.4.	Die Juxtamembranregion	45
2.6.3.5.	Das COOH-terminale Ende	45
2.6.3.6.	Substrathypothese für die Insulin-Signaltransduktion	46
2.6.4.	Unmittelbare Substrate des Insulinrezeptors	46
2.6.5.	Die Familie der IRS-Proteine	46
2.6.5.1.	Die Funktion der IRS-Proteine	47
2.6.6.	Die Wechselwirkung zwischen dem Insulinrezeptor und den IRS-Proteinen	47
2.6.7.	IRS-1-Rezeptoren	49
2.6.8.	Signalmoleküle im Abwärtsstrom der IRS-Proteine	49
2.6.8.1.	Die Rolle der SH2-Proteine in der Insulin-Signalkette	49
2.6.8.2.	Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3 Kinase), PKB/AKT und PKC- ζ	49
2.6.8.3.	Phosphotyrosin-Phosphatase SHP2	52
2.6.8.4.	Grb-2	52
2.6.8.5.	Fyn und nck	52
2.6.9.	Die Rolle der Tyrosinphosphatasen in der Insulin-Signaltransduktion	52
2.6.10.	Modulation der Insulin-Signaltransduktion durch Serin/Threoninkinasen	53
2.6.11.	Die PKC-Familie	53
3.	<i>Themenstellung</i>	56

4. Experimenteller Teil	58
4.1. Materialien	58
4.1.1. Chemikalien	58
4.1.2. Enzyme, Proteine und Peptide	58
4.1.3. Chromatographie	59
4.1.4. Kapillarelektrophorese	59
4.1.5. Verbrauchsmaterial	59
4.2. Geräte	59
4.2.1. Triple-Quadrupol Massenspektrometer	59
4.2.2. MALDI-TOF Massenspektrometer	60
4.2.3. HPLC	60
4.2.4. Kapillarelektrophorese	60
4.2.5. Sonstige Laborausstattung	61
4.3. Methoden	61
4.3.1. SDS-PAGE	61
4.3.1.1. Trenngel 10 %	61
4.3.1.2. Sammelgel 6 %	61
4.3.1.3. Denaturierungspuffer	61
4.3.1.4. Lösung zum Anfärben der Gele	62
4.3.1.5. Lösung zum Entfärben der Gele	62
4.3.2. Verdau	62
4.3.2.1. Aufbewahrung der Proteasen	62
4.3.2.2. Allgemeine Vorschrift zur tryptischen Spaltung von β -Casein in-Lösung	62
4.3.2.3. Verdau im Gel	62
4.3.2.3.1. Allgemeine Vorschrift für den enzymatischen Verdau im Gel mit Reduktion und Alkylierung (4-Vinylpyridin) CBB-gefärbter Proteinbanden	62
4.3.2.3.2. Allgemeine Vorschrift für den enzymatischen Verdau im Gel ohne Reduktion und Alkylierung CBB-gefärbter Proteinbanden	64
4.3.2.3.3. Allgemeine Vorschrift für den enzymatischen im Gel- Verdau Silber-gefärbter Proteinbanden	64
4.3.3. Bestimmung der Cerenkov-Strahlung des tryptisch im Gel- gespaltenen [³² P] markierten HIR	64
4.3.4. RP-Mikro- <i>Tip</i> -Entsalzung	64
4.3.4.1. Herstellung der RP-Mikro- <i>Tips</i>	64
4.3.4.2. Allgemeine Vorschrift zur Entsalzung mit RP-Mikro- <i>Tips</i>	65
4.3.5. IMAC-Mikro- <i>Tip</i> -Phosphopeptid-Aufreinigung	65
4.3.5.1. Herstellung und Aktivierung der IMAC-Mikro- <i>Tips</i>	65
4.3.5.2. Allgemeine Vorschrift für die IMAC-Mikro- <i>Tip</i> -Phosphopeptid- Aufreinigung	65
4.3.6. Kapillarelektrophoretische Bestimmungen	65
4.3.6.1. CZE-Bestimmung zur Etablierung der RP-Mikro- <i>Tips</i>	66
4.3.6.2. CZE-Bestimmung von tryptisch gespaltenem β -Casein	66
4.3.6.3. CZE-Bestimmungen zur Etablierung der Mikro-IMAC- <i>Tips</i>	66
4.3.7. Allgemeine Vorschrift für die RP-HPLC mit UV-Detektion	66
4.3.8. Ermittlung des μ RP-HPLC-Cerenkov-Chromatograms von [³² P]- markiertem und tryptisch im Gel gespaltenem HIR	67
4.3.9. MALDI-Massenspektrometrie	67

4.3.9.1.	Präparierung der mikrokristallinen Matrix	67
4.3.9.2.	Aufnahme der MALDI-Massenspektren	68
4.3.10.	ESI-Massenspektrometrie	68
4.3.10.1.	Allgemeiner Betrieb, Kalibration und Feinabstimmung	68
4.3.10.2.	Allgemeine Vorschrift zur Spritzenpumpeninfusion	68
4.3.10.3.	Allgemeine Vorschrift zur NanoES-MS	69
4.3.10.4.	μ LC-MS-Experimente	69
4.3.10.5.	TFA-saure positiv/negativ-Ionen- μ LC/ESI-sCID-MS- Hybrid-Scantechnik	69
4.3.10.6.	Alkalische negativ-Ionen- μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik	70
4.3.10.7.	Mikro-Spraytechnik für die alkalische negativ-Ionen- μ LC/ESI-MS-Peptidmassen-Bestimmung und Fraktionierung	70
4.3.10.8.	μ IMAC/MS-Analysen von Phosphopeptiden	70
4.3.10.9.	SEQUEST	71
4.3.10.10.	Internetseiten	72
5.	<i>Ergebnisse</i>	74
5.1.	<i>Im-Gel-Verdau SDS-PAGE getrennter Proteine</i>	74
5.1.1.	Durchführung des Experimentes	74
5.1.2.	Reduktion, Alkylierung und Verdau	75
5.1.3.	Elution der Peptide	76
5.1.4.	Im Gel-Verdau und μ LC/ESI-MS-Peptid-Mapping der HIR- β -UE	77
5.2.	<i>Mikro-Techniken zur Aufreinigung und Konzentration von Peptiden</i>	83
5.2.1.	Aufbau und Befüllung der Mikro-Tips	83
5.2.2.	RP-Mikro-Tips zur raschen Entsalzung von Proteinverdau	84
5.2.3.	RP-Mikro-Tip-Entsalzung eines tryptischen β -Caseinverdau	85
5.2.4.	IMAC-Mikro-Tips zur raschen Anreicherung von Phosphopeptiden	86
5.3.	<i>NanoES-MS- und MS/MS-basierende Identifizierung und Charakterisierung eines im-Gel verdauten Proteins</i>	88
5.3.1.	NanoES-MS und MS/MS-Analyse der tryptisch im Gel gespaltenen HIR-Kinasedomäne (Aminosäuren 984-1259)	88
5.3.2.	Auswertung der ermittelten Peptidmassen	90
5.3.3.	Proteinidentifizierung mittels Peptid-Mapping	92
5.3.3.1.	Vergleichende Übersicht der Resultate des Peptid-Mapping	92
5.3.3.2.	Die ProFound-Identifizierung	93
5.3.4.	Proteinidentifizierung mittels Fragmentionendaten	97
5.3.4.1.	Das Resultat der Mascot-Identifizierung	98
5.3.4.2.	Das Resultat der SEQUEST-Identifizierung	99
5.4.	<i>Analyse von Phosphopeptiden mittels Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechnik</i>	101
5.4.1.	Positiv-Ionen-ESI-MS/MS phosphorylierter Peptide	101
5.4.2.	H ₃ PO ₄ -Neutralverlust-Scantechnik	103
5.4.3.	Negativ-Ionen-NanoES-MS/MS phosphorylierter Peptide	104
5.4.4.	Die m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik	109
5.5.	<i>Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS und SEQUEST-Analyse phosphorylierter Peptide</i>	110
5.5.1.	Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS-Analyse und SEQUEST-Interpretation des Tyrosin-phosphorylierten und nicht-phosphorylierten	110

pp60 c-src(521-533)-Peptidfragmentes	
5.5.2. Positiv-Ionen-NanoES-MS ³ und SEQUEST-Analyse des HSP(81-94)-Peptids	113
5.6. NanoES-MS-Analyse der Phosphopeptide eines tryptischen β-Casein-verdaus	117
5.6.1. Die Phosphopeptide des tryptischen β -Caseinverdaus	117
5.6.2. Positiv-Ionen-NanoES-MS unter sauren Bedingungen	118
5.6.3. Detektion der Phosphopeptide mit Hilfe der Neutralverlust-Scantechnik (49 Da)	119
5.6.4. Negativ-Ionen-NanoES-MS unter sauren Bedingungen	120
5.6.5. Detektion der Phosphopeptide mittels m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik unter sauren Bedingungen	121
5.6.6. Negativ-Ionen-NanoES-MS unter alkalischen Bedingungen	122
5.6.7. Detektion der Phosphopeptide mittels m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik unter alkalischen Bedingungen	123
5.6.8. Lokalisierung einer Phosphorylierungsstelle des β -Caseins	124
5.7. On-line-μIMAC/ESI-MS- und off-line-μIMAC/NanoES-MS-Analyse von Phosphopeptiden	127
5.7.1. Versuchsanordnung der off-line- μ IMAC/NanoES-MS und on-line- μ IMAC/ESI-MS	127
5.7.2. Identifizierung der Phosphopeptide eines tryptischen β -Caseinverdaus mittels off-line- μ IMAC/NanoES-MS	128
5.7.3. On-line- μ IMAC/ESI-MS-Phosphopeptid-Analyse	129
5.8. Detektion von Phosphopeptiden mittels API-CID	134
5.8.1. μ LC/ESI-API-CID-MS unter TFA-sauren Bedingungen	134
5.8.1.1. Abhängigkeit der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Signalintensitäten vom Oktapol-Offset (API-CID) unter TFA-sauren Bedingungen	135
5.8.1.2. μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik unter TFA-sauren Bedingungen	136
5.8.1.3. Untersuchung eines tryptischen β -Caseinverdaus mittels μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik unter TFA-sauren Bedingungen	137
5.8.1.4. Untersuchung eines tryptischen Verdaus von dephosphoryliertem β -Casein mittels μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik unter TFA-sauren Bedingungen	140
5.8.2. μ LC/ESI-API-CID-MS unter alkalischen Bedingungen	144
5.8.2.1. pH-Wert- und API-CID-Offset-abhängige Bildung der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Markerionen	145
5.8.2.2. Bildung der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen in Abhängigkeit vom Q0-Offset unter alkalischen (pH 10,5) und sauren (pH 2,5) Bedingungen	146
5.8.2.3. Sensitivität der alkalischen negativ-Ionen-API-CID-Hybrid-Scan-Methode	149
5.8.2.4. Untersuchung eines tryptischen β -Caseinverdaus mittels negativ-Ionen- μ LC/ESI-API-CID-MS und μ LC/ESI-MS unter alkalischen Bedingungen	151
5.8.2.5. μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik unter alkalischen Bedingungen	154
5.9. 'In vivo'-Phosphorylierung der HIR-b-UE und deren Einfluss auf die	156

<i>Substrat- und Autophosphorylierung</i>	
5.9.1.	Untersuchung des Einflusses der Serinreste 1177/78/82 des HIR auf die <i>'in vivo'</i> -Substrat- und Autophosphorylierung 156
5.9.1.1.	SDS-PAGE des immunpräzipitierten HIR 157
5.9.1.2.	UV- und Cerenkov-Chromatogramme der tryptisch im-Gel gespaltenen Wildtypen und Mutanten der HIR- β -UE 158
5.9.1.3.	MALDI-TOF-MS der tryptischen Phosphopeptid-Fraktionen 161
5.9.2.	<i>'In vivo'</i> -NanoES-MS-Vorläuferionen-Phosphopeptid-Analyse der HIR- β -UE 164
5.9.2.1.	SDS-PAGE, Lys-C-Verdau im Gel und μ RP-HPLC-Trennung der <i>'in vivo'</i> phosphorylierten HIR- β -UE 164
5.9.2.2.	Identifizierung der untersuchten Proteinbande mittels <i>off-line</i> -NanoES-MS/MS 166
5.9.2.3.	<i>Off-line</i> -NanoES-MS-Phosphopeptid-Screening 168
5.10.	<i>Untersuchung der 'in vitro'-Substratspezifität verschiedener Proteinkinase C-Subtypen</i> 176
5.10.1.	MS-Analyse des <i>'in vitro'</i> mit den PKC-Isoformen α , β I, β II, θ , ι umgesetzten MARCKS-PSD-ständigen Peptids 176
5.10.1.1.	μ LC/ESI-MS-Analyse des Kontrollexperimentes 176
5.10.1.2.	μ LC/ESI-MS-Analyse des <i>'in vitro'</i> mit PKC- β I umgesetzten MARCKS-PSD ständigen Peptids 178
5.10.1.3.	μ LC-ESI-MS- und NanoES-MS-Analyse von <i>'in vitro'</i> mit PKC- ι umgesetztem MARCKS-PSD-ständigem Peptid 179
5.10.1.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse 181
5.11.	<i>Identifizierung der Serinphosphorylierungsstellen von 'in vitro' mit den Proteinkinase C-Isoformen βI und -ζ umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteinen</i> 183
5.11.1.	Das GST-IRS-1 ^{Nk} Fusionsprotein 183
5.11.2.	<i>'In vitro'</i> -Phosphorylierung, SDS-PAGE, enzymatische Spaltung und Isolierung der phosphorylierten Peptide 184
5.11.3.	2-D-RP-LC und massenspektrometrische Detektion der Phosphopeptide 184
5.11.4.	Detektion der tryptischen Phosphopeptide des <i>'in vitro'</i> mit PKC- ζ umgesetzten GST-IRS-1 ^{Nk} -Fusionsproteins 185
5.11.4.1.	LC-Trennung und Fraktionierung des tryptisch gespaltenen Fusionsproteins 185
5.11.4.2.	μ LC/MikroESI-MS-Analyse und Fraktionierung der Phosphopeptide 186
5.11.5.	Detektion der tryptischen Phosphopeptide des <i>'in vitro'</i> mit PKC- β I umgesetzten GST-IRS-1 ^{Nk} -Fusionsproteins 190
5.11.5.1.	LC-Trennung und Fraktionierung des tryptisch gespaltenen Fusionsproteins 191
5.11.5.2.	μ LC/MikroESI-MS-Analyse und Fraktionierung der Phosphopeptide 191
5.11.6.	<i>Off-line</i> -NanoES-MS ³ -Analyse der tryptischen Phosphopeptide des <i>'in vitro'</i> mit PKC- β I umgesetzten GST-IRS-1 ^{Nk} -Fusionsproteins mittels Ionenfallen-MS 194
5.11.6.1.	Sequenzierung mit dem Ionenfallen-Massenspektrometer 194
5.11.6.2.	Zusammenfassung der Ergebnisse 197

6. Diskussion	198
6.1 Verdau im Gel	198
6.1.2 Im Gel-Verdau und μ LC/ESI-MS-Peptid- <i>Mapping</i> der HIR- β -UE	199
6.2 Mikro-Techniken zur Aufreinigung und Konzentration von Peptiden	201
6.2.1. RP-Mikro- <i>Tips</i>	201
6.2.2. IMAC-Mikro- <i>Tips</i>	202
6.3. NanoES-MS und NanoES-MS/MS basierende Proteinidentifizierung	202
6.3.1. Proteinidentifizierung mittels Peptid- <i>Mapping</i>	203
6.3.3. Proteinidentifizierung mittels Fragmentionendaten	204
6.4. Analyse von Phosphopeptiden mit Hilfe der Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken	205
6.4.1. Die Neutralverlust-Scantechnik	206
6.4.2. Die Vorläuferionen-Scantechnik	207
6.5. Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS und -MS/MS/MS phosphorylierter Peptide	210
6.6. Analyse eines tryptischen b-Caseinverdaus mittels NanoES-MS	212
6.7. On-line-μIMAC/ESI-MS- und off-line-μIMAC-NanoES-MS-Analyse von Phosphopeptiden	213
6.8. Detektion von Phosphopeptiden mit Hilfe des API-CID	214
6.9. 'In vivo'-Phosphorylierung der HIR-b-UE und deren Einfluss auf die Substrat- und Autophosphorylierung	218
6.9.1. Untersuchung des Einflusses der Serinreste 1177/78/82 des HIR auf die 'in vivo'-Substrat- und Autophosphorylierung	218
6.9.2. 'In vivo'-NanoES-MS-Vorläuferionen-Analyse der HIR- β -UE	219
6.10. Untersuchung der 'in vitro'-Substratspezifität verschiedener PKC-Subtypen	221
6.11. Identifizierung der Serinphosphorylierungsstellen von 'in vitro' mit PKC-bI und -z umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteinen	222
7. Zusammenfassung	226
8. Literatur	229

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
A.D.	Aussendurchmesser
α PY	Antiphosphotyrosin-Antikörpern
API	<i>Atmospheric pressure ionization</i>
APS	<i>adaptor protein containing PH and SH2 domains</i>
best.	bestimmt
BPC	<i>Base peak chromatogram</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CAD	kollisionsaktivierter Zerfall (<i>collision-activated dissociation</i>)
CID	kollisionsaktivierter Zerfall (<i>collision-induced dissociation</i>)
CPM	<i>Counts per minute</i>
CRM	<i>Charged-residue model</i>
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
Dabsyl	4'-Dimethylaminoazobenzol
DAG	Diacylglycerol
dd	doppelt destilliert
DE	<i>Delayed extraction</i>
dpm	<i>Dots per minute</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
EtOH	Ethanol
FAB	<i>Fast atom bombardement</i>
f.s.	<i>fused silica</i>
FTICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
Gab1	<i>Grb2-associated binder-1</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
Gl.	Gleichung
GLUT-4	Glucosetransporter 4
Grb-2	<i>Growth factor receptor binding protein</i>
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HIR	humaner Insulinrezeptor
HIRKD	Kinasedomäne des humanen Insulinrezeptors
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HSP	Hitzeschock-Peptid
ICL	<i>Instrument control language</i>
I.D.	Innendurchmesser
IDA	Iminodiacetat
LAR	<i>Leucocyte common antigen-related</i>
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
IEM	<i>Ion evaporation model</i>

IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IMAC	immobilisierte Metallionen Affinitäts-Chromatographie
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JM	Juxtamembrandomäne
JNK	Jun NH ₂ -terminale Kinase
Kap.	Kapitel
KD	Kinasedomäne
LC	<i>Liquid chromatography</i> , Flüssigkeits-Chromatographie
LSIMS	<i>Liquid secondary ion mass spectrometry</i>
LIF	<i>Laser-induced fluorescence</i>
M _w	Molekulargewicht
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisierung
MAPK	MAP-Kinase
MARCKS	Myrisoyliertes Alanin-reiches C-Kinase-Substrat
MC	<i>Missed cleavage</i> , Metallchelate
MCP	<i>Multiply charged peptides</i>
MeOH	Methanol
Δm	Massendifferenz
mi	monoisotopisch
Mod.	Modifikation
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
MSos	<i>Mammalia son of sevenless</i>
NanoES	Nano-Elektrospray
Nck	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
NTA	Nitrilotriacetat
ODS	Octadecylsilica
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PH	Pleckstrin-Homologe-Domäne
pI	isoelktrischer Punkt
PI	Phosphatidyl-Inosit
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP	Phosphatidyl-Inosit-Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB/AKT	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ppm	<i>parts per million</i>
PSD	<i>Postsorce decay</i>
PTB	Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne
PTEN	<i>Tumor suppressor phosphatase</i>
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Quadrupol-Massenfilter
q	Quadrupol-Reaktionszelle

QET	<i>Quasi-equilibrium theory</i>
raf-1	MAPK Kinase Kinase
RE	Reflektron
rf	Radiofrequenz
RIC	<i>Reconstructed ion chromatogram</i>
RP	<i>Reversed phase</i> , Umkehrphase
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Skimmer
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shc	<i>Src homology 2/α-collagen-related protein</i>
SH3	Src-homolge Domäne 3
SH2	Src-homolge Domäne 2
SHP	SH2-homologe Protein Tyrosine Phosphatase
SIDT	<i>Single ion droplet theory</i>
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
SIRP	<i>Signal regulatory protein</i>
S/N	Signal-zu-Rauschen
SRM	<i>Selected-reaction monitoring</i>
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Th	Thomson (<i>m/z</i>)
theoret.	theoretisch
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i> , Dünnschicht-Chromatographie
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOF	<i>Time-of-flight</i> , Flugzeit
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen-zu-Volumen-Verhältnis
WWW	<i>world wide web</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

In der vorliegenden Arbeit sind Begriffe aus dem Englischen (z.B. *Mapping*) kursiv dargestellt. Lateinische Begriffe (z.B. '*in vivo*') sind kursiv in Anführungszeichen dargestellt.

1. Einleitung

Aufgrund ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten erlangte die Massenspektrometrie (MS) im Laufe der letzten einhundert Jahre eine herausragende Stellung in vielen Bereichen der Physik, Chemie Biochemie. Jedoch erst mit der Entwicklung der FAB-Ionisierung (*fast atom bombardement*) im Jahr 1980, konnte die Massenspektrometrie auch zur Analyse von Biomakromolekülen eingesetzt werden [1,2]. Die Entwicklung der noch schonenderen Elektrospray-Ionisierung (ESI) [3] sowie der Matrix-assistierten Laser-Desorptions/Ionisierung (MALDI) [4] führte schließlich dazu, dass sich die biologische Massenspektrometrie zu einem der wichtigsten proteinanalytischen Verfahren bei der Untersuchung der strukturellen Eigenschaften von Biopolymeren entwickelte [5].

Durch die *high-throughput* DNA-Sequenzierung kam es im Laufe der letzten 10 Jahre zu einem exponentiellen Anstieg der öffentlich zugänglichen Genomdaten. Bislang wurden die Genome von mehr als 20 Modellorganismen sowie der Großteil des menschlichen Erbgutes sequenziert. Der Großteil der in Gen-Datenbanken abgelegten Informationen basiert auf cDNA sowie anderen genetischen Daten. Dagegen findet man nur wenige Daten über den Expressionsgrad, die Lokalisation, Funktion, Regulation und posttranslationalen Modifikationen der exprimierten Proteine. Im Bereich der modernen Proteom-Forschung ermöglichen die in den Gendatenbanken abgelegten Sequenzdaten jedoch neue proteinbiochemische Ansätze. Der Begriff des Proteoms [6] wurde 1995 eingeführt und später definiert als "die Gesamtheit aller Proteine, welche von einer Zelle oder einer Zellkultur zu einem definierten Zeitpunkt expremiert werden" [7].

Zellen reagieren auf eine Reihe unterschiedlicher extrazellulärer Signale (Wachstumsfaktoren, Hormone, usw.). Die Signale aktivieren die Rezeptoren an der Zelloberfläche und lösen dadurch Kaskaden intrazellulärer Ereignisse aus, wie z.B. postribosomale Modifikationen, Protein-Protein-Wechselwirkungen, Induktion und/oder Repression der Genexpression. Mit Hilfe der Biologischen Massenspektrometrie können die Proteine, welche an diesen komplexen regulatorischen Signalwegen beteiligt sind identifiziert und charakterisiert werden. Auf diesem Weg trägt die Massenspektrometrie direkt zur grundlegenden Aufklärung und zum Verständnis der Signal-Netzwerke bei. Ist das Genom eines Organismus aufgeklärt, kann mit Hilfe genetischer und biochemischer Analysenverfahren die Biologie dieses Organismus untersucht werden. Bei der Expression eines Gens wird zuerst mRNA gebildet (Transkription), welche dann in ein Protein übersetzt wird (Translation). Die gebildete Proteinmenge kann somit auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene kontrolliert werden. Um eine Signaltransduktionskette vollständig verstehen zu können, müssen daher alle beteiligten Komponenten bekannt sein.

Zu den wichtigsten Methoden, zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, zählen 1D- und 2D-Gelelektrophorese, biologische Massenspektrometrie und Bioinformatik. Der Hauptteil der in höheren eukaryontischen Zellen vorkommenden Proteine liegt jedoch modifiziert vor. Häufig sind diese Modifikationen direkt für die Funktion der Proteine verantwortlich [8]. Nahezu jede Proteinmodifikation bewirkt eine Molekulargewichtsänderung des betroffenen Aminosäurerestes. Aufgrund ihrer hohen Massengenauigkeit, Sensitivität und ihrer Fähigkeit, komplexe Mischungen analysieren zu können, ist die biologische Massenspektrometrie deshalb bei der Charakterisierung posttranslationaler Proteinmodifikationen die Methode der Wahl.

Eine der wichtigsten und wahrscheinlich auch eine der bekanntesten posttranslationalen Proteinmodifikation ist die reversible Proteinphosphorylierung [9]; sie reguliert grundlegende zelluläre Ereignisse, unter anderem Wachstum, Teilung und Differenzierung von Zellen, die Signaltransduktion und die Genexpression [10-16]. Schätzungen zufolge sind in Säugerzellen mehr als 30 % aller Proteine phosphoryliert, wobei etwa 90 % aller zellulären

Phosphorylierungen an Serin-, 9,9 % an Threonin- und nur 0,1 % an Tyrosinresten vorkommen [17]. Nahezu alle Phosphoproteine, insbesondere diejenigen, welche in die Signaltransduktion einbezogen werden, liegen zellulär nur sehr gering konzentriert vor und weisen zudem eine äußerst niedrige Phosphorylierungsstöchiometrie auf. Proteinphosphorylierungen können deshalb nur mit Hilfe extrem sensitiver Analyseverfahren (ESI- und MALDI-MS) untersucht werden. Da man heute weiß, dass eine gestörte Signaltransduktion bei einem Organismus in der Regel auch zu dessen Erkrankung führt, rückte die Untersuchung der Signaltransduktionswege auch im Bereich der biomedizinischen Forschung verstärkt in den Vordergrund.

Man nimmt an, dass nur ein geringer Anteil aller humanen Erkrankungen unmittelbar auf einen einzigen Gendefekt zurückzuführen sind (ca. 2 %) [18]. Auch im Falle des Typ 2 Diabetes (nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus) trägt ein besseres Verständnis der Signalwirkung des Insulinrezeptors zur Entwicklung von Behandlungsmethoden dieser Erkrankung bei [19]. Obwohl viele Proteine gefunden wurden, welche am Insulin-Signaltransduktionsweg beteiligt sind (der Insulinrezeptor enthält mindestens 13 Erkennungsstellen unterschiedlicher Substrate oder Adapterproteine [20]), gibt es dennoch keine übereinstimmende Vorstellung über einen generellen Regulationsweg. Insbesondere die negative Regulation des Insulinrezeptors, entweder durch Tyrosinphosphatasen und/oder durch Ser/Thr-Kinasen deutet darauf hin, dass gleichzeitig mehrere unterschiedliche Mechanismen wirksam sind [19]. Somit kann die Biologische Massenspektrometrie im Falle des Typ 2 Diabetes nicht nur zur Aufklärung der Insulin-Signaltransduktionswege, sondern auch zur detaillierten Untersuchung von Regulationsstörungen, insbesondere die der Protein-Phosphorylierung, eingesetzt werden.

2. Allgemeiner Teil

2.1. ESI-Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Analyse von Biomolekülen, unter anderem von Peptiden und Proteinen, müssen polare oder geladene Moleküle in Gasphasenionen überführt werden [21,22]. Schon kurz nach der Einführung der beiden Ionisierungsverfahren ESI (Elektrospray-Ionisierung) und MALDI (Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisierung) konnten diese zur Ionisierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt werden [3,22]. Als kontinuierliches Ionisierungsverfahren konnte die ESI dabei sehr gut mit den bestehenden Quadrupol- und FTICR-Massenspektrometern gekoppelt werden [23-25]. Ebenso rasch gelang die Kopplung von MALDI, einer pulsierenden Ionisierungstechnik, mit Flugzeit-Massenspektrometern (TOF, *time-of-flight*) [26].

2.1.1. Die Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Als Elektrospray bezeichnet man die Zerstreuung einer Flüssigkeit unter dem Einfluss eines elektrostatischen Feldes in viele kleine geladene Tröpfchen. Die Entwicklung des Elektrospray-Verfahrens begann Ende der 60er Jahre [27-29]. Indem sie eine Lösung vom Ende einer elektrisch geladenen Kapillare versprühten, konnten Malcolm Dole *et al.* [27] als erste die Gasphasenionen-Generierung von Makromolekülen beobachten. Der eigentliche Durchbruch der Elektrospray-Technik erfolgte jedoch erst Ende der 80er Jahre. Durch die Kopplung der ESI-Quelle mit einem Quadrupol-Massenspektrometer gelang Fenn *et al.* die Analyse großer Proteine infolge der Ausbildung mehrfachgeladener Analytionen während der Elektrospray-Ionisierung (ESI) [3,22,30-35].

Bei der Elektrospray-Ionisierung bewirkt eine hohe Potentialdifferenz zwischen einer mit Flüssigkeit durchspülten Kapillare und dem Einlass ins Massenspektrometer die Bildung von Ionen. An der aus der Kapillarspitze austretenden Flüssigkeit bildet sich unter dem Einfluss des elektrischen Feldes ein feiner Nebel hochgeladener Tröpfchen, welche auf ihrem Weg zum Massenanalysator einen Potential- und Druckgradienten durchqueren müssen. Durch Verdampfung des Lösungsmittels und Coulomb-Explosionen (Zerfall der Tropfen aufgrund hoher Ladungsdichte) verringern die Tröpfchen dabei ihre Größe bis schließlich vollständig desolvatisierte Ionen vorliegen. Je nach MS-Gerätehersteller werden unterschiedliche Verfahren zur Bildung der desolvatisierten Ionen eingesetzt. Am häufigsten wird entweder ein Badegas oder eine beheizte Kapillare verwendet [3]. Je nach Flussrate kann die Vernebelung der aus der Kapillare austretenden Lösung durch den *sheath-flow* eines Vernebelungsgases verbessert werden [33]. Mit Hilfe einer Skimmer-Einheit werden die vollständig oder teilweise desolvatisierten Ionen schließlich fokussiert und konzentriert. Für die massenspektrometrische Detektion der Ionen steht heutzutage eine große Anzahl unterschiedlicher Massenanalysatoren zur Verfügung [33,36]. Eine der Haupteigenschaften des ESI-Verfahrens ist die Bildung hochgeladener unfragmentierter Ionen. Das Auftreten von Ionen mit verringerten m/z -Werten ermöglicht somit auch die Anwendung von Quadrupol-Massenanalysatoren. Bei einem Quadrupol-MS kann das tatsächliche Molekulargewicht eines Ions deshalb aus den unterschiedlichen Ladungszuständen der Molekülionen bestimmt werden. Dagegen kann bei hochauflösenden Massenanalysatoren (z.B. FTICR) das tatsächliche Molekulargewicht eines Ions anhand des Isotopenmusters eines seiner Molekülionen ermittelt werden. Ein großer Nachteil des ESI-Verfahrens ist seine geringe Toleranz gegenüber Verunreinigungen wie z.B. Salzen und Puffern. Die Verunreinigungen können sowohl die Unterdrückung von Analytionen als auch die Bildung von Adduktionen bewirken. Vor der eigentlichen ESI-MS-Bestimmung erfolgt deshalb in der Regel eine LC-

Reinigung der Probe. Ein großer Vorteil der ESI-MS stellt dabei ihre einfache Kopplung (*on-line*) mit unterschiedlichen Trenntechniken wie Flüssigchromatographie (LC, *Liquid Chromatography*) oder Kapillarelektrophorese (CE, *Capillary Electrophoresis*) dar [37,38]. Die Eigenschaften der ESI-MS, u.a. der geringe Probenverbrauch, die hohe Empfindlichkeit und die relativ einfache Handhabung führten dazu, dass die ESI-MS heutzutage eine der wichtigsten Analysemethoden der modernen Bioanalytik darstellt [39-47].

2.1.2. Mechanistische Aspekte der ESI und ihre Funktion als elektrolytische Flusszelle [22,48-52]

Der ESI-Prozess kann formal in vier Schritte eingeteilt werden:

- (1) Dispersion der Probenlösung, Bildung elektrisch geladener Tröpfchen
- (2) Zunahme der Oberflächenladung der Tröpfchen durch kontinuierliches Verdampfen des Lösungsmittels
- (3) wiederholter spontaner Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen, infolge Coulomb-Explosionen
- (4) Transport und Desolvatisierung der Ionen von dem unter Atmosphärendruck stehenden Ionisationsbereich in den Vakuumbereich des Massenspektrometers.

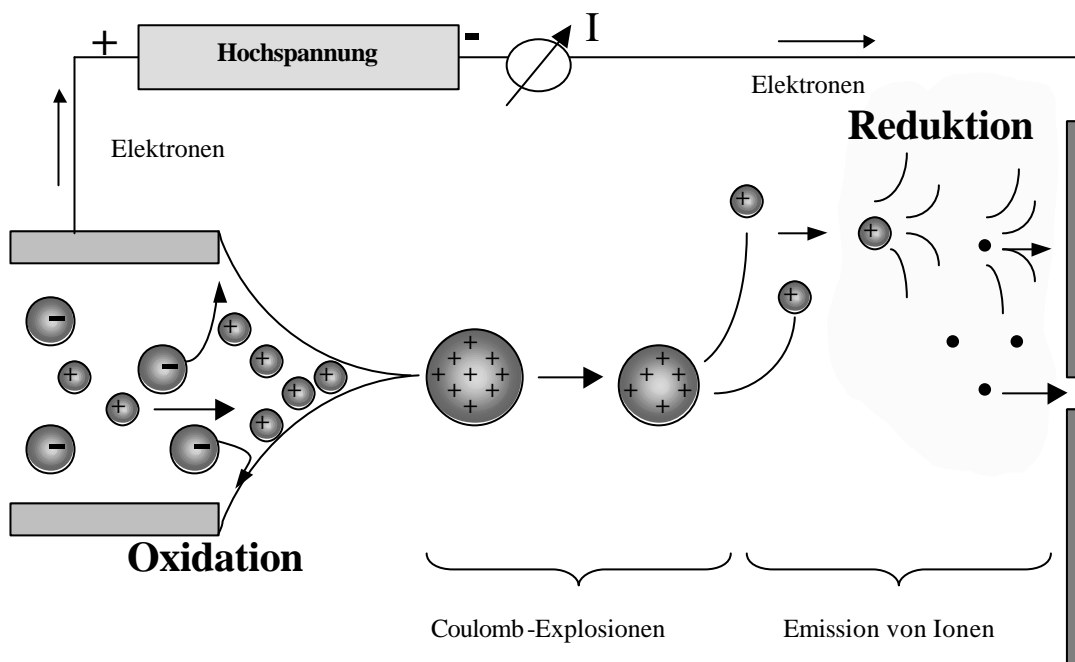
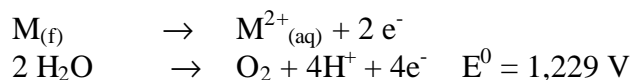


Abb. 2.1. Schematische Darstellung der Ionenbildung bei der Elektrospray-Ionisierung. Das sehr hohe elektrische Feld bewirkt entsprechend der Polarität der Spannungsquelle die Anreicherung der positiv geladenen Elektrolytionen am Ende der ESI-Kapillare. An der austretenden Flüssigkeit bildet sich ein Flüssigkeitskegel (Taylor-Konus), von dem sich wiederum ein feines Flüssigkeitsfilament ausbildet. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels verringern die Tröpfchen des Filamentes ihre Größe bis sie schließlich aufgrund von Coulomb-Explosionen zerfallen. Der Ladungsfluss wird über die elektrochemischen Oxidationsreaktionen an der mit der Lösung in Kontakt stehenden, positiven Elektrode (Anode) aufrechterhalten.

Legt man unter Atmosphärendruck zwischen eine mit einer Probenflüssigkeit gefüllten Kapillare und einem Massenspektrometer ein hohes elektrisches Feld an, so kann das elektrische Feld E_c im Bereich der Kapillarspitze (Gegenelektrode ist im Vergleich zur Arbeitselektrode groß und planar) annähernd nach folgender Gleichung berechnet werden [53-55]:

$$E_c = \frac{2V_c}{r_c \ln(4d/r_c)} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Dabei ist r_c (10-100 μm) der äußere Radius der Kapillare, V_c (0,5-5 kV) das angelegte elektrische Potential und d der Abstand zwischen Kapillarspitze und Gegenelektrode. Die aus der ESI-Kapillare austretenden solvatisierten Ionen der Probenlösung erfahren als Reaktion auf das angelegte elektrische Feld eine elektrophoretische Beschleunigung. Im positiven Ionenmodus migrieren die Anionen in Richtung der Metall-ESI-Kapillare, die Kationen migrieren von der Metallkapillare weg in Richtung der Gegenelektrode (Abb. 2.1). An der Flüssigkeitsfront kommt es aufgrund der Potentialdifferenz zur Anreicherung positiver Ladungen. Die durch das elektrische Feld bewirkte Beschleunigung der positiven Ionen wird durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit ausgeglichen. Bei einer ausreichend hohen elektrischen Feldstärke bildet sich am Kapillarende ein dynamischer Flüssigkeitskegel, der sogenannte Taylor-Kegel aus [56]. Aufgrund der hohen Potentialdifferenz zwischen ESI-Kapillare und Gegenelektrode kommt es an der Grenzfläche der ESI-Kapillare (zwischen Metall und Flüssigkeit) zu folgenden elektrochemischen Oxidationsreaktionen:



Die geladenen Ionen erreichen kontinuierlich die Gegenelektrode, an der nun eine zweite elektrochemische Reaktion stattfindet (im positiven Ionenmodus eine Reduktion). Damit endet ein spezieller Typ eines elektrischen Kreislaufes. Im Falle der negativen Ionisierung erfolgt die Ladungstrennung in umgekehrter Weise (Reduktionsreaktionen an der Metall-ESI-Kapillare). Bei einer ESI-Quelle handelt es sich nach Kebarle *et al.* [55,57] deshalb um einen speziellen Typ einer elektrolytischen Zelle, bei welcher die Elektrolyse das Ladungsgleichgewicht für die kontinuierliche Bildung der geladenen Tröpfchen aufrechterhält. In der ESI-Kapillarspitze erfolgt die Trennung der Ionen im wesentlichen elektrophoretisch. Der Ladungstransport findet dann zunächst in Form geladener Tröpfchen, anschließend in Form von Gasphasenionen statt (s.u.). Bei wässrigen Lösungen führen die elektrochemischen Reaktionen zur Veränderung des pH-Wertes und haben dadurch auch einen direkten Einfluss auf das Massenspektrum [58].

Bei einer ausreichend hohen elektrischen Feldstärke verhält sich der Taylor-Konus stabil und emittiert von seiner Spitze ausgehend einen kontinuierlichen, filamentartigen, nur wenige Mikrometer dicken Flüssigkeitsstrom. Mit abnehmender Entfernung zur Gegenelektrode wird die Ladungsdichte des Filamentes schließlich so groß, dass die heraustretende Flüssigkeit nicht mehr durch die Oberflächenspannung zusammengehalten werden kann. Das Filament wird instabil und zerfällt in winzige, aneinandergereihte, hochgeladene Tröpfchen. Bei niedriger Flussrate, geringer Oberflächenspannung sowie niedriger Elektrolytkonzentration verläuft die Bildung der kleinen nur Mikrometer großen Tröpfchen relativ problemlos. Bei der Erhöhung eines oder mehrerer dieser Parameter erschwert sich jedoch die Ausbildung des geladenen Aerosols. Durch die Erhöhung des elektrischen Feldes kann dieser nachteilige Effekt unter Umständen aufgehoben werden. Die Gefahr einer elektrischen Kurzschlussentladung nimmt dabei aber stark zu (*corona discharge*). Alternativ kann eine mit

einem organischem Lösungsmittel versetzte wässrige Lösung koaxial zugegeben werden (*Sheath-Liquid*). Durch den gleichmäßigen organischen Lösungsmittelanteil in der Spraylösung wird eine konstant niedrige Oberflächenspannung des LC-Eluates gewährleistet. Am häufigsten werden wässrige Mischungen bestehend aus Methanol, Acetonitril, *i*-Propanol oder 2-Methoxyethanol eingesetzt.

Beim ESI-Prozess hängt die Effizienz der Gasphasenionienbildung sehr stark von der Größe der ursprünglich aus der Spraykapillare austretenden geladenen Tröpfchen ab. Bei niedrigen Flussraten bilden sich nach Fernandez de la Mora und Loscertales [59] kleinere Tröpfchen:

$$R = (v_f \epsilon / \sigma)^{1/3} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Dabei ist ϵ die Dielektrizitätskonstante des Vakuums. Mit steigender Flussrate ($\sim v_f^{1/3}$) [60] und abnehmender Leitfähigkeit ($\sim 1/\sigma^{1/3}$) nimmt der Radius des Taylor-Kegels und damit auch der Radius (R) der ursprünglich gebildeten Tröpfchen zu. Kleine Tröpfchen werden somit bei hoher Leitfähigkeit und niedriger Flussrate gebildet. Da aus den kleineren Primärtröpfchen viel effizienter kleinste Sekundärtröpfchen entstehen, führt dies automatisch zur Verbesserung der Gasphasenionienbildung (Abb. 2.1). Die Ladungen, welche mit den Tröpfchen die ESI-Kapillare verlassen, können als ESI-Strom betrachtet werden. Bei der Abwesenheit von Kurzschlussentladungen entspricht der ESI-Strom somit dem Strom, welcher bei den elektrochemischen Reaktionen an der Kapillarspitze gebildet wird [61-63]. Der ESI-Strom stellt somit ein quantitatives Maß für die maximale Anzahl der zur Verfügung stehenden Ladungen dar, welche in Gasphasenionien umgewandelt werden können [64,65]. Mit zunehmender Flussrate und steigender Elektrolytkonzentration in der Lösung steigt der Spraystrom schwach an [50,54]:

$$i_{\text{ES}} = H n_f^n s_s^n E_c^e \quad (\text{Gl. 2.3})$$

H ist eine Konstante, deren Wert von der Dielektrizitätskonstante und der Oberflächenspannung des Lösungsmittels abhängt, v_f die Flussrate, σ_s die spezifische Leitfähigkeit und E_c das angelegte Feld. Bei einem einzelnen Elektrolytssystem verhalten sich Leitfähigkeit und Elektrolytkonzentration proportional zueinander. Bei höheren Flussraten nimmt der prozentuale Anteil der aus der Lösung entfernten negativen Ladungen ab. Damit verringert sich automatisch das Ladungs-zu-Masseverhältnis der beim ESI-Prozess gebildeten Tropfen. Die Aufladung der Tröpfchen erfolgt somit weniger effektiv. Die primär gebildeten Tröpfchen haben einen Durchmesser von 1-2 μm und tragen etwa 100.000 Ladungen pro Tröpfchen. Bei der Durchquerung der unter Atmosphärendruck stehenden Gasphase erleiden die Tropfen infolge der Verdunstung des Lösungsmittels einen Größenverlust. Die Anzahl der Ladungen bleibt dabei konstant. Zusätzlich treten an den Tropfen Scherkräfte auf. Diese Effekte bewirken insgesamt eine starke Deformation der Tropfen, infolgedessen sich lokale starke elektrische Felder und Auswölbungen an der Flüssigkeitsoberfläche ausbilden. Sobald die Oberflächenspannung der Lösung diese Effekte nicht mehr kompensieren kann, werden die Tropfen schließlich instabil und zerfallen. Der Punkt, an welchem die Kraft der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Ladungen gleich groß ist wie die Kraft der Oberflächenspannung, welche die Tröpfchen zusammenhält, wird als Rayleigh-Stabilitätslimit bezeichnet [55,66]:

$$q_R = 8p \sqrt{e_0 g R^3} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Dabei ist q der Ladungsüberschuss, R der Radius der Tröpfchen, γ die Oberflächenspannung und ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante im Vakuum. Kurz vor Erreichen des Rayleigh-Stabilitätslimits erfahren die Tröpfchen die sogenannte Coulomb-Vernebelung. Hierbei kommt es zur Abschnürung kleiner Tröpfchen mit einem um den Faktor 10 geringeren Tröpfchenradius. Die abgeschnürten Tröpfchen haben etwa 2 % der Masse und 15 % der Ladung im Vergleich zu den Elterntropfen [67]. Im weiteren Verlauf des ESI-Prozesses können die abgeschnürten Tröpfchen noch eine zweite, eventuell sogar eine dritte Coulomb-Vernebelung erfahren [51]. Für die vollständige Verdampfung benötigt ein 2 μm großer Tropfen einige Millisekunden; die Bildung der Tochtertröpfchen erfolgt im Submillisekunden-Bereich. Tochtertröpfchen, welche auf einen Radius von etwa 10 nm zusammengeschrumpft sind, zerfallen nicht weiter in kleinere Tröpfchen. Beim Überschreiten des Rayleigh-Limits emittieren diese Tröpfchen direkt Ionen von der Tropfenoberfläche in die Gasphase. Für den eigentlichen Prozess, der zur Bildung der freien Gasphasenionen führt, gibt es zwei Modellvorstellungen.

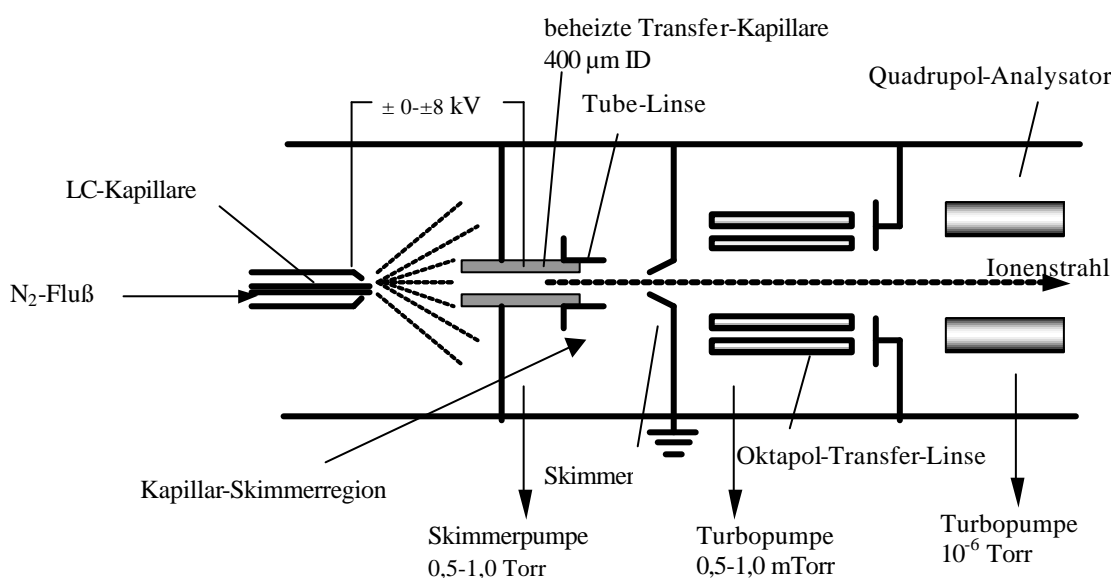


Abb. 2.2. Schematischer Aufbau einer ESI-Quelle mit pneumatisch unterstütztem Spray. Zur besseren Vernebelung der aus der Kapillare austretenden Flüssigkeit umspült man die LC-Kapillare mit Stickstoffgas. Der Transfer der Ionen in das Massenspektrometer erfolgt mit Hilfe einer beheizten Kapillare [76].

Das Modell des geladenen Rückstandes (*Charged-Residue Model*, CRM) wurde von Dole *et al.* aufgestellt und später von Röllgen zur SIDT-Theorie (*Single Ion Droplet Theory*) ausgebaut [27,68-70]. Bei diesem Modell geht man davon aus, dass das primär gebildete Tröpfchen infolge einer Reihe aufeinanderfolgender Coulomb-Explosionen in sehr kleine Tröpfchen (Radius etwa 1 nm) zerfällt, welche eine oder mehrere Überschussladungen, aber nur ein einzelnes Analytmolekül tragen. Nachdem die letzten Lösungsmittelmoleküle verdampft sind, wird die noch vorhandene Überschussladung zur Bildung des stabilsten Gasphasen-Analytens herangezogen.

Das Ionenemissionsmodell (*Ion Evaporation Model*, IEM) wurde von Iribarne und Thomson vorgeschlagen [71,72]. Hier geht man davon aus, dass hochgeladene Tröpfchen vorliegen, die eine große Anzahl Analytmoleküle enthalten. Die Tröpfchen tragen nach Verringerung des Tröpfchen-Radius auf etwa 8 nm etwa 70 Ladungen. Bei Überschreiten des Rayleigh-Limits emittieren die Tröpfchen freie Ionen in die sie umgebende Gasphase. Durch die Verdampfung

des Lösungsmittels erfolgt trotz der Abnahme der Ladungen eine kontinuierliche Emission von Ionen [71,72].

Die beiden Modelle unterscheiden sich hauptsächlich in der Art und Weise, wie Analyt- und Lösungsmittelmoleküle innerhalb der Tröpfchen voneinander getrennt werden [73]. Beim CR-Modell erfolgt die Trennung aufgrund sukzessiver Abspaltungsereignisse, wobei letztlich geladene Tröpfchen entstehen, welche nur noch ein einzelnes Analytmolekül enthalten. Beim IE-Modell werden einzelne, solvatisierte Analytionen, welche noch einige Tröpfchen-Ladungen tragen in die Gasphase desorbiert. Aufgrund der Untersuchung kleiner Gasphasenionen (Ladungen und Durchmesser) nimmt man an, dass der ESI eher ein IE-Mechanismus zugrunde liegt (nicht bei Makromolekülen). Unterstützt wird diese Annahme durch die experimentell beobachtbaren mehrfach geladenen Gasphasenionen [48,51]. Der ES-Ionisierung von globulären Proteinen scheint jedoch eher der CR-Mechanismus zugrunde zu liegen [74,75].

2.1.3. *Eigenschaften der ESI-Ionen* [22]

Der Mechanismus des ESI-Prozesses hat einen erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften der gebildeten Gasphasenionen:

- (1) Der Ladungszustand der Gasphasenionen reflektiert den Ladungszustand in der kondensierten Phase, obgleich dieser durch Ionen-Molekül-Kollisionen in der Übergangsphase verändert wird. Für gewöhnlich werden mehrfach geladene Teilchen beobachtet.
- (2) Der Ionentransfer in die Gasphase stellt keinen energetischen Prozess dar. Im Vergleich zu anderen Desorptions/Ionisierungs-Methoden handelt es sich bei der ESI um die schonendste Ionisierungsmethode. Nach Wysocki *et al.* [77] sind die beim ESI-Prozess desorbierten $[M+H]^+$ -Ionen verglichen mit den bei der LSIMS (*Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*) gebildeten Ionen erheblich kälter. Während der Desolvatisierungsphase verteilt sich die innere Energie (Schwingung und Rotation) der geladenen Analyt-Lösungsmittel-Cluster sobald die Lösungsmittelmoleküle von dem übrigbleibenden geladenen Analytion dissoziieren. Somit ist der extrem niedrige Fragmentierungsgrad einer der Hauptmerkmale der ESI. Die Bedingungen im ESI-*Interface* können aber auch so eingestellt werden, dass eine effektive Kollisionsaktivierung erfolgt. Durch Erhöhung des Skimmer-Potentials (API-CID) können somit, ebenso wie bei Tandem-MS/MS-Experimenten, weitere strukturelle Information aus einem ESI-Spektrum gewonnen werden [39]. Im Skimmerbereich beträgt der Gasdruck etwa 10^{-2} Torr. Er ist somit niedrig genug, um einem Ion vor der Kollision eine ausreichend große freie Weglänge zu ermöglichen, welche für eine hohe Kollisionswahrscheinlichkeit notwendig ist. Aufgrund energetischer Kollision der Ionen mit den sie umgebenden Gasmolekülen kommt es dann zur Bildung von Fragmentationen.
- (3) Beim ESI-Prozess führt die Entfernung von Lösungsmittelmolekülen zur stufenweisen Zerstörung nicht-kovalenter Wechselwirkungen.

2.1.4. *Ionisierung, Signalintensität und 'Wrong-Way-Round'*

2.1.4.1. *Die Ionisierung*

Mit Hilfe der ESI-MS können in Lösung vorliegende geladene organische und anorganische Salze, polare Neutralteilchen, welche eine Assoziations/Dissoziationsdynamik von kleinen Ionen (z.B. Protonen) aufweisen, aber auch unpolare Teilchen, welche an der ESI-Kapillare elektrochemische Oxidation/Reduktion erfahren ionisiert werden [78-80]. Wichtigste

Anforderung an einen Analyten ist dabei seine Löslichkeit in einem Lösungsmittel moderater Leitfähigkeit. Die Elektrospraylösung kann, selbst wenn sie nur einen einzigen gereinigten Analyten enthält, nicht als ein Einelektrolyt-System betrachtet werden. Unter anderem tragen elektrochemische Reaktionsprodukte sowie Rückstände aus Lösungsmitteln, Kapillaren und Verschraubungen zur Verunreinigung der ES-Lösung bei. Zur Unterstützung der Molekülionenbildung setzt man der Probelösung in der Regel Elektrolyte in Form von Säuren oder Basen zu. Zu hohe Elektrolytkonzentrationen sollten vermieden werden, da diese sonst die Signale der Analytionen unterdrücken [81,82]. Das Ausmaß der Unterdrückung ist dabei von der relativen Desorptionscharakteristik des Analyten im Vergleich zu den anderen anwesenden Analyten abhängig.

2.1.4.2. Die Signalintensität [51,83]

Die Bildung der Gasphasenionen wird in erheblicher Weise durch den hydrophoben Charakter der Ionen beeinflusst. Im Vergleich zu den hydrophilen Ionen besitzen die hydrophoben Ionen eine größere Oberflächenaktivität in den Tröpfchen. Für hydrophobe Ionen nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, diese an der Oberfläche eines geladenen Tröpfchens anzutreffen. Somit erhöht sich bei diesen auch automatisch deren Tendenz zur Gasphasenionenbildung. Nach Tang und Kebarle kann der massenspektrometrische Strom bzw. die Signalintensität eines Analyten wie z.B. I_A (Ion A^+) in einem Multikomponenten-System wie folgt berechnet werden [81,82]:

$$I_A = fpI_0 \{k_A[A^+] / (k_A[A^+] + k_B[B^+] + k_C[C^+])\} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Dabei ist I_0 der Kapillarstrom, $[A^+]$, $[B^+]$ und $[C^+]$ die Elektrolyt-Konzentrationen in der Elektrospraylösung, k_A , k_B und k_C die Reaktionskoeffizienten (*Response Coefficients*), f der Anteil der Tröpfchenladungen, welche in Gasphasenionen umgewandelt werden und p die Effizienz der Ionenaufnahme in das Massenspektrometer. Oberflächenaktivere Ionen haben einen größeren Reaktionskoeffizienten k . Nach Gl. 2.5 erzeugen diese deshalb auch einen höheren massenspektrometrischen Ionenstrom. Untersuchungen an kleineren Peptiden haben gezeigt, dass bei der Substitution des N-terminalen Restes mit einer hydrophoberen Gruppe eine Verstärkung der ESI-Reaktion beobachtet werden kann. Umgekehrt erfolgt bei der Substitution mit einer hydrophilen Gruppe eine Abschwächung. Durch die Anhäufung von vielen hydrophilen Gruppen kann sich der Reaktionskoeffizient bei einem Analyten so stark verringern, dass dieser bei der ESI-MS nicht mehr detektiert werden kann (z.B. bei glykosylierten oder phosphorylierten Peptiden und Proteinen) [51].

2.1.4.3. 'The Wrong-Way-Round'

Die bei der ESI-MS auftretenden mehrfach geladenen Ionen werden aufgrund früherer Untersuchungen durch die Anzahl der Ladungen (im positiven Ionenmodus die Protonen), welche von den basischen Resten eines Proteins oder Peptids aufgenommen werden können, erklärt [66,84-87]. Diesem widersprachen jedoch die Beobachtungen von Fenselau *et al.* [88]. Eine basische Myoglobin-Lösung (pH 10, mit Ammoniak eingestellt) zeigte im positiven Ionenmodus eine Verteilung mehrfach geladener Ionen (maximaler Ladungszustand +14), obwohl erwartet wurde, dass in dieser Lösung keine Protonierung auftritt. Die Protonierung in der flüssigen Phase ist bei so hohen pH-Werten minimal. Das Myoglobin liegt somit hauptsächlich in anionischer Form vor. Die Signalintensitäten der mehrfach protonierten Ionen waren unter den alkalischen Bedingungen im Vergleich zu den sauren Bedingungen um etwa 80 % verringert. Umgekehrt zeigte eine saure Myoglobin-Lösung (pH 3) im negativen

Ionenmodus mehrfach negativ geladene Molekülionen (maximaler Ladungszustand -11), obwohl das Myoglobin vollständig in kationischer Form vorliegt. Untersuchungen an Peptiden und Aminosäuren haben gezeigt, dass dieser sogenannte *Wrong-Way-Round*-Effekt als Folge des ESI-Prozesses auch bei kleinen Analyten auftritt [88-90]. Die Bildung protonierter Basen in der Gasphase muß bei basischen Lösungen beim Übergang von der Lösung in die Gasphase erfolgen. Das Auftreten mehrfach protonierter Proteine spricht eindeutig dafür, dass die Protonierung nicht erst in der Gasphase durch die Übertragung von vermutlich in der Gasphase anwesender NH_4^+ -Ionen erfolgt (bei Verwendung von Ammoniak und dementsprechend NH_4^+ -Ionen in basischer Lösung). Da die basischen Aminosäuren im Vergleich zu NH_3 eine größere Gasphasenbasizität besitzen, kann in der Gasphase zwar eine Protonenübertragung von NH_4^+ zum Protein erfolgen, jedoch wird die Anhäufung von Ladungen durch die weitreichende Coulomb-Abstoßung zwischen NH_4^+ und dem teilweise geladenen Protein verhindert. Infolgedessen muss die Protonierung des Proteins vor dessen Erreichen der Gasphase erfolgen [52]. Der von Kebarle und Ho [55] aufgestellte Mechanismus geht davon aus, dass bei einer ammoniakalischen Lösung die NH_4^+ -Ionen den Hauptteil der Ladungen in den Tröpfchen darstellt. An der Tröpfchenoberfläche gelangen viele NH_4^+ -Ionen in die Nähe des Proteins und protonieren dieses mehrfach. Da kleine Ionen im Vergleich zu NH_3 eine größere Gasphasenbasizität besitzen, erfolgt bei diesen die Protonierung vor deren Verdampfung in die Gasphase. Die ESI-Ionen können aber auch durch Protonen-Transfer-Reaktionen in der Gasphase verändert werden. Enke *et al.* konnten zeigen [91], dass Analyten mit einer im Vergleich zum Lösungsmittel geringeren Gasphasenbasizität bei der ESI-MS nicht detektiert werden können. Bei Verwendung eines Lösungsmittels mit geringerer Gasphasenbasizität konnte der gleiche Analyt dann detektiert werden. Dieser Sachverhalt muss insbesondere bei der ESI-MS von Phosphopeptiden berücksichtigt werden. Die Existenz der *Wrong-Way-Round*-Ionen ist somit ein Indiz dafür, dass Ladung und Desorption der Analyten durch das Ladungsungleichgewicht in den zum Schluss vorliegenden Tröpfchen bestimmt wird.

2.1.5. Kopplung von LC und ESI-MS, Sensitivität und Miniaturisierung

Die einfache *on-line*-Kopplung der ESI mit vielen Trennmethode ist einer der großen Vorteile dieser Ionisierungstechnik. Die wichtigsten Kopplungsmethoden sind HPLC/ESI-MS und CE/ESI-MS. Sowohl mit der HPLC als auch der CE können die Analyten gleichzeitig gereinigt, konzentriert und getrennt werden. Im Laufe der letzten Jahre konnte insbesondere durch die Entwicklung der Mikro- und Nano-LC die Detektionsempfindlichkeit der LC/ESI-Bestimmungen erheblich verbessert werden. Das konzentrationsabhängige Verhalten der ESI, (bei niedrigen Flussraten $<100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) spielt dabei ebenso eine wichtige Rolle, wie die Erhöhung der Analytkonzentration im Peakmaximum bei reduzierten chromatographischen Elutionsvolumen. Auf niedrigen Flussraten basierende Trennmethode wie μLC , nanoLC und CE sind somit hervorragend zur Kopplung mit modernen ESI-basierenden [29] API-Quellen (*Atmospheric Pressure Ionization*) [38] geeignet und ermöglichen äußerst sensitive Analysen [36,92].

2.1.5.1. HPLC-Säulen für LC/ESI-MS

Tabelle 2.1 enthält eine Übersicht über die Einteilung der HPLC-Säulen [93,94]. Erforderliche Spezifikationen und Anwendungen der Kapillar-LC finden sich in Chervet *et al.* [93] sowie in Visser *et al.* [95].

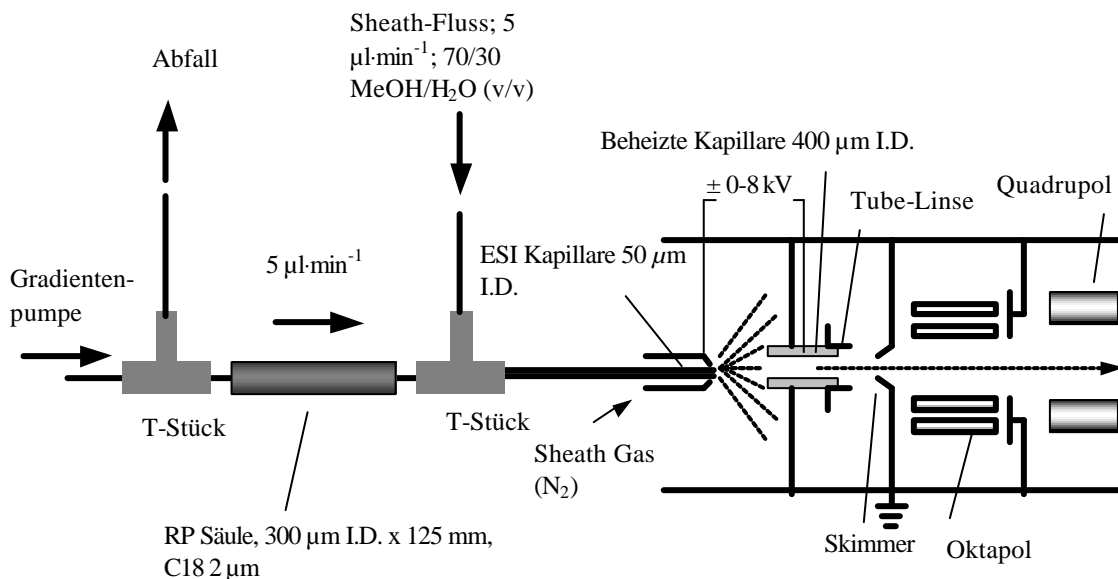


Abb. 2.3. Schematische Darstellung einer μ LC/ESI-MS-Anordnung. Mit Hilfe eines T-Stücks wird Sheath-Flüssigkeit zugeführt. Bei der vom Hersteller empfohlenen Zuführung der Sheath-Flüssigkeit bilden sich bei Flussraten $< 10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Luftblasen im ESI-Interface. Diese führen zu Spray-Instabilitäten während des LC/ESI-MS-Experimentes.

Tab. 2.1. Klassifizierung von LC-Säulen anhand ihres inneren Säulendurchmessers (I.D.).

LC-Säulen-Einteilung	Innerer Säulendurchmesser	Flussrate [$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$]
Konventionell		
wide-bore (präparativ)	$>4.6 \text{ mm}$	>3000
normal-bore (analytical)	$3\text{-}4.6 \text{ mm}$	$500\text{-}3000$
narrow-bore	$1\text{-}2 \text{ mm}$	$20\text{-}300$
Kapillar		
microbore	$0.15\text{-}0.8 \text{ mm}$	$2\text{-}20$
nanobore	$0.02\text{-}0.1 \text{ mm}$	$0.1\text{-}1$

2.1.5.2. Systeme mit niedrigen Flussraten [92]

Chromatographische Betrachtungen

Die Miniaturisierung der chromatographischen Säulenparameter bietet bezüglich des Proben- und Lösungsmittelverbrauchs sowie der Detektionsempfindlichkeit erhebliche Vorteile [93,95]. Durch die Verringerung des Säulendurchmessers erreicht man eine höhere Proben-Peak-Konzentration im Detektor. Die maximale Peak-Konzentration einer Probe im Säuleneluat (C_{\max}) lässt sich wie folgt berechnen [96]:

$$C_{\max} = \frac{m\sqrt{N}}{\sqrt{2p}V_0(1+k)} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Dabei ist m die absolute Probenmenge, welche auf die Säule aufgetragen wird, N die Säuleneffizienz, V_0 das Totvolumen der Säule und k der Retentionsfaktor. Da V_0 vom Säuleninnendurchmesser abhängt, kann das C_{\max} -Verhältnis zweier unterschiedlich dicker

Säulen aus dem Quotienten der Quadrate der Säuleninnendurchmesser berechnet werden. Bei identischer Probenmenge erhöht sich bei einer 300 µm I.D. Säule im Vergleich zu einer 1 mm I.D. Säule die Konzentration im Detektor um das 11fache.

Massenspektrometrische Betrachtungen

Bei einem Massenspektrometer handelt es sich um einen massenflussabhängigen Detektor. Die Signalintensität (*Response*, R) ändert sich proportional zur Gesamtzahl der pro Zeiteinheit detektierten Moleküle:

$$R \propto C_{\max}FS \quad (\text{Gl. 2.7})$$

F ist die Flussrate und S das Split-Verhältnis. Nach Gl. 2.7 nimmt mit abnehmender Flussrate die Signalintensität der Ionen ab. Bei Verwendung von Säulen mit geringeren Säuleninnendurchmessern nimmt die Proben-Peak-Konzentration der Analyten zwar zu, gleichzeitig nimmt die Flussrate aber ab. Eine höhere Proben-Peak-Konzentration bewirkt somit nicht automatisch eine höhere Signalintensität. Experimentell konnte aber gezeigt werden, dass sich das Massenspektrometer bei der Elektrospray-Ionisierung wie ein konzentrationsabhängiger Detektor verhält [97-99]. Wie die Untersuchungen von Banks zeigten, nimmt über einen weiten Bereich die Signalintensität der ESI-Ionen mit abnehmender Flussrate zu [100]. Umgekehrt wird bei höheren Flussraten (gleichbleibende Probenkonzentration) zwar eine größere Probenmenge pro Zeiteinheit versprüht, jedoch resultieren daraus keine höheren Ionenströme [101]. Aufgrund der geringeren Flussraten kann bei Mikro- und Nano-ESI-Anordnungen deshalb generell eine Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit beobachtet werden. Hierfür ist nach Banks *et al.* hauptsächlich die proportional mit der Flussrate abnehmende Tröpfchengröße verantwortlich [101]:

- (1) große Tröpfchen sind in der kurzen Zeit zwischen Tröpfchenbildung und Eintritt ins Vakuumsystem schwieriger zu trocknen
- (2) mit zunehmender Tröpfchengröße nimmt das netto Ladungs-zu-Masse-Verhältnis der Tröpfchen ab. Für die einzelnen Lösungsmittelmoleküle stehen deshalb weniger Ladungen zur Verfügung
- (3) mit zunehmender Flussrate nimmt der Filamentdurchmesser zu, der Taylor-Konus wird zunehmend instabil.

2.1.6. Mikro-ESI und Nanoelektrospray (NanoES)

Die Empfindlichkeit des ESI-Prozesses hängt zum Großteil von der Anzahl der ESI-Ionen ab, welche den MS-Detektor erreichen können. Die maximale Tröpfchendichte im Spraynebel wird durch die Abstoßung der in den Tröpfchen vorhandenen Raumladungen begrenzt. Bei einer hohen Tröpfchendichte im Spraynebel kommt es zur Ausbildung eines sehr großen Spraykegels. Somit können nur sehr wenige ESI-Ionen ins MS gelangen. Nach Smith *et al.* [102] kann bei einem ESI-Triple-Quadrupol-MS, bei einer Flussrate von 3-6 µl·min⁻¹ nur eines von 100.000 Ionen detektiert werden, d.h. nur eines von 10.000 Ionen gelangt von der ESI-Quelle in den Massenanalysator. Zur Verbesserung der ESI-Ionisierungswahrscheinlichkeit und des Ionentransfers bei niedrigen Flussraten müssen einige Parameter der ESI-Quelle optimiert werden. Dazu gehören unter anderem innerer und äußerer Durchmesser der ESI-Nadel sowie deren Position und Abstand zum MS-*Orifice* [92]. Da die Ionisierung von der Bildung der Tröpfchen abhängt, kann die Effizienz des ESI-Prozesses durch die Veränderung der Flussrate und des Durchmessers an der Spitze der ESI-Nadel verbessert werden [50]. Die Tröpfchengröße kann mit folgender Gleichung näherungsweise berechnet werden [103]:

$$r_e = \left\{ \frac{r}{4\rho^2 g \tan\left(\frac{\rho}{2} - q\right) \left[\left(\frac{U_T}{U_A}\right)^2 - 1 \right]} \right\}^{\frac{1}{3}} \left(\frac{dV}{dt} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Dabei ist r_e der Radius des Emissionsbereichs der Tröpfchen an der Spitze des Taylor-Konus, γ die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, θ der Winkel des Flüssigkeitskonus (für das klassische Taylor-Konus-Modell ist $\theta = 49.3^\circ$), ρ die Dichte der Flüssigkeit, U_T die Schwellspannung und U_A die angelegte Spannung und dV/dt die Flussrate.

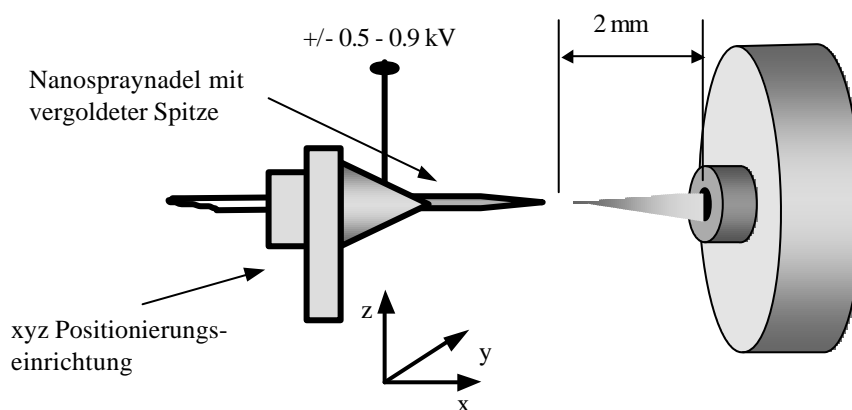


Abb. 2.4. Schematische Darstellung des Aufbaus einer NanoES-Quelle.

Bei verringerten Flussraten bilden sich kleinere Tröpfchen am Taylor-Konus aus (Gl. 2.8). Das größere Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis bewirkt bei kleineren Tröpfchen eine stärkere Desorption der Ionen in die Gasphase. Zur Stabilisierung des Taylor-Kegels muss bei einer Verringerung der Flussrate gleichzeitig der Kapillardurchmesser verkleinert werden. Die Umsetzung dieser Anforderungen führte schließlich zu der von Wilm und Mann [103] entwickelten Nanoelektrospray-Technik (NanoES). Die Tröpfchen haben bei der NanoES einen Radius von weniger als 200 nm und enthalten bei einer Konzentration von $1 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ Analyt in der Spraylösung durchschnittlich ein Analytmolekül [103,104]. Bei der NanoES-Technik handelt es sich um ein *off-line*-Verfahren. Die Flussrate beträgt etwa $20 \text{ nl}\cdot\text{min}^{-1}$. Für die NanoES-MS-Bestimmung wird die Probe in Nanospraylösung gelöst (gewöhnlich 50 % Methanol, 0,1 % Ameisensäure in Wasser) in eine Nanospraynadel gefüllt. Die Nanospraynadel selbst ist eine Glaskapillare, welche an einem Ende zu einer feinen Spitze ausgezogen (innerer Durchmesser ca. $1 \mu\text{m}$) und mit Gold bedampft wird. Die Nadel wird etwa 1-2 mm vor dem MS-Orifice positioniert und durch Anlegen der Spannung (0,5-1 kV) gezündet [104]. Im Vergleich zur konventionellen ESI nimmt bei der NanoES die Elektrospray-Ionisierungswahrscheinlichkeit um etwa das 510fache zu. Somit kann bei der NanoES eines von 390 Molekülen mit dem Massenspektrometer detektiert werden. Trotz der erheblich geringeren Flussrate verbessert sich die Konzentrationsempfindlichkeit beträchtlich. Im Vergleich zur konventionellen ESI-Quelle können 2-3fach höhere Ionenströme beobachtet werden [104]. Der Vorteil der NanoES ist, dass sie auf geringste Mengen kleinvolumiger Mischungen angewendet werden kann. Aufgrund des geringen Probenverbrauchs steht eine relativ lange Messzeit zur Verfügung. Trotz geringer Probenmenge können viele verschiedene

MS-Experimente durchgeführt werden. Durch die Möglichkeit, eine große Anzahl von Scans über einen längeren Zeitraum aufzusummieren, kann zudem das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis bei der Analyse erheblich verbessert werden.

2.1.7. Einfluss der Isotopie auf das Signal

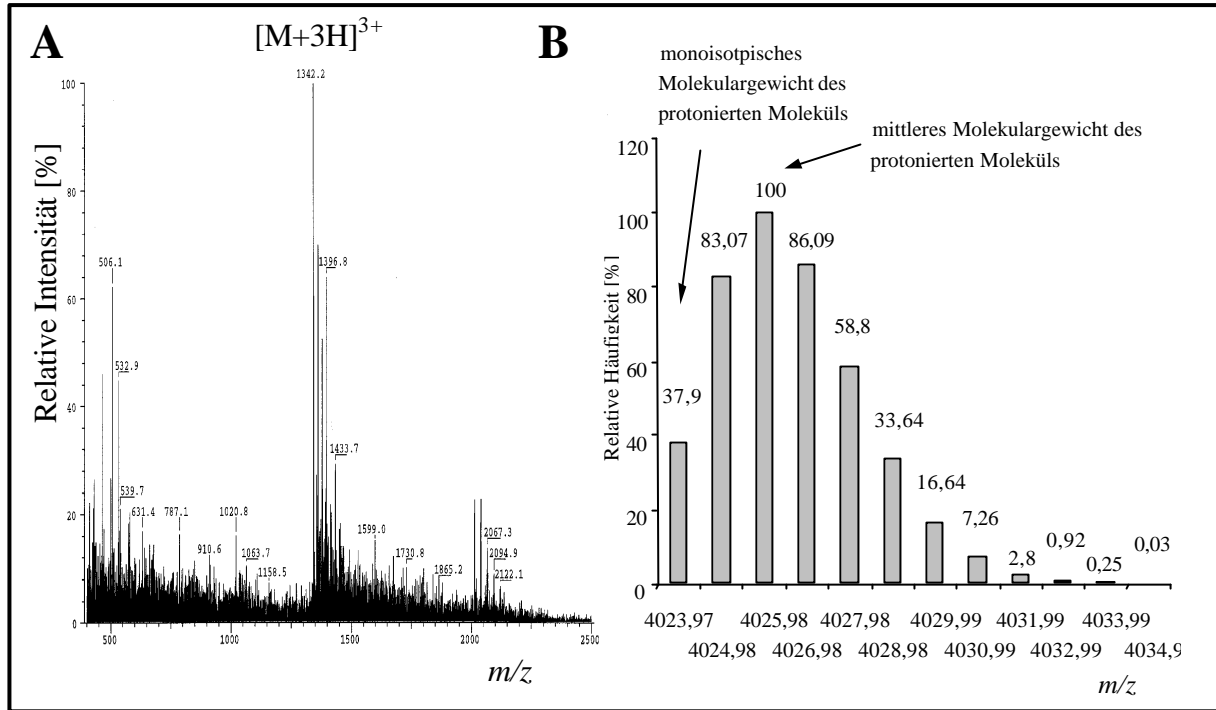


Abb. 2.5. (A) Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum des Peptids SLRPEANNPGRPPPTLQEM-IQMAAEIADGMAYLNAK-NH₂ (tryptisches Peptid aus der **b**-Untereinheit des humanen Insulinrezeptors). (B) Berechnete Isotopenverteilung des $[M+H]^+$ -Moleküliions des Peptids aus Teil A. Bruttoformel: C₁₇₂H₂₈₀N₄₉O₅₆S₃ (berechnet mit Hilfe von MS-Isotope, ProteinProspector 3.4.1 (<http://lud96.ucl.ac.uk/>)).

Viele chemische Elemente sind Gemische von Isotopen. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der im Atomkern vorhandenen Neutronen besitzen diese unterschiedliche Molekulargewichte. Demzufolge ergibt sich für fast alle natürlich vorkommenden Moleküle eine der Isotopenverteilung entsprechende Anzahl unterschiedlicher Massen. Insbesondere organische Moleküle zeigen aufgrund der natürlichen Häufigkeit des ¹³C-Isotops (1,1 %) mit zunehmendem Molekulargewicht eine breitere und stärker symmetrische Verteilung des massenspektrometrischen Signals [105]. Man unterscheidet drei Varianten von Molekülmassen:

- (1) nominelle Masse: die Masse des Ions wird aus den ganzzahligen Massen des jeweils häufigsten Isotops eines Elementes berechnet
- (2) monoisotopische Masse: die Masse des Ions wird aus den exakten Massen des jeweils häufigsten Isotops eines Elementes berechnet
- (3) durchschnittliche (*average*) Masse: die Masse eines Ions wird aus den durchschnittlichen Atomgewichten der einzelnen Elemente unter Berücksichtigung aller Isotope berechnet.

Das monoisotopische Molekulargewicht eines Peptids kann aus dessen Einzelmassen-aufgelösten Massenspektrum bestimmt werden, wobei bis etwa 1500 Da das Signal mit der höchsten relativen Häufigkeit der monoisotopischen Masse entspricht. Bei Peptiden mit

höheren Molekulargewichten enthält das intensivste Signal zusätzlich ein oder mehrere ^{13}C -Atome. Für das Peptid in Abb. 2.5.A konnte ein Molekulargewicht von $4024,6 \pm 0,9$ Da ermittelt werden. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem berechneten mittleren (chemischen) Molekulargewicht des $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions von 4023,97 Da überein (berechnet anhand der Bruttoformel des protonierten Peptids $\text{C}_{172}\text{H}_{280}\text{N}_{49}\text{O}_{56}\text{S}_3$). Ist eine Einzelmassen-Auflösung der Molekülionen-Signale nicht möglich, so entspricht die Lage des Schwerpunktes (Centroid) dem mittleren (chemischen) Molekulargewicht der für das protonierte Molekül berechneten Isotopenverteilung (Abb.2.5.B).

2.2. Das Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer [105]

2.2.1. Radiofrequenz Quadrupol-Massenfilter

Beim Quadrupol-Massenfilter [105-108] handelt es sich um einen Hochfrequenzbeschleuniger, mit dem langsame Ionenstrahlen sehr effizient fokussiert (*bunchen*) und beschleunigt werden können. Bei einem Quadrupol wird mit Hilfe eines Hochfrequenzsenders zwischen vier quadratisch angeordneten hyperbolischen Stabelektroden (*rods*) ein elektrisches Quadrupolfeld erzeugt. An gegenüber liegende Stabelektroden legt man dazu eine Gleichspannung V_0 gleichen Betrags und gleicher Polarität und überlagert dieser eine hochfrequente Wechselspannung ($V_1 \cos \omega t$) gleicher Phase. Benachbarte Stäbe besitzen somit entgegengesetzte Polaritäten und eine um 180° (π) gegeneinander verschobene Phase.

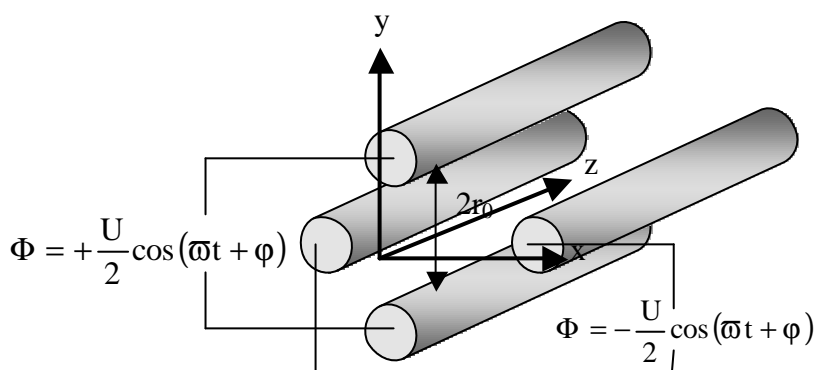


Abb. 2.6. Schematische Darstellung der Elektrodenanordnung eines Quadrupols.

Durch die Beschleunigungsspannung (10-20 V) besitzen die Ionen eine ausreichend hohe Translationsenergie um in Richtung der z-Achse in das elektrische Quadrupolfeld zu gelangen. Die Bewegung der Ionen in der xy-Ebene kann durch das Umformen der Mathieschen linearen Differentialgleichungen für schwingende Membranen beschrieben werden. Die umgeformten Mathieschen Gleichungen erhält man durch die Einführung der Parameter a und q:

$$a = \frac{2zeV_0}{m(\text{pfr})^2} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

$$q = \frac{zeV_1}{m(\text{pfr})^2} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

Die Parameter a und q legen die Beziehung zwischen einem zu transfizierenden Ion (Masse m , z Elementarladungen e) und den Eigenschaften des Quadrupols fest (r entspricht dem Radius zwischen den Stäben, V_0 der angelegten Gleichspannung und V_1 der angelegten Wechselfeldspannung mit der Frequenz f).

$$\frac{d^2x}{d(\mathbf{pft})^2} + (a + 2q \cos 2\mathbf{pft})x = 0 \quad (\text{Gl. 2.11})$$

$$\frac{d^2y}{d(\mathbf{pft})^2} - (a + 2q \cos 2\mathbf{pft})y = 0 \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Die erste Lösung dieser Gleichungen führt zu endlichen Amplituden der Oszillationen. Es resultiert eine stabile Bewegung der Ionen durch den Quadrupol. Die zweite Lösung führt zu einem exponentiellen Anstieg der Amplituden in Richtung der x - und/oder y -Achsen. Beim Scanvorgang werden die Gleichspannung sowie die Amplitude des Wechselfeldes gleichzeitig erhöht, ihr Verhältnis zueinander wird dabei konstant gehalten. Damit bleibt auch das Verhältnis a/q sowie die Frequenz f (Radiofrequenzbereich) konstant. Werden Ionen in das Trennsystem eingeschossen, vollführen diese unter dem Einfluss des Hochfrequenzfeldes senkrecht zur Feldachse Schwingungen (Oszillationen). Bei einem bestimmten Potential- und Frequenzzustand (V_0 , V_1 , ω , r_0) passieren nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert auf einer stabilen Flugbahn (Trajektorien) das Quadrupol-System. Kleine Ionen nehmen in einem elektrischen Feld im Vergleich zu großen Ionen die Geschwindigkeit schneller auf. Dadurch werden die Schwingungsamplituden der leichteren Ionen größer. Eine fortwährende Erhöhung der Elektrodenpotentialspannung führt dazu, dass der Exkurs dieser Ionen den Abstand zwischen den Elektroden übersteigt. Die leichten Ionen stoßen somit an die Elektroden und werden dort entladen. Schließlich gelangen nur noch höhermassige Ionen durch das Quadrupol-System [105,108]. Eine Detektion der Ionen ist also nur dann möglich, wenn diese sich auf räumlich beschränkten, stabilen Trajektorien aufhalten. Die Schwingungsamplituden dieser Ionen bleiben dabei endlich und kleiner als r_0 . Alle übrigen Ionen mit anderen m/z -Werten, werden aussortiert. Die Trennung der Massen $m/\Delta m$ (Massenauflösung) wird durch das Verhältnis V_0/V_1 bestimmt. In der Praxis hängt die erreichbare Massenauflösung jedoch zusätzlich von der Anfangsgeschwindigkeit der Ionen in x - und y -Richtung sowie der Abweichung der Ionen von der idealen z -Richtung bei ihrem Eintritt in den Quadrupol ab. Da eine größere Anzahl von Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis den Detektor nicht mehr erreichen kann, nimmt bei einem Quadrupol mit zunehmender Auflösung die Empfindlichkeit ab. Kommerzielle Quadrupole besitzen einen maximalen Massenbereich von etwa 4000 m/z und eine Massenauflösung $m/\Delta m$ von etwa 500-5000.

2.2.2. Der Scanvorgang

Beim Scannen der Quadrupole sind zwei Parameter wichtig:

1. *step size*: die Größe der Stufen, in welche der gewählte Scanbereich gleichmäßig unterteilt wird (0,05-0,5 amu)
2. *dwell time*: die Zeitdauer, mit der auf einer Stufe gemessen wird (unterer Millisekundenbereich).

Die *step size* beeinflusst die Genauigkeit; die *dwell time* die Empfindlichkeit der Massenbestimmung. Es sollte möglichst bei kleiner *step size* sowie langer *dwell time* gescannt werden. Die Scanzeit, welche für die Aufnahme eines Spektrums benötigt wird, errechnet sich aus dem Produkt von *dwell time* und *step size*.

2.2.3. Aufbau des Tripel-Quad-MS (Q1q2Q3) [101]

Die Kopplung mehrerer Quadrupol-Massenfilter (Q) ermöglicht die Durchführung detaillierter Strukturanalysen. Mit Hilfe einer zwischen zwei Quadrupolen (Q1 und Q3) zwischengeschalteten Gasphasen-Kollisionszelle (Reaktionsbereich, q) können Ionen dissoziiert und somit zusätzliche Strukturinformationen gewonnen werden [109,110].

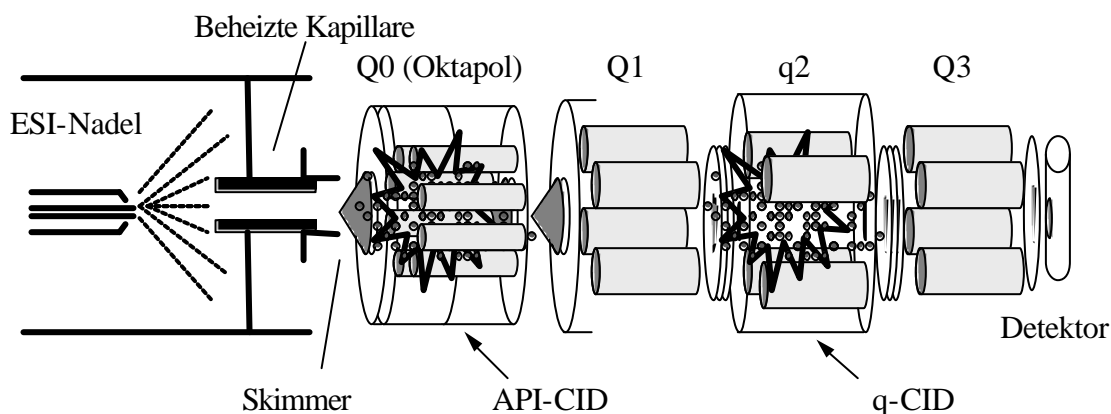


Abb. 2.7. Schematische Darstellung eines ESI-Tripel-Quadrupol-MS. Niederenergie-Stoßaktivierung kann sowohl im Skimmerbereich (sCID oder API-CID) oder in der Kollisionszelle, einem rf-only Quadrupol (q2-CID) erfolgen.

Das erste, für die analytische MS/MS entwickelte, rechnergesteuerte Triple-Quadrupol-System wurde von Yost und Enke hergestellt [111,112]. Die ersten MS/MS-Untersuchungen von Peptiden wurden durch Hunt *et al.* mit Hilfe der FAB-Ionisierung durchgeführt [113,114]. Da beim ESI-Prozess aufgrund der schonenden Bedingungen keine Fragmentationen erzeugt werden, können in der Regel auch keine kovalenten Strukturinformationen beobachtet werden. Mit Hilfe einer Kollisionsaktivierung (*Collision-Induced Dissociation*, CID bzw. *Collision-Activated Dissociation*, CAD) können die energiearmen ESI-Ionen jedoch fragmentiert werden. Durch Stöße mit Gasmolekülen können die Ionen angeregt werden und dabei einen Teil ihrer Translationsenergie in Schwingungsenergie umwandeln. Aufgrund zu starker Molekülschwingungen kommt es schließlich zur Fragmentierung der Ionen [115-117].

2.2.4. Der rf-only Quadrupol (q) als Reaktionszelle [36,108]

Eine Gasphasen-Kollisionszelle besteht typischer Weise aus einem rf-only Quadrupol. Da der rf-only Quadrupol ohne angelegte Gleichspannung ($U_{dc}=0$) betrieben wird, erfahren die Ionen eine Kraft, welche sie ständig um die optische Achse des Quadrupols (q-Achse) schwingen lässt. Aus diesem Grund können alle rf-only Quadrupole als *high-pass*-Filter eingesetzt werden, um Ionen auf eine bestimmte Achse zu fokussieren. Dieser Vorgang kann sowohl unter Vakuumsbedingungen, als auch bei relativ hohen Gasdrücken zwischen den Quadrupolstäben erfolgen. Baut man den rf-only Quadrupol in eine Zelle, so kann zusätzlich ein Stoßgas mit einem bestimmten Gasdruck zwischen die Quadrupolstäbe eingelassen werden. Aufgrund niederenergetischer Kollisionen (10-40 eV) mit den Gasmolekülen erfolgt eine sehr effiziente Fragmentierung der Ionen. Die Quadrupol-Kollisionszelle bietet dabei den prinzipiellen Vorteil, dass die Ionen, welche durch die Kollisionen mit dem neutralen Stoßgas verstreut werden, wieder refokussiert werden können.

2.2.5. Besonderheiten und Scantechniken des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers

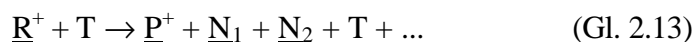
2.2.5.1. Die Niederenergie-Stoßaktivierung

In einem Quadrupol-Analysator besitzen die Ionen eine niedrige kinetische Energie im Bereich einiger Elektronenvolt (eV). Bei Stoßaktivierungs-Experimenten reicht diese kinetische Energie für eine effiziente Fragmentierung der Ionen nicht aus. Die Ionen werden deshalb vor ihrer Stoßaktivierung zusätzlich mit 20-200 V beschleunigt. Die Effektivität der Fragmentierung kann sowohl über die Beschleunigungsspannung als auch über den Druck des Stoßgases kontrolliert werden. Da sich bei einer erhöhten Beschleunigungsspannung die Energie, welche beim Stoß übertragen wird, ebenfalls erhöht, erfolgt eine verstärkte Fragmentierung. Aufgrund der größeren Anzahl von Mehrfachstößen erfolgt bei einem höheren Stoßgasdruck ebenfalls eine verstärkte Fragmentierung. Selbst bei niedrigen Kollisionsenergien (< 100 eV) kann somit ein sehr effizienter CID-Prozess beobachtet werden. Als Stoßgas werden Edelgase (He, Ar, Xe) bei Gasdrücken von 0,5-3 mTorr eingesetzt.

Aufgrund des zeitlich schnellen Ablaufs eines Scanvorgangs können bei einem Triple-Quadrupol-System während der Messung bestimmte Massen selektiv erfasst werden. Dies ermöglicht die Durchführung von SRM-Experimenten (*Selected Reaction Monitoring*). Die Ionisierungspolarität kann ebenfalls sehr rasch (einige ms) geändert werden. Aufgrund der linearen Anordnung der beiden Quadrupol-Massenanalysatoren können bei einem Triple-Quadrupol-Instrument spezielle Scantechniken (Tochterionen-, Vorläuferionen- und Neutralverlust-Analyse) durchgeführt werden. Diese Scantechniken sind insbesondere bei der Identifizierung von Ionen mit spezifischen Strukturmerkmalen hilfreich [118]. Die lineare Anordnung der Quadrupole hat jedoch auch Nachteile. Schnelle Neutralteilchen und Photonen, welche bei der Ionisierung auftreten, können ebenfalls den Detektor erreichen und somit ein 'neutrales Rauschen' erzeugen. Dieser Effekt kann aber durch *off-axis*-Anordnung des Detektors (in Bezug auf die Ionisierungsquelle) sowie eine orthogonale Sprayanordnung weitgehend unterdrückt werden.

2.2.5.2. Das allgemeine Konzept der Tandem-Massenspektrometrie

Bei der Tandem-Massenspektrometrie handelt es sich um Ionen-Molekül-Reaktionen entsprechend Gl. 2.13 (zur übersichtlicheren Darstellung wurden nur einfach positiv geladene Ionen verwendet).



Der Transport des massenselektierten Vorläuferions \underline{R}^+ zum Massenspektrometer erfolgt aufgrund seiner hohen, nicht-thermischen Translationsenergie. Infolge energetischer Kollisionen mit dem thermischen Gas (T) kann das \underline{R}^+ -Ion in die Produktionen \underline{P}^+ und die Neutralteilchen \underline{N} , welche nicht direkt detektierbar sind, umgewandelt werden. Bei den meisten Reaktionen dieses Typs handelt es sich um Fragmentierungen, bei welchen das Stoßgas (in der Regel Argon) chemisch nicht verändert wird. Unter den besonderen Bedingungen des kollisionsinduzierten Zerfalls (CID) ergibt sich für die Massenbilanz folgende einfache Beziehung (wobei $m_P < m_R$):

$$m_R + m_T = m_P + m_{N1} + m_{N2} + \dots \quad (\text{Gl. 2.14})$$

$$m_R = m_P + m_N \quad (\text{Gl. 2.15})$$

In einer *rf-only* Quadrupol-Zelle (q) kann die Translationsenergie des Vorläuferions ausreichend niedrig gehalten werden (etwa 1 eV), sodass es zu einer relativ uneffizienten Fragmentierung infolge der chemischen Reaktionen zwischen R^+ und dem Stoßgas (T) kommt. Aufgrund der Ionen-Molekül-Reaktionen (Gl. 2.13) kann ein Tandem-Massenspektrometer in einem von drei unterschiedlichen MS/MS-Modi betrieben werden. Dabei hängt es nur davon ab, ob die Masse des Vorläuferions, des Produktions oder des Neutralfragments fixiert wird.

2.2.5.3. Die Produktionen-Analyse (Tochterionen-Scan)

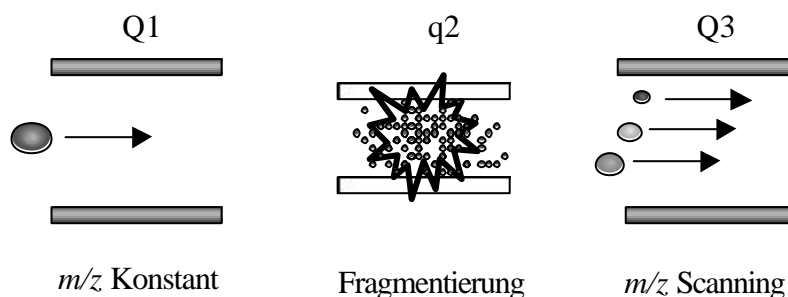


Abb. 2.8. Prinzip der Produktionen-Analyse mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer.

Die Produktionen-Analyse ist die am häufigsten eingesetzte MS/MS-Scantechnik. Das Quadrupolfeld von Q1 wird so eingestellt, dass aus dem Ionenstrahl nur Vorläuferionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis in q2 transferiert werden. Durch Fragmentierung des Vorläuferions in q2 werden Produktionen (Tochterionen) erzeugt, die anschließend in Q3 analysiert werden. In der biochemischen Analytik hat die Produktionen-Analyse eine besondere Bedeutung bei der Sequenzierung von Peptiden.

2.2.5.4. Die Vorläuferionen-Analyse (Parent-Ion-Scan)

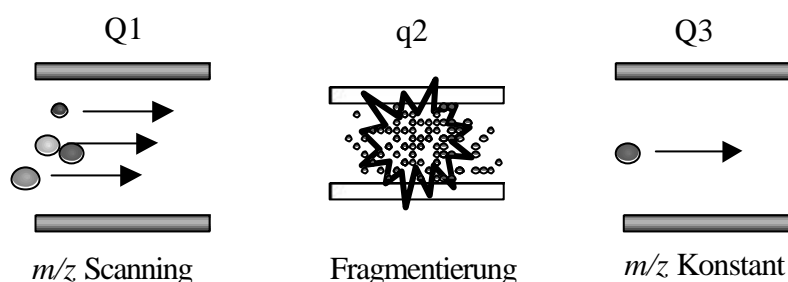


Abb. 2.9. Prinzip der Vorläuferionen-Analyse mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer.

Bei dieser Technik wird der Ionenstrahl entsprechend der Aufnahme eines normalen Massenspektrums durch Q1 transferiert. Die Ionen erreichen während des Scanvorgangs entsprechend ihren m/z -Werten q2 und werden dort sequentiell fragmentiert, wobei Q3 auf eine einzelne Fragmentionen-Masse eingestellt wird. Somit können nur diejenigen Ionen detektiert werden, welche durch Q1 in die Kollisionszelle transferiert wurden und beim Stoß das spezifische in Q3 detektierte Fragmention erzeugten.

2.2.5.5. Die Neutralverlust-Analyse

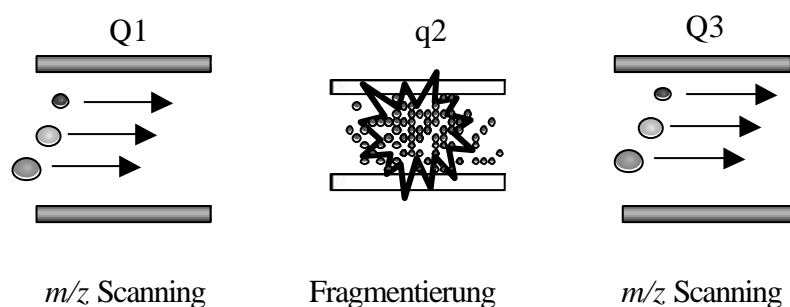


Abb. 2.10. Prinzip der Neutralverlust-Analyse mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer.

Der Verlust eines Neutralteilchens kann während eines MS/MS-Experiments ebenfalls nachgewiesen werden. Q1 arbeitet dabei im normalen Scanbetrieb und transferiert die Ionen in q2, wo diese sequentiell fragmentiert werden. Q3 scant ebenfalls im normalen Scanmodus synchron mit Q1, jedoch versetzt um die Masse des nachzuweisenden Neutralverlustteilchens. Der Detektor registriert somit nur die von Q1 in q2 transferierten Ionen, welche bei der Kollision den eingestellten Neutralverlust erzeugen.

2.2.6. API-CID [39,119,120]

Außer beim q2-CID kann bei einem ESI-QqQ-System eine Stoßaktivierung auch im Transferbereich der Ionen in den Massenanalysator erfolgen (sCID oder API-CID). Den unter Hochdruck (1-2 mTorr) stehenden Transferbereich bezeichnet man auch als Skimmer-Region [121-124]. Bei einem hohen Skimmerpotential (hohes Q0-Offset-Potential) erfolgt eine Fragmentierung der Ionen aufgrund von Stößen mit dem Restgas (Lösungsmittelmoleküle, Stickstoff- bzw. Atmosphärgas). Man bezeichnet diese Art der Kollisionsaktivierung als API-CID oder -sCID (*Skimmer*, s). Beim positiv-Ionen-API-CID wird am Ende der Oktapollinse (Q0, Abb. 2.2 bzw. 2.7) das Potential entlang der gesamten Flugstrecke der Ionen um den Betrag des eingestellten Oktapol-Offset-Wertes abgesenkt. Dadurch werden die Ionen innerhalb des Transferbereichs zusätzlich beschleunigt. Fokussierung der Ionen erfolgt mit Hilfe der Potentiale, welche an den Linsen zwischen den Quadrupol-Analysatoren anliegen. Beim API-CID können etwa dieselben Fragmentierungsmuster wie beim Kollisionszellen-CID beobachtet werden [120,125]. Beim API-CID ist die Energieverteilung im Vergleich zum q2-CID infolge der inhomogenen Druckverteilung und Zusammensetzung innerhalb der Transferregion deutlich breiter. Im Vergleich zum q2-CID kann beim API-CID der Ionenstrahl jedoch nicht massenselektiert werden [119]. Somit wird beim API-CID nicht ein einzelnes selektiertes Molekülion fragmentiert, sondern alle während des ESI-Prozesses auftretenden unterschiedlichen Ladungszustände eines Moleküls erfahren gleichzeitig eine Kollisionsaktivierung.

2.2.7. Hybrid-Scantechniken [39]

Bei Hybrid-Scantechniken kombiniert man während eines Scans CID-Bedingungen mit nicht-fragmentierenden Bedingungen bzw. positiv-Ionisierung mit negativ-Ionisierung bzw. eine Mischung der beiden. Bei den Hybrid-Scans erfolgt die Kollisionsaktivierung ausschließlich über API-CID. Fluten und Auspumpen einer Kollisionszelle mit Stoßgas erfordert relativ viel

Zeit. Beim q_2 -CID geht durch das Befüllen und Leeren der Kollisionszelle somit sehr viel Messzeit verloren. Da im Skimmerbereich ein Gasdruck von etwa 1-2 mTorr herrscht, muss beim API-CID lediglich eine Beschleunigungsspannung (Q_0 -Offset-Potential) angelegt werden. Die Hybrid-Scantechnik wird hauptsächlich für die LC/MS-Kopplung eingesetzt. Aufgrund der chromatographischen Trennung werden die Analyten sehr selektiv der ESI-MS zugeführt. Mit Hilfe des API-CID können spezifisch modifizierte Moleküle anhand ihrer Markerionen (spezifisch erzeugte Fragmentationen) detektiert werden. Bei niedrigem Q_0 -Offset-Potential können während des gleichen Scans zusätzlich die intakten Moleküle detektiert werden.

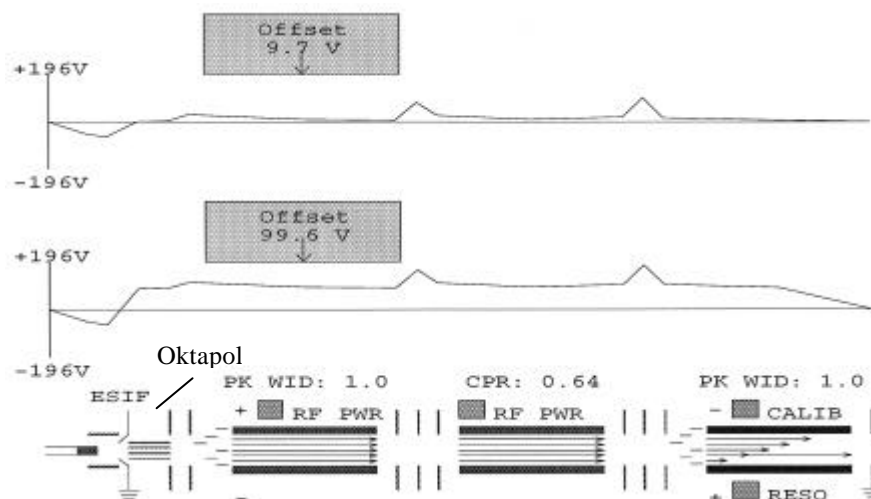


Abb. 2.11. Potentialverlauf eines TSQ 700 Gerätes beim Nachweis negativer Ionen. Oberer Teil der Abbildung: normaler Scan; mittlerer Teil: API-CID (sCID); unterer Teil: Anordnung der Massenanalytoren.

2.3. Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) [5,126-133]

Hohe Empfindlichkeit, schnelle Durchführung, hohe Massengenauigkeit und relativ geringe instrumentelle Anforderungen führten dazu, dass sich die MALDI-MS in den letzten Jahren zu der am weitest verbreiteten Technik zur strukturellen Untersuchung von Biomolekülen entwickelte [133-142]. Besonders häufig wird die MALDI-MS bei der Peptid-Mapping-basierenden Proteinidentifizierung eingesetzt. Hierbei werden gelelektrophoretisch getrennte Proteine enzymatisch im Gel gespalten und anschließend die Molekulargewichte der resultierenden Peptide mit Hilfe der MALDI-MS ermittelt. Die Proteine können dann anhand der ermittelten Peptidmassen in Protein- und DNA-Datenbanken identifiziert werden [36,136,143-146]. Für die MALDI-MS-Bestimmung versetzt man die Probe mit einem großen molaren (1.000-10.000fach) Überschuss sogenannter Matrix. Desorption und Ionisierung der Probe erfolgt durch den Beschuss der trockenen Probe-Matrix-Mischung mit Laserlicht. Beim MALDI-Verfahren kommen der Matrix drei wichtige Funktionen zu:

- 1.) Trennung und Solvatisierung der Analyt-Moleküle in der festen Phase, sodass eine Anhäufung von Analyt-Molekülen unterdrückt wird
- 2.) Aufnahme der Laserenergie, welche zur Desorption und Ionisierung der Matrix- und Analyt-Moleküle benötigt wird

- 3.) Ionisierung der Analyt-Moleküle (in der Regel Protonierung) durch saure bzw. basische Reaktion in der Gasphase.

Gewöhnlich zeigt die Matrix eine hohe spektrale Absorption im Wellenlängenbereich des eingestrahlten Laserlichtes. Typischer Weise werden kostengünstige N₂-Laser mit einer *Excitation* von 337 nm (UV-Bereich) eingesetzt. Aus diesem Grund werden hauptsächlich Zimtsäure- oder Benzoessäure-Derivate als Matrix verwendet.

2.3.1. *Desorption und Ionisierung*

Die Matrix-Moleküle werden infolge der Absorption der Photonen sehr rasch erhitzt; es erfolgt ein schneller Ausstoß von Molekülen aus der Festkörper-Matrix. Die Protonierung der Matrix-Moleküle erfolgt aufgrund einer Reihe schneller photochemischer Reaktionen, welche in einer dichten Schicht oberhalb der Matrix-Oberfläche ablaufen. Die Ionisierung der Analyt-Moleküle erfolgt kurz danach in einer weniger dichten Schicht. Der Transfer der Protonen von den Matrix-Molekülen zu den neutralen Analyt-Molekülen erfolgt aufgrund der höheren Protonenaffinität der Analyt-Moleküle.

2.2.3. *Flugzeit-Massenanalytoren (TOF-MS)* [147]

Bei einem TOF-MS (*Time-of-Flight*, TOF) erzeugt man einen gepulsten Ionenstrahl und misst die Flugzeit der Ionen zwischen Quelle und Detektor. Zur Beschleunigung der Gasphasenionen wird ein elektrisches Feld (20-30 kV) angelegt. Das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis wird durch die Akkumulation mehrerer Einzelmessungen (5-100) verbessert. Durchlaufen Ionen gleicher Ladung dasselbe elektrische Feld, so besitzen diese die gleiche kinetische Energie. Die Beschleunigungsstrecke stellt lediglich einen sehr kurzen Abschnitt der gesamten Flugstrecke der Ionen dar. Die Hauptflugstrecke der Ionen besteht aus einem feldfreien Raum, der sogenannten Driftstrecke. Wird ein Teilchen mit Ladung q und Masse m durch eine Spannung U beschleunigt, so wird dabei die Arbeit W verrichtet (Gl. 2.16). Das Teilchen bewegt sich dann, im evakuierten, feldfreien Bereich des Flugrohres mit der kinetischen Energie E_{kin} (Gl. 2.17):

$$W = qU = zeU \quad (\text{Gl. 2.16})$$

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} mv^2 \quad (\text{Gl. 2.17})$$

Durch Gleichsetzen der beiden Gleichungen erhält man:

$$zeU = \frac{1}{2} mv^2 \quad (\text{Gl. 2.18a) bzw.}$$

$$m/z = 2eU \frac{1}{v^2} = 2eU \frac{1}{s^2} t^2 \quad (\text{Gl. 2.18.b}).$$

Diese Beziehung hat jedoch nur dann Gültigkeit, wenn die kinetische Energie des Ions ausschließlich durch die Beschleunigungsspannung zustande kommt, d.h. der Desorptions/Ionisationsprozess zu keiner zusätzlichen Beschleunigung des Teilchens führt. Bei der MALDI von Peptiden werden hauptsächlich einfach geladene Ionen ($z = \pm 1$) erzeugt. Die Masse des protonierten Peptids kann in der Regel direkt aus der Flugzeit ermittelt werden (Gl. 2.19).

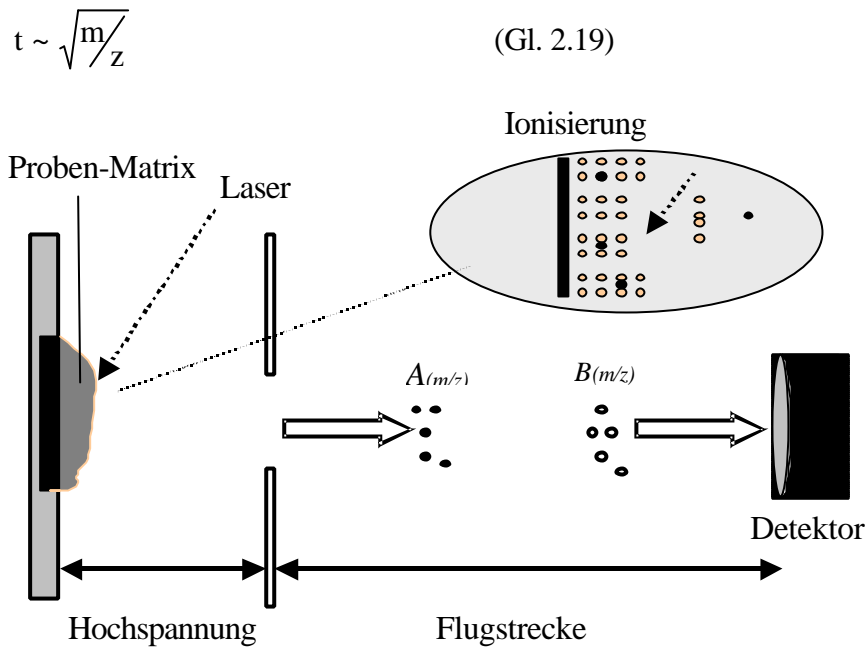


Abb. 2.12. Schematische Darstellung eines linearen MALDI-TOF-Massenspektrometers.

Bei der Probenvorbereitung wird die Analytlösung zusammen mit der Matrix (z.B. α -Cyano-4-hydroxizimtsäure) auf dem MALDI-Probenschlitten kokristallisiert [136,138,20,148-154]. Im Laufe der letzten Jahre konnte die Leistungsfähigkeit der MALDI-MS enorm gesteigert werden. Durch die Entwicklung der DE (*Delayed Extraction*) [155] und RE-TOF (Reflektron) [156] können Peptide mit ± 10 ppm bestimmt werden. Mit MALDI-PSD (*Postsource Decay*, PSD) können zusätzlich Fragmentationen erzeugt werden [157,158].

2.4. *MS-basierende Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen und Peptiden* [5,36,136-139,159]

Mehrere Gruppen berichteten 1993 zum erstenmal über die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen (Peptid-Mapping) in DNA-Sequenzdatenbanken [160-164]. Kurze Zeit später wurde auch über die MS-Fragmentationenspektren basierende Identifizierung von Proteinen in DNA-Sequenzdatenbanken berichtet [164]. Aufgrund der deutlich höheren Empfindlichkeit der MS-basierenden Methoden (subpicomolarer-Bereich) verdrängten diese sehr rasch die Anwendung des klassischen Edman-Abbaus zur Identifizierung gelelektrophoretisch getrennter Proteine [165]. Heutzutage handelt es sich bei der MS-basierenden Proteinidentifizierung deshalb um eine voll etablierte und generell anerkannte Methode. Mit Hilfe von EST-Datenbanken (*expressed sequence tags*, partielle Gensequenzen) können Peptide zunächst identifiziert (Tandem-MS/MS) und anhand der Peptidsequenzen anschließend DNA-Sonden zur Klonierung unbekannter Proteine generiert werden [166,167]. Im Anschluss an die Proteinidentifizierung folgt in der Regel die Charakterisierung der Proteine, insbesondere der posttranslationalen Modifikationen. Hohe Massengenauigkeit und gute Sensitivität machen die Massenspektrometrie zu einem idealen Werkzeug für die Mikro-Charakterisierung posttranslationaler Proteinmodifikationen [47,141,144,168-172].

2.4.1. *Identifizierung und Charkaterisierung von Proteinen*

Die rasch zunehmenden genetischen Sequenzdaten sind eine nützliche Quelle zur Analyse und Interpretation von MS-Daten [134,136,141,173,174]. Bei der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen können die MS-generierten Daten auf zweierlei Arten mit den Daten in den Sequenzdatenbanken korreliert werden (Abb. 2.13):

- 1.) Peptidmassen-Mapping
- 2.) Interpretation der Fragmentationenspektren.

Aufgrund ihrer hohen Trennleistung setzt man für die Trennung der Proteine hauptsächlich die ein- bzw. zweidimensionale Gelelektrophorese ein [175]. Mit Hilfe von Proteasen werden die Proteine enzymatisch im Gel gespalten [176]. Die resultierenden Peptide werden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Abbildung 2.13 zeigt eine schematische Übersicht der unterschiedlichen MS-Strategien, welche zur Identifizierung und Charakterisierung 1- und 2D-PAGE getrennter Proteine eingesetzt werden.

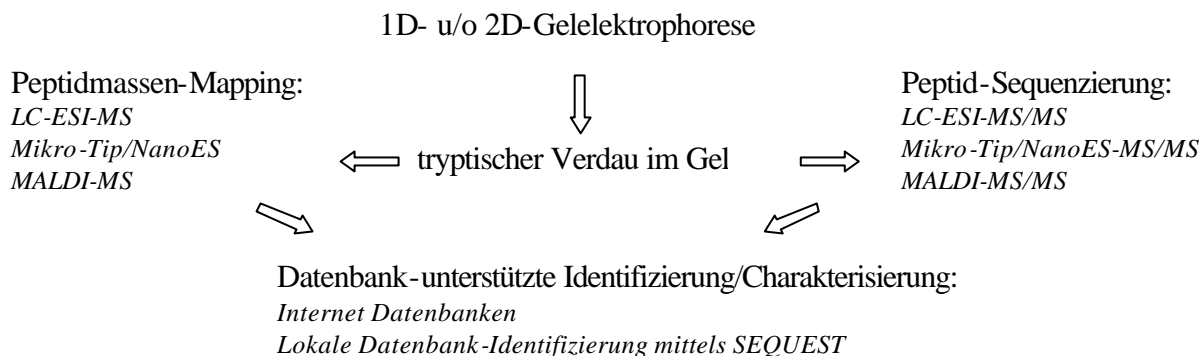


Abb. 2.13. *MS-basierende Strategien zur Identifizierung und Charakterisierung gelelektrophoretisch getrennter Proteine nach Clauser et al. [177].*

2.4.2. *Der Verdau im Gel* [136]

Ganze Proteine lassen sich nur sehr schwer aus einem SDS-Polyacrylamidgel eluieren. Dagegen können die Peptide enzymatisch im Gel gespaltener Proteine vergleichsweise leicht eluiert werden [178]. Für eine verlässliche massenspektrometrische Analyse eines Proteinverdau sollte der chemische Untergrund möglichst niedrig gehalten werden. Detergentien (z.B. SDS, Triton) und Salze unterdrücken beim MALDI- und ESI-Prozess die Ionisierung der Peptide und müssen deshalb durch Waschen der Gelstücke in organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril entfernt werden [136]. Die Proteine sollten zur Minimierung der Gelverunreinigungen hoch konzentriert in dünnen Gelen vorliegen. Die Gelbanden sollten zudem so eng wie möglich ausgeschnitten werden [178,179]. Die enzymatische im Gel-Spaltung von Proteinen ist sowohl auf Silber- als auch auf CBB-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele (Natriumlaurylsulfat, SDS) anwendbar. Die CBB-Färbung ermöglicht aber verlässlichere MS-Daten [142,180]. Bei einem Membranverdau (Nitrocellulose) können nach Tempst *et al.* gegenüber einem in-Lösungsverdau, 70-80 % der proteolytischen Spaltprodukte erhalten werden [136]. Beim Verdau im Gel können noch höhere Peptidausbeuten erzielt werden, weshalb ein im Gel-Verdau stets einem Membranverdau vorgezogen werden sollte [181]. Selbst bei niedrig konzentrierten Proteinen konnten Hellman *et al.* zeigen, dass beim Verdau im Gel eine Peptidausbeute von 50-80 % im Vergleich zum in-Lösungsverdau resultierte [182]. Die Ausbeuten betragen bei höheren Proteinkonzentrationen etwa 70-90 % [142,182]. Chromatographische Untersuchungen (RP-HPLC bei 215 nm UV-Absorption) konnten zeigen, dass beim Verdau im Gel keine Peptide selektiv verloren werden [180]. Eine hohe Peptidausbeute erfordert neben der optimalen enzymatischen Spaltung auch eine quantitative Extraktion der Peptide aus dem Gel. Insbesondere bei der Untersuchung posttranslationaler Modifikationen, wo eine hohe Sequenzabdeckung angestrebt wird, ist ein optimaler im Gel-Verdau erforderlich [181]. Die Gelstücke sollten vor ihrem Verdau feucht bei 4°C aufbewahrt werden [178]. Bei der unter reduzierenden Bedingungen erfolgenden SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese, PAGE) werden die Proteine häufig unvollständig entfaltet, d.h. nicht alle Disulfidbrücken werden gespalten. Somit verläuft die proteolytische Spaltung dieser Proteine teilweise unvollständig. Man erhält über Disulfidbrücken verbundene Peptidfragmente. Neben einer verringerten Peptidausbeute resultieren somit auch gemischte, theoretisch schwer berechenbare Peptidfragmente. Unmodifizierte Cysteinreste sind zudem chemisch instabil und können schlecht sequenziert werden [136]. Die Proteine werden deshalb vor ihrem Verdau in der Gelmatrix *in-situ* reduziert (Dithiothreitol) und alkyliert (4-Vinylpyridin) [183-185]. Die Alkylierung erfolgt im Dunkeln, um die Polymerisation des 4-Vinylpyridins zu vermeiden. Durch die Derivatisierung mit 4-Vinylpyridin werden die stark nukleophilen Thiolgruppen der Cysteinreste vor artifiziellen Modifikationen geschützt (z.B. Oxidation) [186]. Die pyridylethylierten Cysteine haben aufgrund ihres basischen Charakters zudem den Vorteil, dass sie positive Ladungen aufnehmen und somit die Ausbildung zweifach positiv geladener Peptidionen unterstützen können. [187]. Pro Cysteinrest erhöht sich das Molekulargewicht der reduzierten Peptide bei S-Pyridylethylierung um jeweils 105 Da [188]. Die Substrat-Protease-Wechselwirkung und die Reaktionskinetik des im Gel-Verdau wurden bislang nicht systematisch untersucht. Der Verdau mit Trypsin erfolgt deshalb 16 Stunden lang bei 37°C [136]. Das verwendete Lösungsmittelvolumen sollte möglichst gering gehalten werden. Die Gelstücke sollten beim Verdau nicht austrocknen. Das Enzym-zu-Substrat-Verhältnis sollte möglichst optimal bemessen werden. Zu große Proteasemengen führen zu unspezifischen Schnitten, zu geringe Proteasemengen ergeben lediglich einen partiellen Verdau [189]. Bei hohen Proteinkonzentrationen sollte das Enzym-zu-Substrat-Verhältnis deutlich erhöht werden. Die Lagerung des Verdauextraktes bei -70°C über mehrere Tage führte zu keinem

erkennbaren Verlust von Peptiden [136]. Beim im Gel Verdau CBB-gefärbter Proteine sollten sowohl CBB als auch SDS vollständig entfernt werden, da diese die Wirkung der Protease beeinträchtigen [190]. Trypsin bietet den Vorteil, dass die resultierenden Peptide eine ideale Größe für die MS-Analyse haben. Zudem haben tryptische Peptide mit Arginin (R) oder Lysin (K) basische Aminosäurereste an ihrem C-terminalen Ende. Bei der positiv-Ionen-ESI-MS bilden diese hauptsächlich $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülonen, welche sich mit Hilfe der Tandem-MS/MS sehr effektiv sequenzieren lassen [142,191]. Trypsin ist eine Serinprotease, welche spezifisch C-terminal von Lysin- und Argininresten spaltet. Sie spaltet nicht bei X-Pro-Bindungen ($X = R, K$) und nur vermindert wenn auf X ein saurer Rest folgt. Lys-C ist ebenfalls eine Serin-Protease. Lys-C spaltet C-terminal von Lysinresten (K) und schwach unspezifisch bei Asn-X-Bindungen ($X = \text{Lysin}$). Beide Proteasen besitzen ein pH-Optimum bei pH 8.5-8.8, eine optimale Arbeitstemperatur von 37°C und ein optimales Enzym-zu-Substrat-Verhältnis (bei in-Lösungsverdau) von etwa 1/50 (m/m). Eine Übersicht bzgl. Proteasen und Verdaubedingungen (Temperatur, pH-Wert, Spezifität) findet sich bei Lee *et al.* [185] und Sweeney *et al.* [192].

Tab. 2.2. *Tabellarische Auflistung von Proteinmodifikationen, welche infolge der SDS-PAGE auftreten können. Bei Polyacrylamid-Gelen (Polymerisation von Acrylamid-Monomeren) kann nicht umgesetztes Acrylamid-Monomer mit Proteinen kovalente Addukte bilden. Da der Polymerisationsgrad der Gele selten mehr als 90 % beträgt befindet sich relativ viel freies Acrylamid in der Matrix [136].*

Funktioneller Rest	Modifikation	Zunahme M_w [Da]
Cystein	Cystein-Acrylamid	+71
	oxidiertes Cystein-Acrylamid	+86
	Cystein-DTT	+76
N-Terminus	-NH-Acrylamid	+71
Methionin	Methionin-Sulfoxid	+16

2.4.3. Identifizierung von Proteinen mit Hilfe des Peptidmassen-Mappings [36]

Zu den Anfangszeiten der Gensequenzierung wurden die entsprechenden Proteine meistens gleichzeitig massenspektrometrisch charakterisiert [193,194]. Für die Charakterisierung der Proteine wurden diese mit spezifischen Proteasen gespalten und die Peptidmassen massenspektrometrisch bestimmt. Durch den Vergleich zwischen den ermittelten und theoretisch berechneten Peptidmassen (*mass-map*, *fingerprint*) konnten Translations-, Insertions-, Deletionsfehler, Punktmutationen und posttranslationale Modifikationen der Peptide erkannt werden [2,195]. Da sich bei einem Peptid die Zusammensetzung der Aminosäuren in dessen Molekülmasse widerspiegelt, kann ein kleines, verdautes Protein anhand der Masse eines einzigen Peptids identifiziert werden. Bei längeren Proteinsequenzen erhöht sich jedoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten mehrerer gleich schwerer Peptide (± 1 Da). Das Peptid-*Mapping* konnte 1993 zum ersten Mal zur Identifizierung unbekannter Proteine eingesetzt werden [160-163,196]. Das Peptidmassen-*Mapping* (*fingerprint*) ist eine Datenbank-unterstützte MS-basierende Methode zur Identifizierung von Proteinen. Die Proteine werden mit einer spezifischen Protease gespalten und die exakten Molekulargewichte der resultierenden Peptide massenspektrometrisch bestimmt. Mit den Peptidmassen durchsucht man anschließend eine computererstellte Peptidmassenliste, welche durch *in silico*-Verdau (Verwendung derselben Protease) einer Protein- oder übersetzten DNA-Datenbank erzeugt wurde. Aus dem Vergleich der ermittelten und theoretisch berechneten

Peptidmassen erhält man als Resultat eine Wahrscheinlichkeits-basierende Auflistung identifizierter Proteinkandidaten. Zur Aufreinigung und Trennung der relativ kleinen Peptide setzt man bevorzugt die RP-HPLC ein [176,197-200]. Die Massen, der in den gesammelten LC-Fractionen enthaltenen Peptide, können *off-line* mit Hilfe der MALDI-oder NanoES-MS oder *on-line* mit Hilfe der LC/ESI-MS bestimmt werden. Bei der MALDI-MS erleichtert die Bildung der zumeist einfach geladenen Peptidionen die Peptidmassenauswertung erheblich. Besonders seit Einführung der Proteom-Forschung wurde die Methode des Peptid-*Mappings* im Laufe der letzten Jahre stark verbessert. Die aktuellen MS-technischen Entwicklungen ermöglichen einen hohen Probendurchsatz (*high-throughput*) und eine erhöhte Sensitivität. Die empfindliche massenspektrometrische Analyse PAGE-getrennter biologischer Proben erfordert nach Reid *et al.* vor allem eine perfekte Probenvorbereitung [201]. MALDI- und ESI-MS tolerieren die für gewöhnlich eingesetzten Pufferbestandteile bis zu einem gewissen Grad. Bei der Aufkonzentration der Proben reichern sich jedoch auch Salze und Detergentien an. Als Folge davon kommt es zu einer erheblichen Verschlechterung der Spektren-Qualität (S/N nimmt ab). Aus diesem Grund wurden unterschiedlichste Verfahren zur Aufreinigung der Proben entwickelt:

- die Matrix-Probenspots der MADLI-MS können wiederholt gewaschen werden [147],
- der Matrixlösung wird Nitrocellulose zugesetzt (zur Bindung polarer Bestandteile) [142],
- RP-Bead-Peptid-Entsalzung [202,203] oder
- Entsalzungs-Konzentrations-Methoden (sogenannte RP-Mikro-Tips siehe Kap. 2.3).

Neben der Probenvorbereitung spielt auch die Exaktheit der Peptidmassenbestimmung für den Erfolg einer Datenbanksuche eine erhebliche Rolle. Moderne MALDI-TOF Geräte erreichen aufgrund der Entwicklung von *delayed extraction* [154] und Reflektron eine Massengenauigkeit von ± 10 ppm und ermöglichen dadurch eine erheblich zuverlässigere Proteinidentifizierung [153]. Auch durch die Wahl der Protease kann die Identifizierung zusätzlich verbessert werden. Nach Fenyö *et al.* [204] hängt der Erfolg der Proteinidentifizierung von der Sequenzlänge bzw. der Masse der analysierten Peptide ab. Die Anzahl der identifizierten Proteinkandidaten nimmt mit zunehmendem Molekulargewicht der erzeugten Peptide sehr stark ab. Beim Peptid-*Mapping* sollten demzufolge Proteasen eingesetzt werden, mit denen möglichst große Peptide erzeugt werden können.

Im Folgenden soll auf einige Probleme des Peptid-*Mappings* hingewiesen werden:

- Für eine hohe Qualität der Identifizierung müssen bei der Datenbanksuche mindestens 8 Peptidmassen verwendet werden [141]. Die Untersuchungen von Godovac-Zimmermann *et al.* [205] erbrachten bei einer Massengenauigkeit von ± 300 ppm eine Abdeckung der Proteinsequenz von 18-20 %, wobei durchschnittlich 6-12 passende Peptidmassen gefunden wurden.
- Stark modifizierte Proteine können nur sehr schwer identifiziert werden, da die ermittelten Peptidmassen nicht mit den theoretisch berechneten Massen aus der Datenbank übereinstimmen.
- Aufgrund der stetig zunehmenden Datenbankeinträge ist für eine eindeutige Identifizierung eine hohe Massengenauigkeit (< 70 ppm) der Peptidmassenbestimmung erforderlich. Diese kann nur mit sehr teuren Massenspektrometern erreicht werden.
- Bei Proteinen, welche nur in sehr geringer Menge vorliegen, reicht die Anzahl der isolierten Peptide oft nicht für eine eindeutige Identifizierung aus [206].
- Zwar können modifizierte Peptide identifiziert werden, die Position der Modifikation innerhalb der Aminosäuresequenz kann jedoch nicht ermittelt werden.
- Durch Tandem-MS/MS Fragmentionen-Information einzelner Peptide kann die Qualität der Identifizierung erheblich verbessert werden (Kap. 2.4.4).

2.4.4. Sequenzierung und Identifizierung von Peptiden mit Hilfe der Tandem-MS/MS [5,36,188]

Die Tandem-MS/MS entwickelte sich seit ihrer Einführung im Jahr 1968 zu einer der wichtigsten Techniken bei der Aufnahme kollisionsaktivierter Zerfälle (CID) [115,116]. Somit konnte man Peptide mit der Tandem-MS/MS zwar schon relativ früh sequenzieren, jedoch waren die Methoden aufgrund der aufwendigen und fragmentierungsbehafteten Ionisierung nur begrenzt nutzbar [114,207-209]. Der eigentliche Durchbruch gelang erst mit Einführung der schonenden LSIMS- und FAB-Ionisierung, mit denen es möglich war, unfragmentierte $[M+H]^+$ -Peptidionen zu erzeugen [209-215]. Beim Niederenergie-CID fragmentieren einfach geladene Peptidionen im Vergleich zu mehrfach geladenen Peptidionen aber sehr unzureichend. Durch die Entwicklung der ESI waren dann aber auch unfragmentierte mehrfach geladene Protein- und Peptidionen für den Niederenergie-CID zugänglich [188,216]. Aufgrund der schonenden Ionisierung reicht die innere Energie der ESI-Peptidionen für eine effiziente Fragmentierung nicht aus. Bei Tandem-MS/MS-Experimenten wird deshalb die innere Energie der Ionen durch die Kollisionsaktivierung erhöht [117]. Bei Hybridgeräten (Triple-Quad-MS) besitzen die Vorläuferionen eine relativ niedrige kinetische Energie (< 100 eV), aber eine relativ lange Verweilzeit (einige 10-100 msec) in der Kollisionszelle [188,213,214]. Der eigentliche CID-Prozess besteht aus zwei zeitlich voneinander getrennten Schritten: Zuerst erfolgt in einem ersten, schnellen Schritt (etwa 10^{-15} - 10^{-14} sec) die Kollisionsaktivierung. Ein Teil der Translationsenergie der beschleunigten Ionen wird dabei in innere Energie sowohl der Ionen als auch des Stoßgases umgewandelt (siehe Kap. 2.2.5.2). Im zweiten Schritt zerfällt das energetisch angeregte Ion. Die Produktionenausbeute hängt somit vom unimolekularen Zerfall des Vorläuferions nach dessen Anregung ab. Nach der *Quasi-Equilibrium Theory* (QET) ist das Ausmaß des Zerfalls davon abhängig, wie viel Energie die gegebenen Schwingungs-Freiheitsgrade für den Bindungsbruch aufnehmen können. In einem linearen Molekül mit N Atomen gibt es $3N-6$ Schwingungs-Freiheitsgrade. Die Zahl der Schwingungs-Freiheitsgrade steigt somit direkt proportional mit dem Molekulargewicht einer gegebenen Verbindungsklasse an. Infolge der zufälligen Verteilung der inneren Energie entlang der Schwingungs-Freiheitsgrade nimmt der durchschnittliche energetische Freiheitsgrad mit zunehmender Molekülmasse ab. Deshalb nimmt auch die Zahl der gebildeten Fragmentionen mit zunehmendem Molekulargewicht ab [217]. Für den effektiven Zerfall eines größeren Moleküls ist deshalb eine höhere Kollisionsenergie erforderlich [117]. Um dennoch eine ausreichend große Anzahl Fragmentionen zu erhalten, werden bei größeren Peptiden bevorzugt die mehrfach geladenen Molekülionen fragmentiert (s.u.) [217]. Für den Niederenergie-CID wird in der Regel ein rf-only Quadrupol als Reaktionszelle verwendet. Die Ionen können bei gleichzeitiger Kontrolle von Kollisionsenergie (Beschleunigungsspannung) und Kollisionszahl (Stoßgasdruck) effektiv gespeichert und durchgeleitet werden. Aufgrund der guten fokussierenden Eigenschaften des rf-only Quads haben die Ionen, selbst nach erfolgter Kollision und Fragmentierung, immer noch stabile Trajektorien [111]. Ein Großteil der maximal zur Verfügung stehenden Energie wird bei den Kollisionen in innere Energie der Projektilionen umgewandelt. Beim Niederenergie-CID hat die Wahl des Stoßgases deshalb eine entscheidende Bedeutung. Aufgrund der höheren kinetischen Energie ihrer Massezentren sollten schwerere Stoßgasmoleküle verwendet werden [117]. Der Stoßgasdruck kann die Fragmentierung ebenfalls beeinflussen. Mit zunehmendem Gasdruck nimmt der durchschnittlich pro Kollision verteilte Energieanteil zu und führt somit zur einer verstärkten Bildung niedrigmassiger Fragmente [213]. Beim CID unbekannter Peptide verwendet man in der Praxis Gasdrücke und Kollisionsenergien, welche aus Untersuchungen von Modellpeptiden übertragen werden [213].

Mit Hilfe der beim Niederenergie-CID mehrfach geladener Peptidionen gebildeten struktursignifikanten Fragmentationen kann eine sogenannte Produktions-Analyse durchgeführt werden. Aufgrund der ladungskontrollierten Fragmentierung [217,218] der Peptide (vorrangig zwischen Carbonyl-Kohlenstoff und Amid-Stickstoff entlang des Peptidrückgrats) werden sequenzspezifische Ionenserien gebildet [114,210]. Verbleibt nach der Spaltung der Peptidbindung die Ladung am N-terminalen Ende des Fragmentions, entsteht ein b-Typ Ion. Verbleibt die Ladung am C-Terminus, wird ein y-Typ Ion gebildet (Abb. 2.14) [211,219]. Die Aminosäuresequenz eines Peptids kann somit aus den Abständen benachbarter Signale des Fragmentionenspektrums abgeleitet werden. In der Regel erhält man keine kompletten Ionenserien, sondern lediglich Teilsequenzen [114,220]. Außer den b- und y-Fragmentationen (Spaltung einer Bindung) werden auch interne Fragmentationen (Spaltung zweier Bindungen) gebildet [210,221]. Interne Fragmentationen, welche nur einen Aminosäure-Rest enthalten, können durch zusätzliche Abspaltung von CO sogenannte Immonium-Ionen bilden (Abb. 2.14) [222].

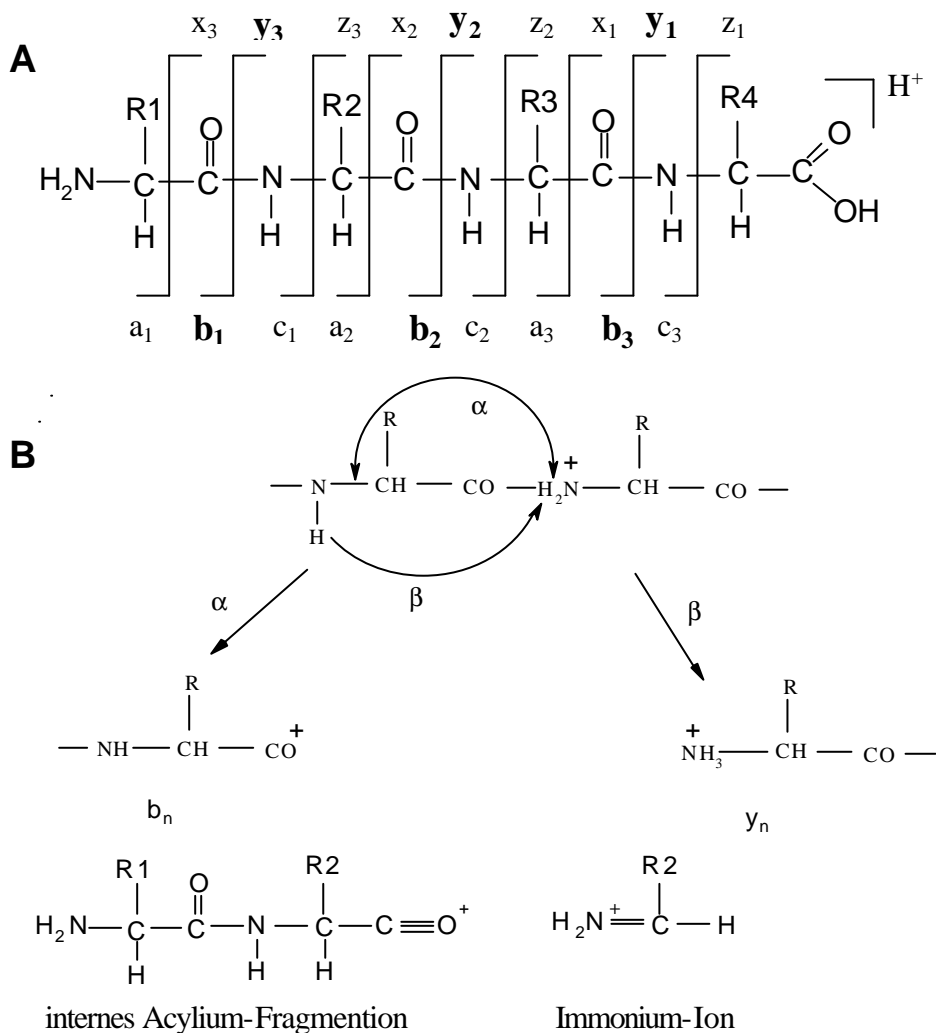


Abb. 2.14. (A) Nomenklatur [219,220,231] und (B) Entstehung der Fragmentationen, welche beim Niederenergie-CID protonierter Peptide auftreten [36,188,211,212].

Da die Peptidionen im Vergleich zum negativen Ionenmodus für gewöhnlich höhere Intensitäten aufweisen, arbeitet man bei der direkten CID-Sequenzierung von Peptiden vorrangig im positiven Ionenmodus. Peptide mit stark sauren Gruppen (z.B. Phosphopeptide) ionisieren im positiven Ionenmodus nur sehr schlecht. Zudem verläuft deren Fragmentierung beim positiv-Ionen-Niederenergie-CID ebenfalls sehr schlecht [211]. Tryptische Peptide können im Gegensatz dazu im positiven Ionenmodus besonders effizient fragmentiert werden. Tryptische Peptide haben an ihren C-terminalen Enden mit Arg oder Lys basische Aminosäurereste und sind zudem nicht blockiert. Bei der positiv-Ionen-ESI-MS bilden sich deshalb vorrangig $[M+2H]^{2+}$ -Vorläuferionen. Bei der Kollisionsaktivierung fragmentieren diese sehr effizient und erzeugen leicht zu interpretierende Ionenserien einfach geladener Fragmentionen. [5,188,217,223-225]. Bei der MS/MS-Analyse tryptischer Peptide können im oberen Massenbereich des Massenspektrums sehr oft prominente γ -Fragmentionenserien beobachtet werden [36,223,226]. Enthalten die tryptischen Peptide zusätzlich noch Histidinreste, so können auch höhere Ladungszustände wie +2 beobachtet werden [223,225].

Im Hochvakuumbereich des Massenspektrometers sind in der Gasphase keine Lösungsmittelmoleküle mehr vorhanden. Die Delokalisierung der Ladung entlang des Peptidrückgrats kann bei den Peptidionen deshalb nur durch interne Solvatisierung erfolgen. Hierbei handelt es sich um einen Faltungsprozess, bei welchem eine oder mehrere Amidbindungen in die Nähe des protonierten NH_2 -terminalen Endes gelangen. Die Umwandlung von kinetischer Energie in Schwingungsenergie führt bei der Kollisionsaktivierung zur Spaltung der Amidbindungen (s.o.). Die Zahl der basischen Aminosäurereste (Lys, Arg, His, Try, Pro), sowie deren Position innerhalb der Peptidkette, hat einen erheblichen Einfluss auf die Bildung der Fragmentionen. Kommen N-terminal Arginin- oder Lysinreste vor, dominieren b-Fragmentionenserien. Befinden sich diese Reste C-terminal, dominieren γ -Ionenserien [211,228,229]. Beim CID größerer Polypeptide scheinen insbesondere die Prolinreste eine wichtige Rolle zu spielen. Die Amidbindungen der Prolinreste dissoziieren besonders leicht und beeinflussen dadurch den Verlauf der Fragmentionenserien [216,227,230]. Bei Prolin steht im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren die Aminogruppe als Iminogruppe im Ring. Der 5-Ring verhindert die freie Drehbarkeit der N-C Bindung. Dies wirkt sich entscheidend auf die Konformation des Polypeptidrückgrats und den Verlauf des ladungskontrollierten Zerfalls aus. Serin- oder threoninhaltige Fragmentionen werden häufig von einem Neutralverlust von Wasser begleitet (Satellitenionen im Abstand von 18 Th). Entsprechend treten bei Arg-, Lys-, Glu- und Asp-haltigen Fragmentionen infolge eines NH_3 -Verlustes Satellitenionen im Abstand von 17 Th auf [210,217]. Neben den größeren Abstoßungskräften besitzen die mehrfach geladenen Ionen auch eine höhere kinetische Energie [122,229]. Der Niederenergie-CID mehrfach geladener Peptide (*Multiply Charged Peptides*, MCP) wurde von Tang *et al.* untersucht [225]. Es konnte kein entsprechender mechanistischer Ansatz zur Interpretation der auftretenden Fragmentionen, wie im Falle der zweifach protonierten tryptischen Peptide, entwickelt werden. Jedoch wurde festgestellt, dass eine hohe Beweglichkeit der ionisierenden Protonen entlang des Peptidrückgrates für eine bessere ladungskontrollierte Dissoziation notwendig ist. Stark basische Reste können die Protonen fixieren und dadurch die Effizienz der Niederenergie-Kollisionsaktivierung verringern [225].

Die Entwicklung der *off-line*-NanoES war ein großer Fortschritt für die Tandem-MS/MS [191,232]. Aufgrund der geringen Flussrate steht bei der NanoES-MS eine relativ lange Messzeit zur Verfügung. Dadurch können CID-Parameter während der Analyse optimiert werden. Selbst bei schwach konzentrierten Peptiden kann durch Akkumulation vieler Scans ein sehr gutes S/N-Verhältnis erzielt werden. Nicht aufgetrennte Peptidmischungen können ebenfalls untersucht werden. Bei sehr komplexen Mischungen kommt es jedoch häufig zur Unterdrückung von Ionensignalen, sodass einzelne Komponenten oft nicht mehr detektierbar

sind. Dieser Effekt kann oft beim positiv-Ionen-CID phosphorylierter Peptide beobachtet werden.

Moderne MALDI-TOF Geräte ermöglichen ebenfalls die Sequenzierung von Peptiden [136]. Man nützt dabei die Entstehung metastabiler Ionen während des MALDI-Prozess aus. Die sogenannten PSD-Spektren enthalten ebenfalls Fragmentationserien [233]. Im Vergleich zum CID unter ESI-Bedingungen hat diese Methode jedoch den Nachteil, dass eine Interpretation der Spektren aufgrund der Dominanz interner Acylium-Ionen sowie unspezifischer Spaltungen entlang des Peptidrückgrates nur sehr schwer durchführbar ist [234].

2.4.5. Mikro-Techniken zur Aufreinigung und Konzentration von Peptidmischungen

Für die rasche MALDI- und ESI-MS-Analyse subpicomolarer Peptidmengen wurden im Lauf der letzten Jahre unterschiedliche miniaturisierte Probenvorbereitungsmethoden entwickelt. Wilm und Mann [104] verwendeten bei ihrer Zentrifugationstechnik eine mit Perfusions-Chromatographie-Material gefüllte Glaskapillare. Mit Hilfe der NanoES-MS/MS konnten sie somit femtomolare Mengen nicht aufgetrennter Peptide sequenzieren [232]. Die Technik wurde anschließend von Neubauer und Mann verfeinert [235]. Der Verlust von hydrophilen Peptiden während des Entsalzungsschrittes wurde zusätzlich durch eine Doppelsäulenstrategie mit unterschiedlich polaren Chromatographiematerialien verhindert. Über ähnliche Mikro-Entsalzungsansätze, bei welchen das RP-Material in Pipettenspitzen oder Gel-Loader-Tips gefüllt wurde, wurde ebenfalls [181,236-239].

2.4.6. Bioinformatik und Proteinanalyse [240,241]

Die schnelle und zuverlässige Auswertung der massenspektrometrischen Daten ist ein wichtiger Bestandteil der modernen Proteom-Analytik. Die Identifizierung und Charakterisierung der Proteine erfolgt durch Vergleich experimenteller MS-Daten und Protein- bzw. Gendatenbank-basierender Daten [241-243]. Durch die stetige Entwicklung des *World Wide Web* (WWW) [243] hat sich diesbezüglich die Arbeit der Biowissenschaftler, speziell der Proteinbiochemiker und Biomediziner, in drastischer Weise verändert. Die experimentell gewonnenen Daten können heute innerhalb kürzester Zeit über das Internet auf unterschiedlichen, weltweit verteilten Servern ausgewertet werden. Die Bioinformatik stellt für die Datenanalyse stets aktualisierte Datenbanken sowie modernste Computer-Algorithmen zur Verfügung [240-242,244]. Kapitel 6.3.9.10 enthält eine tabellarische Auflistung der wichtigsten MS-Analyseprogramme und www-Seiten.

2.4.7. Korrelation von MS/MS-Daten mit Peptidsequenzen aus Datenbanken

Die zunehmende Anzahl der in Protein-Datenbanken eingetragenen Proteinsequenzen führte zu einer deutlichen Verbesserung der Tandem-MS/MS-basierenden Peptidanalyse. Mit Hilfe von Computer-Algorithmen können die experimentellen Daten eines CID-Spektrums mit den theoretisch berechneten Daten aus Protein- und Nukleotid-Datenbanken verglichen und die Proteine identifiziert und charakterisiert werden [36,164,245-248]. Ein Tandem-Massenspektrum enthält drei Arten von Information. Zum einen enthält es die Masse des untersuchten Peptids. Durch genaue Peptidmassenbestimmung und Verwendung einer Protease mit hoher Spezifität kann die Anzahl passender Peptidkandidaten erheblich reduziert werden. Zur Ermittlung der exakten Peptidsequenz ist jedoch mehr Information erforderlich. Das Tandem-Massenspektrum enthält zusätzlich ein einzigartiges Fragment- bzw. Sequenzmuster, welches nur der Aminosäuresequenz des fragmentierten Peptids entspricht (*fingerprint* der Aminosäuresequenz). Mit Hilfe von Computer-Algorithmen kann

eine Korrelationsanalyse durchgeführt werden. Man ermittelt dabei den Grad der Übereinstimmung des ermittelten MS/MS-Spektrums mit allen theoretisch berechneten Fragmentationmustern der zu dem untersuchten Peptid isobaren Aminosäuresequenzen. Dieses Prinzip liegt auch dem von Yates *et al.* entwickelten computerunterstützten Auswertalgorithmus SEQUEST (Kap. 6.3.9.9) zugrunde [164,246]. Als Maß der Übereinstimmung zwischen einem rekonstruierten und einem experimentell ermittelten MS/MS-Spektrum erhält man bei SEQUEST einen *cross-correlation*-Wert. Die Größe dieses Wertes ist ein Maß für die Qualität der Übereinstimmung. Schließlich enthält ein MS/MS-Spektrum auch noch die Sequenz des Peptids. Mit Hilfe einer kurzen Teilsequenz, welche aus dem Tandem-MS/MS-Spektrum ermittelt werden kann (*sequence-tag*, 3-4 Aminosäurereste), lässt sich in Kombination mit der Masse des kompletten Peptids bzw. der Fragmentionen die Spezifität der Auswertung zusätzlich verbessern [249].

2.5. *Phospho-Proteomics*

Ein Großteil der in eukaryontischen Zellen vorkommenden Proteine liegt posttranslational modifiziert vor. Bislang konnten *'in vivo'* über 200 unterschiedliche Arten von posttranslationalen Aminosäuremodifikationen gefunden werden, wobei von den wenigsten bekannt ist, welche Funktion sie besitzen [250]. Wie sich seit ihrer Entdeckung vor über vier Jahrzehnten herausgestellt hat, handelt es sich bei der reversiblen Proteinphosphorylierung [251] um einen wichtigen Mechanismus bei der Regulation fundamentaler zellulärer Ereignisse (Wachstum, Teilung und Differenzierung von Zellen, intrazelluläre Signaltransduktion, Genexpression, Enzymaktivität usw. [9-15]). Man nimmt an, dass etwa 30 % aller Proteine, welche in typischen Säugerzellen exprimiert werden, während einer Phase der Zellexistenz phosphoryliert werden [16]. Die Aufklärung der komplexen regulatorischen Netzwerke und Signaltransduktions-Systeme eukaryontischer Zellen steht deshalb im Zentrum der aktuellen zellbiologischen und biomedizinischen Forschung. Der reversible Mechanismus der Proteinphosphorylierung beruht auf einem Wechselspiel zweier unterschiedlicher Enzymgruppen: die Proteinkinasen, welche spezifische Reste (hauptsächlich Serin-, Threonin-, Tyrosin- oder Histidin-Reste) innerhalb der Proteine phosphorylieren und die Proteinphosphatasen, welche die Dephosphorylierung katalysieren [10,17]. Nach Hunter *et al.* [252] entfallen 90 % aller zellulären Phosphorylierungen auf Serin-, 9,9 % auf Threonin- und nur 0,1 % auf Tyrosinreste. Es wird vermutet, dass beim Menschen etwa 2000 Gene (das entspricht etwa 2 % des gesamten humanen Genoms) Proteinkinasen und 1000 Gene Proteinphosphatasen codieren [10]. Die Phosphorylierung führt zur Bildung eines Phosphatesters, welcher unter neutralen pH-Bedingungen zwei negative Ladungen besitzen kann. Geht man nun von einem ungeladenen Aminosäurerest aus, so bewirkt die Proteinphosphorylierung eine erhebliche Änderung des Ladungszustandes innerhalb eines definierten Strukturereichs. Somit kann eine Phosphorylierung sehr effektiv eine Änderung der Proteinfunktion bewirken. Es können neue Bindungsstellen für Proteine entstehen, welche inhibitorisch oder aktivierend wirken oder die Zielsteuerung des Proteins zu einem spezifischen intrazellulären Kompartement dirigieren können.

2.5.1. *Konventionelle Analyse von Phosphoproteinen mit Hilfe der Radiomarkierung*

Zur Identifizierung von Proteinphosphorylierungen müssen selbst bei bekannter Proteinsequenz für gewöhnlich verschiedene Markierungs-, Trenn- und Detektionsmethoden eingesetzt werden. Trotz ^{32}P -Markierung reicht bei den konventionellen Analysestrategien oftmals die Sensitivität nicht aus. Die Gründe hierfür sind [144,253,254]:

- Der Einbau der Radiomarker verläuft unter zellulären Bedingungen für gewöhnlich sehr schlecht.
- Der Großteil der Phosphoproteine, welche in die Signaltransduktion einer Zelle einbezogen werden, kommt nur in sehr geringen Mengen vor.
- Die biologischen Proben sind meistens nur in begrenzter Menge verfügbar.
- Aufgrund der niedrigen Phosphorylierungsstöchiometrie weisen die Phosphoproteine in der Regel einen geringen Phosphorylierungsgrad auf.

Die Proteinphosphorylierung hat im Vergleich zu anderen regulatorischen Modifikationen aber den Vorteil, dass die Phosphoesterbindung unter physiologischen pH-Bedingungen stabil ist und auch die Zellyse unbeschadet übersteht [255].

Nahezu alle konventionellen biochemischen und molekularbiologischen Methoden zur Identifizierung und Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen beinhalten die Radiomarkierung der Phosphoproteine. Bei *'in vivo'*-Experimenten verwendet man für die

metabolische Markierung [^{32}P]Orthophosphat. Bei *'in vitro'*-Experimenten phosphoryliert man die Proteine in Gegenwart von [γ - ^{32}P]ATP mit Hilfe einer Kinase. In der Regel werden *'in vivo'*- und *'in vitro'*-Proteinphosphorylierungen unterschiedlich reguliert [256,257,258]. Bei *'in vivo'*-Experimenten lysiert man zunächst die Zellen, trennt danach die Proteine des gesamten Zellysats bzw. die immunpräzipitierten Phosphoproteine mit Hilfe der 1-DE oder 2-DE auf und visualisiert die radioaktiv markierten Phosphoproteine durch Autoradiographie oder Phosphorimaging [175,259-263]. Zur Identifizierung der phosphorylierten Aminosäure wird das Phosphoprotein zuerst hydrolysiert. Die resultierenden Aminosäuren werden dann mit Hilfe der ein- oder zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Phosphoaminosäuren autoradiographisch detektiert [264,265].

Sehr viel häufiger wird für die Phosphoproteinanalyse jedoch das Phosphopeptid-Mapping angewandt. Die Phosphoproteine werden hierbei chemisch oder enzymatisch (durch spezifische Proteasen) gespalten und die resultierenden Peptide durch HPLC [266,267], SDS-PAGE (eindimensional) oder 2D-TLC aufgetrennt [265,268,269]. Beim 2D-Phosphopeptid-Mapping (TLC, *Thin-Layer Chromatography*) trennt man die Peptidmischung in zwei Dimensionen. In der ersten Dimension erfolgt eine Hochspannungselektrophorese, in der zweiten Dimension eine Dünnschichtchromatographie. Für die autoradiographische Detektion eines ^{32}P -markierten Phosphopeptids werden dabei nur wenige Hundert dpm benötigt. Bei der HPLC-Trennung sammelt man Fraktionen, bestimmt von diesen die Radioaktivitäten, erstellt mit den ermittelten Werten ein Cerenkov-Chromatogram. Die Phosphopeptide in den radioaktiven Fraktionen und den 2D-TLC-Spots werden mit Hilfe der Phosphoaminosäure-Analyse, der Edman-Sequenzierung oder der Massenspektrometrie analysiert [270]. Die Ermittlung der Phosphorylierungsstelle erfolgt mit Hilfe des Radio-Edmans. Bei jedem einzelnen Edman-Zyklus wird dabei die Radioaktivität bestimmt und anhand des Verlustes der Radioaktivität indirekt die Position des Phosphatrestes ermittelt [271-274]. Die Radio-Edman-Sequenzierung verläuft jedoch aufgrund der schlechten Extraktion des anorganischen Phosphates in die organische Phase sehr ineffizient. Aufgrund der geringen Phosphopeptidmenge können die beim konventionellen Edman-Abbau gebildeten PTH-Aminosäurederivate in der Regel nicht detektiert werden. Phosphopeptide können deshalb nicht auf diese Weise sequenziert werden. Zur Identifizierung der phosphorylierten Aminosäure wendet man deshalb die Phosphoaminosäure-Analyse an [265,275]. Für die Trennung der Aminosäuren setzt man dabei die 2D-TLC [263,276] oder die Anionenaustausch-Chromatographie ein [277]. Durch Vergleich der 2D-TLC-Muster von synthetischen Peptiden und Probenpeptiden kann die Peptidsequenz ebenfalls ermittelt werden [278]. Alternativ können die potentiellen Phosphorylierungsstellen durch eine *"site-directed"* Mutagenese ausgeschaltet und die 2D-TLC-Muster von nativer und mutierter Probe verglichen werden [279]. Trotz ihrer Empfindlichkeit hat die Radiomarkierung von Phosphoproteinen erhebliche Nachteile und Limitierungen [280]:

- Der Einbau von ^{32}P verläuft meist nur bei *'in vitro'*-Experimenten effektiv.
- Selbst sehr große Mengen eines Radiomarkers mit hoher spezifischer Aktivität werden bei *'in vivo'*-Experimenten nur zu einem äußerst geringen Grad in die Proteine eingebaut
- Die Autoradiographie liefert keine direkten strukturellen Informationen bezüglich der Phosphopeptide und lässt lediglich eine qualitative Auswertung zu.
- Menschen können nicht mit [^{32}P]Orthophosphat markiert werden
- Die Forscher werden radioaktiv belastet.

2.5.2. Konventionelle radioaktivitätsfreie Methoden

2.5.2.1. Phosphoaminosäure-Detektion mit Antikörpern und Fluoreszenzmarkierung

Tyrosinphosphorylierungen können mit Hilfe von Antikörpern immunologisch in Western-Blots untersucht werden [281-283]. Die Antikörper wirken jedoch sehr unspezifisch, zudem treten Kreuz-Reaktionen auf. Die Western-Blots sind zumeist sehr unempfindlich und können nur qualitativ ausgewertet werden. Der Einsatz gegen Phosphoserin und Phosphothreonin gerichteter Antikörper konnte noch nicht im gleichen Ausmaß erfolgen. Durch die Entwicklung seitenspezifischer Antikörper nimmt deren Anwendung aber stark zu [284]. Serinphosphorylierte Proteine und Peptide können auch mit Hilfe chemischer Fluoreszenzmarkierung detektiert werden. Dabei wird die Phosphatgruppe unter basischen Bedingungen eliminiert und mit Ethandithiol derivatisiert. Die modifizierten Peptide können mit Hilfe der CZE-LIF (*Capillary Zone Electrophoresis, Laser Induced Fluorescence*) detektiert und quantitativ bestimmt werden [285]. Phosphoaminosäuren können nach der partiellen Hydrolyse von Phosphopeptiden oder Phosphoproteinen (nach Hunter und Sefton [286]) auch in Form ihrer Dabsyl (4'-Dimethylaminoazobenzol)- oder PTH (Phenylthiohydantoin)-Phosphoraminosäurenderivate kapillarelektrophoretisch detektiert werden [287-289]. Nach Malencik *et al.* [290] sowie Murthy und Iqbal [291] kann zur Trennung der Phosphoaminosäurenderivate auch die HPLC eingesetzt werden [292]. Über die FMOC-Derivatisierung der eliminierten Phosphoraminosäuren und die anschließende HPLC-Trennung der Aminosäurenderivate wurde ebenfalls berichtet [257].

2.5.2.2. *Edman-Sequenzierung und basenkatalysierte β -Eliminierung* [287]

Die Phosphoesterbindungen von Phosphoserin- und Phosphothreoninaminosäuren sind unter den chemischen Bedingungen des schrittweisen Edman-Abbaus nicht stabil. Die kovalent gebundenen Phosphatgruppen können sehr rasch zu anorganischem Phosphat hydrolysiert bzw. eliminiert werden [289,292-294]. Dennoch können Phosphoserine/-threonine beim automatisierten Edman-Abbau in Form ihrer S-Ethylcystein- oder β -Methyl-S-cystein-PTH-Derivate identifiziert werden. Da die Zwischenprodukte, welche sich bei der Abbaureaktion bilden, instabil sind, kann die Reaktion nicht erfolgen, wenn sich die phosphorylierte Aminosäure am C- oder N-Terminus befindet. Phosphotyrosine können zwar unter gewissen Umständen in Form ihrer Phenylthiohydantoinderivate (PTH-Tyr(P)) identifiziert werden, jedoch wird die Anwendung des direkten Edman-Abbaus aufgrund der geringen Empfindlichkeit stark eingeschränkt. Zu den wichtigen Methoden, welche auf der chemischen Modifikation der phosphorylierten Aminosäurereste beruhen, zählt die basenkatalysierte β -Eliminierung. Unter alkalischen Bedingungen werden hierbei die Phosphatreste der Phosphoserin- und Phosphothreoninaminosäuren eliminiert und im Anschluss Ethanthiol nukleophil addiert [287,289]. Bei der alkalischen β -Eliminierung von Phosphoserin (mit NaOH) bildet sich Dehydroalanin. Phosphothreonin wird zu Dehydroamino-2-buttersäure umgesetzt. Die Addition von Ethanthiol führt zur Bildung von S-Ethylcystein- bzw. β -Methyl-S-cysteinresten. Nicht phosphorylierte Serin-/Threoninreste werden ebenso wenig umgesetzt wie Phosphotyrosine. Bei Phosphotyrosin verhindert der aromatische Ring die Ausbildung des für die β -Eliminierung notwendigen Übergangszustandes. Anhand der so gebildeten (modifizierten) Aminosäuren können die Phosphopeptide mittels Aminosäureanalyse oder Edman Abbau identifiziert und quantifiziert werden [285,295,296]. Nach Hsi *et al.* können Phosphoserine vor der SDS-PAGE mit Iodacetamidfluorescein markiert werden. Nach der SDS-PAGE eluiert man das Protein, spaltet es enzymatisch in Lösung, trennt die Peptide auf (RP-HPLC), transferiert diese auf eine PVDF-Membran und führt sie schließlich der Sequenzanalyse zu [297].

2.5.3. *Massenspektrometrische Methoden* [298]

Die Massenspektrometrie ist hervorragend zur raschen und sensitiven Untersuchung posttranslatiionaler Proteinmodifikationen geeignet [141,144,168,172]. Bei Phosphopeptiden erhöht sich pro Phosphatrest das Molekulargewicht im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Peptid um jeweils 80 Da. Die Phosphopeptide eines enzymatisch verdauten Phosphoproteins können deshalb mit Hilfe eines massenspektrometrischen Peptidmassen-Mappings ermittelt werden.

2.5.3.1. Phosphopeptid-Mapping und Tandem-MS (MS/MS)

Beim Phosphopeptid-Mapping werden die Phosphoproteine enzymatisch gespalten und mit Hilfe eines Massenspektrometers die Peptidmassen bestimmt. Die Phosphopeptide werden dann durch den Vergleich der ermittelten und theoretisch berechneten Peptidmassen bestimmt. Durch spezielle Markierungs-, Trenn- und Scantechniken kann die Selektivität des Phosphopeptid-Mappings deutlich verbessert werden. Für die Peptidmassenbestimmung werden sowohl ESI- [299-307] als auch MALDI-MS [145,256,303,308-315] eingesetzt. Trotz der extremen Sensitivität hat die MALDI-MS den Nachteil, dass die Proben *off-line* entsalzt werden müssen, da bei komplexen Peptidmischungen die Ionisierung der Phosphopeptide stets unterdrückt wird [256,316,317]. Die ESI-MS bietet den Vorteil der *on-line*-Kopplung mit der LC. Die Peptidmischungen können somit sehr fein aufgetrennt werden, was die Gefahr von Signalunterdrückungen erheblich verringert. Die Kapillarelektrophorese kann ebenfalls zur Trennung eingesetzt werden. Die Peptidmassenanalyse kann dabei entweder *off-line* mit MALDI-MS [318] oder *on-line* mit CIEF/ESI-MS [319] durchgeführt werden. Die Ermittlung der genauen Position der phosphorylierten Aminosäure erfolgt mit Hilfe der Tandem-MS/MS (sowohl MALDI-PSD als auch ESI-Tandem-MS/MS).

Bei der Untersuchung des kollisionsaktivierten Zerfalls LSIMS erzeugter Phosphopeptide konnte beobachtet werden, dass es zur Bildung genau definierter Fragmentionen kommt. Anhand dieser Fragmentionen konnten die Phosphopeptide nicht nur identifiziert (Kap. 2.5.3.3), sondern auch die exakte Position der Phosphatreste ermittelt werden [320]. Biemann und Scoble [321] konnten zeigen, dass einfach positiv geladene Serin-phosphorylierte Peptidionen bei ihrer Kollisionsaktivierung aufgrund einer Neutralverlustreaktion H_3PO_4 (98 Da) und HPO_3 (80 Da) verlieren. Aus dem Phosphoserin bildet sich dabei Dehydroalanin, außerdem entsteht ein Phosphoserin-Immoniumion bei m/z 140. Bei Tyrosin-phosphorylierten Peptiden bildet sich ein intensives Immoniumion bei m/z 216. Ebenso tritt ein Verlust von HPO_3 und HPO_4 auf. In den CID-Spektren ESI-erzeugter Phosphopeptidionen treten in der Regel die gewöhnlich vorkommenden b- und y-Typ Ionenserien auf. Aufgrund des Neutralverlustes von Phosphorsäure werden die Fragmentionensignale jedoch häufig von γ_n - H_3PO_4 Satellitenpeaks ($\Delta -98/z$ Th) begleitet [144]. Eine elegante Methode zur CID-Analyse phosphorylierter Peptide wurde von Hunt *et al.* vorgestellt [322]. Mit Hilfe der IMAC wurden dabei die Phosphopeptide zunächst aufkonzentriert und anschließend sequenziert (FAB-MS/MS). Heutzutage können die isolierten Phosphopeptide *on-line* (LC-ESI-MS/MS [145,205,273,303,304,310,311,313,317,323-331]) oder *off-line* (NanoES-MS/MS [300,312,314,315,332-335] bzw. MALDI-PSD [307,314,336]) sequenziert werden.

2.5.3.1.1. Einsatz von anti-Phosphotyrosin-Antikörper und ^{32/33}P-Markierung

Immunologisch können Tyrosin-phosphorylierte Proteine mit Hilfe von anti-Phosphotyrosin-Antikörpern in Western-Blots detektiert werden [205]. Häufiger wendet man aber die *in vitro*- oder *in vivo*-^{32/33}P-Markierung der Phosphoproteine an. Bei der SDS-PAGE können die markierten Phosphoproteine somit autoradiographisch detektiert werden [337]. Die Phosphopeptide, welche sich bei der enzymatischen Spaltung der Phosphoproteine bilden,

können anhand ihrer Radioaktivität in den entsprechenden LC-Fractionen [304-306,312,314,322] oder 2-D-Phosphopeptid-Maps (TLC) [299,300,307,273,330,338-340] detektiert werden.

2.5.3.1.2. Umsetzung mit alkalischer Phosphatase

Die Behandlung von Phosphopeptiden mit alkalischer Phosphatase in Kombination mit FAB-MS wurde schon sehr früh angewendet [341,342]. Für das Peptid-Mapping vor und nach Umsetzung mit alkalischer Phosphatase werden heutzutage ESI- [309] oder MALDI-MS eingesetzt. Die Phosphopeptide können anhand eines 80 Da Massenshifts (bzw. einem entsprechenden Vielfachen davon) ermittelt werden [256,343,344]. Amankwa *et al.* konnten diesen methodischen Ansatz automatisieren, indem sie einen Enzymreaktor zur enzymatischen Dephosphorylierung von Tyrosinphosphorylierungen mit CE- bzw. LC/ESI-MS koppelten [280]. Zhang *et al.* verwendeten für das Phosphopeptid-Mapping vor und nach Phosphatasebehandlung ein MALDI-MS. Die Position der Phosphorylierungsstelle wurde dann mit Hilfe eines LC/ESI-Ionenfallen-MS/MS-Experimentes ermittelt [145,310].

2.5.3.1.3. Chemische Dephosphorylierung

Jaffe *et al.* konnten Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen lokalisieren, indem sie die Phosphopeptide zuerst chemisch dephosphorylierten und dann mittels Tandem-MS/MS-Experimenten sequenzierten [345]. Die Phosphopeptide wurden unter alkalischen Bedingungen dephosphoryliert und mit Ethanthiol derivatisiert (siehe Kap. 2.5.2.2). Die resultierenden Modifikationen wurden bei der Interpretation der Tandem-Massenspektren berücksichtigt. Aufgrund der deutlich besseren Fragmentationbildung der modifizierten Peptide verbesserte sich die SEQUEST-Analyse ebenfalls [345].

2.5.3.1.4. Gasphasen-Dephosphorylierung von Phosphopeptiden, MS³-Experimente (MS/MS/MS)

Der Neutralverlust von H₃PO₄ stellt bei Serin- und Threonin-phosphorylierten Peptiden bei einem relativ niedrigen Kollisions-Anregungspotential einen sehr ausgeprägten Fragmentierungsprozess dar [346,347]. Durch β -Eliminierung des Phosphatrestes bildet sich aus dem Phosphoserinrest ein Dehydroalaninrest. Phosphothreonin wird zu Dehydroamino-2-buttersäure umgesetzt [345]. Wie DeGnore und Qin [348] zeigen konnten, lassen sich in einer Ionenfalle die $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentionen, welche beim CID von $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Molekülonen gebildet werden (-98/2 Th Abstand) ein weiteres Mal in der Falle kollisionsaktiviert fragmentieren (MS³, MS/MS/MS). Unter Berücksichtigung der dephosphorylierten Aminosäurereste (s.o.) kann die Position der Phosphorylierung somit indirekt anhand der im MS³-Spektrum auftretenden Fragmentionen ermittelt werden. Das dephosphorylierte Peptidfragment ist verglichen mit dem Phosphopeptid erheblich basischer. Das Neutralverlust-Fragmention ionisiert deshalb im positiven Ionenmodus besser als das phosphorylierte Peptid und bildet zudem beim CID deutlich mehr Fragmentionen. Bei tyrosinphosphorylierten Peptiden kann nach DeGnore und Qin ebenfalls ein Neutralverlust erfolgen, wobei es sich aber nicht um eine β -Eliminierung, sondern um einen schrittweisen Verlust von HPO₃ und H₂O handelt [348]. Dieses Verfahren konnte von Ogueta *et al.* zur Analyse von ³²P-markierten und SDS-PAGE getrennten Phosphoproteinen angewendet werden [349].

2.5.3.2. Spezifische Anreicherung von Phosphopeptiden mit Hilfe der IMAC

Andersson und Porath konnten als erste die Bindung von freiem Phosphat an immobilisierte Fe(III)-Ionen beobachten [350]. Bei diesen Experimenten wurden die Metallionen durch den metallbindenden Liganden Iminodiacetat (IDA), welcher kovalent an Agaroseharz gebunden wurde, immobilisiert. Kurze Zeit später wurde herausgefunden, dass phosphorylierte Aminosäuren und Proteine ebenfalls selektiv an Iminodiacetat-Agarose-Gel gebundene Eisen(III)-Ionen binden und bei Erhöhung des pH-Wertes wieder eluiert werden können [350,351]. Die immobilisierten Eisen(III)-Ionen wechselwirken dabei mit den Phosphatgruppen der Phosphoproteine [350,351]. Mit Hilfe der IMAC-Technik (immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie, IMAC) können Phosphopeptide somit hoch spezifisch aus tryptischen Proteinverdau aufgereinigt werden. Neben den Phosphopeptiden binden in der Regel auch saure [352] und lysinhaltige [353] Peptide an das immobilisierte Fe^{3+} . Untersuchungen von Neville und Mitarbeitern ergaben, dass die Phosphopeptide noch selektiver an Nitrilotriacetat (NTA) immobilisierte Fe^{3+} -Ionen binden [336]. Die NTA-modifizierten Harze sind zum einen stabiler und weisen zudem eine höhere Affinität für Metallionen mit Koordinationzahl 6 (wie Fe^{3+}) auf. Carboxyl- und Phenolgruppen spielen für die Metallionenwechselwirkung eine wichtige Rolle. Entsprechend dem angenommenen Bindungsmodell bildet sich bei Phosphatbindung ein 4-Zentren-Chelatring (Abb. 2.15). Die Phosphat-Eisen(III)-Wechselwirkung ist, verglichen mit der Carboxylgruppen-Eisen(III)-Wechselwirkung (6-Zentren-Chelatring), erheblich stärker.

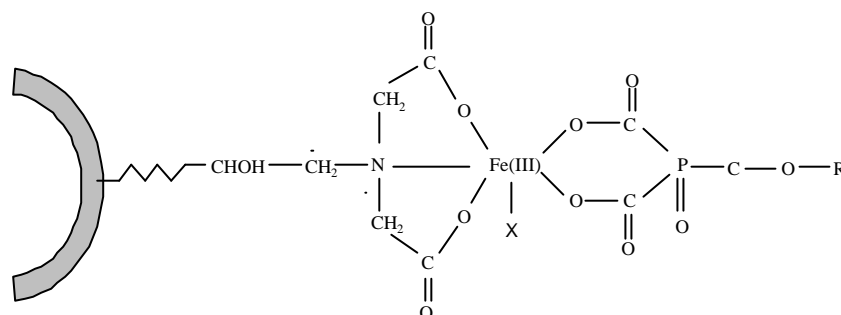


Abb. 2.15. Modell für die Wechselwirkung von Phosphatgruppen mit den immobilisierten Eisen(III)ionen. Wasser, OH usw. (X) können ebenfalls bei der Bindung der Makromoleküle beteiligt sein. R stellt die entsprechenden organischen Reste dar [352].

Bei biochemischen Untersuchungen kann die IMAC *on-line* als auch im *off-line* eingesetzt werden. *Off-line* werden μLC -Säulen [322,340,354,355] oder Mikro-Tips [315,317,333,336,356,357] eingesetzt. Bei den *on-line*-Methoden koppelt man die IMAC-Säule entweder direkt an das ESI-MS [358] oder es erfolgt eine IMAC-LC/ESI-MS-[273,300,338,339] bzw. eine IMAC-CE/ESI-MS-Kopplung [359].

2.5.3.3. Massenspektrometrische Scantechniken

2.5.3.3.1. Die Phosphatgruppen-spezifische Fragmentierung

Bei der Kollisionsaktivierung (API- und q2-CID) phosphorylierter Peptidionen kommt es zur Spaltung der C-O-P-Phosphoesterbindungen. Wird die C-O-Bindung gespalten und ein

Wasserstoff auf die Phosphatgruppe übertragen, resultiert insgesamt ein Verlust von H_3PO_4 (98 Da). Infolge der O-P-Bindungsspaltung wird dieser zu einem geringeren Ausmaß von einem HPO_3 -Verlust (80 Da) begleitet. Beide Neutralverlustreaktionen können sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus beobachtet werden. Aufgrund der C-O- bzw. P-O-Bindungsspaltung kann bei höheren Kollisions-Anregungspotentialen im negativen Ionenmodus zudem die Bildung der phosphorylierungsspezifischen $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ - und $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmenten (m/z 97 bzw. m/z 79) beobachtet werden [320,321,346].

Postulierter Mechanismus für den CID-abhängigen H_3PO_4 -Neutralverlust von Phosphopeptidionen [346]

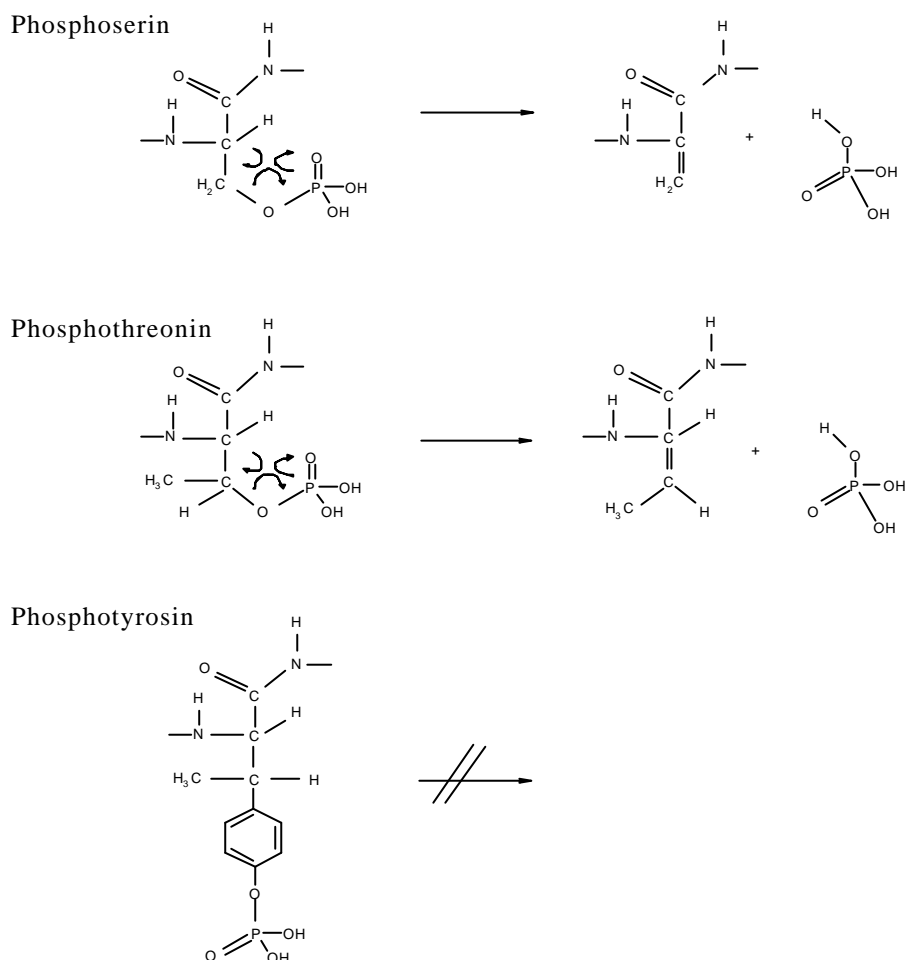


Abb. 2.16. Schematische Darstellung der 6-Zentren-Übergangszustände beim CID-abhängigen H_3PO_4 -Neutralverlust aus serin- und threoninhaltigen Phosphopeptidionen. Bei tyrosinhaltigen Phosphopeptiden verhindert der aromatische Ring die Ausbildung des energetisch bevorzugten 6-fach-cyclischen Übergangszustandes.

Basierend auf Kollisions-Offset-Diagrammen nimmt man an, dass der Verlust von Phosphorsäure über einen 6-Zentren-Übergangszustand durch cyclische Umlagerung der drei Elektronenpaare erfolgt. Das Wasserstoffatom, welches am α -C-Atom der Phosphoaminogruppe lokalisiert ist, wird dabei auf die vollständig protonierte Phosphatgruppe übertragen (Abb. 2.16). Alle Strukturen mit aliphatischen Phosphoestergruppen können den 6-Zentren-Übergangszustand ausbilden. Beim

Phosphotyrosin verhindert der aromatische Ring die Ausbildung des Übergangszustandes (Abb. 2.16). Dennoch kann auch bei Tyrosin-phosphorylierten Peptiden ein H_3PO_4 -artiger Neutralverlust beobachtet werden. Hierbei handelt es sich aber nicht um eine einstufige β -Eliminierung, sondern einen aufeinanderfolgenden Verlust von HPO_3 und H_2O aus unterschiedlichen Positionen innerhalb des Moleküliions. Da dieser Fragmentierungstyp bei mehrfach positiv geladenen Phosphopeptid-Vorläuferionen die höchste Effizienz aufweist, erfolgt die H_3PO_4 -Neutralverlustanalyse bevorzugt im positiven Ionenmodus. Im negativen Ionen-Modus (Vorläuferionen-Analyse und API-CID) nutzt man die $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Markerionen (m/z 79 bzw. m/z 97) zur Detektion der Phosphopeptide. Der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationbildung liegt keine Vorläufer-Produktionen-Beziehung zugrunde. Im Vergleich zum Neutralverlust werden diese Ionen erst bei deutlich höheren Kollisions-*Offset*-Werten gebildet. Man nimmt deshalb an, dass die Fragmentionen durch direkte Spaltung der entsprechenden Bindungen gebildet werden [346].

2.5.3.3.2. Skimmer-CID

Mit Hilfe eines LC/ESI-API-CID-MS-Experimentes können die phosphorylierten Peptide einer komplex zusammengesetzten Peptidmischung ohne radioaktive $^{32/33}\text{P}$ -Markierung detektiert werden [360-363]. Unterzieht man Phosphopeptidionen im Skimmerbereich des Massenspektrometers einer negativ-Ionen-Kollisionsaktivierung (hohes Offset-Potential, API-CID, Kap. 2.2.6), so bilden sich die phosphorylierungsspezifischen $[\text{PO}_2]^-$, $[\text{PO}_3]^-$, und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen (m/z 63, m/z 79 bzw. m/z 97). Beim API-CID legt man deshalb während eines negativ-Ionen-LC/ESI-MS-Experimentes ein permanent hohes API-*Offset*-Potential an und scannt dabei auf die m/z 63-, m/z 79- bzw. m/z 97-Markerionen. Analysiert man auf diese Weise eine verdautes Phosphoprotein, so können die phosphorylierten Peptide anhand der Signale in den ermittelten Markerionenspuren detektiert werden. Sowohl Potential als auch Polarität können im Skimmerbereich sehr rasch geändert werden und ermöglichen damit die Anwendung sogenannter Hybrid-Scantechniken (Kap. 2.2.7). Beim Hybrid-Scan können während eines einzigen Scans sowohl die erzeugten spezifischen Fragmentionen als auch die nicht-fragmentierten Moleküliionen aufgezeichnet werden [363,364]. Selbst bei Verwendung TFA-haltiger mobiler RP-HPLC-Phasen konnte eine empfindliche Detektion der Phosphopeptide beobachtet werden [362]. Carr *et al.* konnten die Empfindlichkeit dieser Methode verbessern, indem sie das LC-Eluat aufteilten. Ein Teil des Eluats wurde unter API-CID-Bedingungen ins MS versprüht und die m/z 79-Markerionenspur im SIM-Modus (*Selected Ion Monitoring*) aufgezeichnet. Der zweite Teil des Eluats wurde gleichzeitig fraktioniert. Die Fraktionen, welche in der m/z 79-Markerionenspur ein Signal erzeugten, wurden anschließend mit Hilfe der NanoES-MS untersucht. Die Phosphopeptide wurden dabei mit Hilfe der m/z 79-Vorläuferionen-Analyse detektiert und mittels Tandem-MS/MS sequenziert [365,366]. Das beim LC/ESI-API-CID aufgezeichnete m/z 79-Markerionenprofil entspricht somit einem Cerenkov-Chromatogramm, jedoch ohne radioaktive $^{32/33}\text{P}$ -Markierung. Durch die Fraktionierung kann die Peptidmischung stark aufgetrennt werden. Durch die verringerte Komplexität der Proben können Unterdrückungseffekte während der NanoES-MS-Analyse erheblich reduziert werden. Im Vergleich zu einer normalen ESI-MS-Peptidmassenbestimmung kann beim API-CID eine deutlich höhere Empfindlichkeit beobachtet werden. Phosphopeptide können deshalb zwar sehr oft detektiert, aber nicht deren Peptidmassen ermittelt werden [144,367]. Insbesondere mit Hilfe der μ - und Nano-LC/ESI-MS kann das API-CID-Verfahren heutzutage auch zum *in vivo*-Phosphopeptid-*Screening* biologischer Proben eingesetzt werden [315,329,331]

2.5.3.3.3. Neutralverlust-Analyse

Mit Hilfe eines vollständig computerkontrollierten Tandem-MS/MS-Systems (B^2E mit positiv- und negativ-EI) konnten Herrmann und Schlunegger [368] als erste die Neutralverlust-Scantechnik (Δm 43 Th, Verlust von Acetyl; Δm 28 Th, Verlust von CO) zur Analyse kleiner Peptide und Peptidmischungen anwenden. Mit Hilfe der spezifisch erzeugten Neutralverlustteilchen und Vorläuferionen konnten sie aus den ermittelten Neutralverlust- und Vorläuferionen-Spektren indirekt die Massen modifizierter Peptide bestimmen. Die Detektion der phosphorylierten Peptide eines Proteinverdaus mittels Neutralverlust-Analyse (ESI-Triple-Quad-Gerät) konnte erstmals von Hunter und Games demonstriert werden [363]. Bei ihrer Kollisionsaktivierung im positiven Ionenmodus erleiden Phosphopeptide einen Neutralverlust von 98 Da bzw. 80 Da (H_3PO_4 bzw. HPO_3) [169]. In einer komplexen Peptidmischung können die phosphorylierten Peptide somit anhand der $[M-H_3PO_4+zH]^{z+}$ -Neutralverlust-Fragmentionen (98/z Th Abstand zum nicht-fragmentierten $[M+zH]^{z+}$ -Phosphopeptid-Molekülion) detektiert werden. Für die Neutralverlust-Analyse ist die *off-line*-NanoES besonders gut geeignet. Durch den geringen Probenverbrauch steht eine lange Messzeit zur Verfügung. Aufgrund der Akkumulierung vieler Scans (ca. 20-200) kann bei einem Experiment die Detektionsempfindlichkeit infolge des erhöhten S/N deshalb erheblich gesteigert werden [312,317,333,347]. Zudem können auch nicht-aufgetrennte Verdaumischungen untersucht werden. Bei Serin- und Threonin-phosphorylierten Peptiden stellt der H_3PO_4 -Neutralverlust den ausgeprägtesten Fragmentierungsprozess dar [346,347]. Tyrosin-phosphorylierte Peptide zeigen ebenfalls einen Neutralverlust von 98 Da. Hierbei handelt es sich aber nicht um eine β -Eliminierung sondern vermutlich um einen aufeinanderfolgenden Verlust von HPO_3 (80 Da) und H_2O (18 Da) [169,225,348]. Aufgrund der Bildung metastabiler Produktionen während der MALD-Ionisierung, kann bei der MALDI-MS der Neutralverlust der Phosphatgruppe ebenfalls zum Phosphopeptid-Screening eingesetzt werden. In der Gasphase verlieren Phosphoserine und Phosphothreonine teilweise ihre Phosphatreste (β -Eliminierung). Phosphopeptide können somit anhand der $[M-H_3PO_4+H]^+$ -Neutralverlust-Fragmentionen, in einem Abstand von 98 Da (H_3PO_4) zum phosphorylierten $[M+H]^+$ -Molekülion detektiert werden [335,369].

2.5.3.3.4. Vorläuferionen-Analyse

Entsprechend dem API-CID (Kap. 2.5.3.3.2) werden bei der Vorläuferionen-Analyse (Kap. 2.2.5.4) mittels Kollisionsaktivierung im negativen Ionenmodus $[PO_3]^-$ -Fragmentionen (m/z 79) erzeugt, mit denen die Phosphopeptide detektiert werden können. Die Kollisionsaktivierung erfolgt hierbei in der Kollisionszelle (q_2 -CID). Wilm und Mann kombinierten die von ihnen entwickelte NanoES-Ionisierung [103,104] mit der Vorläuferionen-Scantechnik (m/z 79, $[PO_3]^-$) und konnten damit die phosphorylierten Peptide in nicht aufgetrennten Verdaumischungen detektieren [332,334,235,370]. Durch die Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung konnte diese Methode schließlich zur Analyse femtomolare Mengen PAGE-getrennter Modell-Phosphoproteine angewendet werden [367,370]. Nachteile sind, dass die Signale schwach konzentrierter Phosphopeptidionen durch hoch konzentrierte Peptidionen unterdrückt werden und dass die Proben vor ihrer NanoES-Analyse entsalzt werden müssen. Triple-Quadrupol-Geräte sind wegen ihrer linearen Anordnung besonders gut für die Vorläuferionen-Scantechnik geeignet und wurden deshalb im Laufe der letzten Jahre sehr oft zur Vorläuferionen-basierenden Detektion von Phosphopeptiden eingesetzt [312,314,317,332-334,366,371,372].

2.6. Die Signaltransduktion des Insulinrezeptors

2.6.1. Glucose, Insulin und Diabetes

Die Glucose steht im Mittelpunkt des Kohlenhydratstoffwechsels. Über die Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate werden im Verdauungsextrakt zu Glucose abgebaut. Der Organismus verfügt sowohl über die Nahrung zugeführte Glucose als auch über in der Leber bzw. im Muskel gespeicherte Glucose. Die bei der Verdauung oder aus den Glucosespeichern freigesetzte Glucose gelangt über das Blut in unterschiedliche Gewebe. Die Nahrungsaufnahme führt somit zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels. Dieser ist wiederum das Signal für die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse, Insulin auszuschütten. Bei Insulin handelt es sich um ein Hormon mit Blutzucker-senkender Wirkung. Zum einen verhindert es, dass die Leber zusätzlich gespeicherte Glucose freisetzt, zum anderen bewirkt es die verstärkte Glucose-Verwertung durch erhöhte Glykolyse, Glykogen- und Fettsäurebildung in Leber, Fett- und Muskelgewebe. Muskel- und Leberzellen speichern die Glucose in Form von Glykogen, einem Polysaccharid, das bei Bedarf schnell wieder zu Glucose zerlegt werden kann. In Fettzellen wird die Glucose in Form von Lipiden gespeichert. Bei Absinken des Blutzuckerspiegels stellen die β -Zellen des Pankreas die Insulinausschüttung wieder ein. Der Organismus kehrt in den Grundzustand des Stoffwechsels zurück. Die Regulation des Blutzuckerspiegels hängt somit stark von der im Blut vorhandenen Insulinmenge ab. Hohe Insulinkonzentrationen verursachen eine Hypoglykämie, d.h. einen zu niedrigen Blutzuckerspiegel. Ist zu wenig Insulin im Blut vorhanden oder sprechen die Muskel- und Fettzellen nicht auf das Insulin an, so stellt sich eine Hyperglykämie ein. Verglichen mit dem Grundzustand erhöht sich die Blutzuckerkonzentration. Das entstehende osmotische Ungleichgewicht führt dazu, dass vermehrt Wasser aus den Geweben ins Blut übertritt und über die Nieren mit übermäßig viel Salz ausgeschieden wird. Die Hyperglykämie (ein hohes Maß zirkulierender Glucose) ist sowohl für den Diabetes Typ 2 (insulinunabhängiger Diabetes) als auch für Diabetes Typ 1 (insulinabhängiger Diabetes) charakteristisch. Langzeitfolgen des Diabetes mellitus sind erhöhte Anfälligkeit gegenüber Hautinfekten, Nerven- und Blutgefäßerkrankungen mit erhöhter Neigung zu Herzinfarkt und Schlaganfällen, erhöhte Gefahr von Erblindung, Nierenversagen und Amputationen. Eines der ersten Anzeichen für Altersdiabetes ist die Insulinresistenz, d.h. Leber, Muskel- und Fettgewebe können nicht mehr in angepasster Weise auf den erhöhten Insulinspiegel im Blut reagieren. Im Frühstadium der Erkrankung versucht die Bauchspeicheldrüse diese Störung durch eine verstärkte Insulinsekretion zu kompensieren. Nach kohlenhydratreichen Mahlzeiten haben Prädiabetiker somit einen vorübergehend erhöhten Blutzuckerspiegel sowie eine konstant übermäßige hohe Blut-Insulinkonzentration. Mit Fortschreiten der Erkrankung verliert die Bauchspeicheldrüse oftmals die Fähigkeit das Insulin in der Menge zu produzieren, welche zur Kompensation der Fehlfunktion der betroffenen Gewebe notwendig wäre. Damit bleibt der Blutzuckerspiegel dann auch zwischen den Mahlzeiten erhöht und muss durch künstlich zugeführtes Insulin oder andere Medikamente gesenkt werden. Ob es sich beim Altersdiabetes um eine Fehlregulation im Muskelgewebe handelt, ist bislang jedoch unklar. Die Aufklärung der komplexen Insulin-Signaltransduktionskette zwischen der Aktivierung des Insulinrezeptors und der Translokation der Glucose-Transporter trägt somit zum besseren Verständnis der Stoffwechselstörungen bei.

2.6.2. Rezeptor-Tyrosinkinasen

Tyrosinspezifische Kinasen sind weitverbreitete Werkzeuge der intrazellulären Signalleitung. Viele Tyrosinkinase-Signalmechanismen werden durch die Aktivierung von Tyrosinkinasen

mit Hormonen, Wachstumsfaktoren oder Zytokinen ausgelöst. Rezeptor-Tyrosinkinasen sind integrale Membranmoleküle, welche auf der extrazellulären Seite eine Ligandenbindungsdomäne, auf der cytosolischen Seite eine Tyrosinkinase-Domäne besitzen. Die Ligandenbindung des Rezeptors aktiviert zunächst dessen Tyrosinkinase-Aktivität. Infolgedessen wird der Rezeptor selbst (Autophosphorylierung) oder dessen Substratproteine tyrosinphosphoryliert, was wiederum eine Kette weiterer nachgeschalteter Reaktionen (*downstream*, stromabwärts) innerhalb der Zelle auslöst. Durch die extrazelluläre Ligandenbindung wird somit die cytosolisch lokalisierte Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors stimuliert. Die Liganden-vermittelte Änderung des Oligomerezustandes des Rezeptors ist dabei ein generelles Prinzip aller Tyrosinkinase-Signalleitungsmechanismen. Da die Liganden zwei Bindungsstellen für Rezeptormoleküle besitzen, führt die Ligandenbindung zur Dimerisierung des Rezeptors. Ohne Ligand liegt der Rezeptor in monomerer Form vor. Durch die extrazelluläre Ligandenbindung verändert sich die gegenseitige Anordnung der beiden Tyrosinkinase-Domänen und ermöglicht dadurch die gegenseitige Tyrosinphosphorylierung (gewöhnlich in *trans*-Stellung) [373]. Die Autophosphorylierung hat zwei Aufgaben. Zum einen die Aktivierung der eigenen Tyrosinkinase-Aktivität durch Aufhebung der Autoinhibition, zum anderen die Schaffung von Bindungsstellen für nachgeschaltete Effektorproteine, indem sie Phosphotyrosinreste an die SH2- oder PTB-Domänen von Effektorproteinen des Signalübertragungsweges binden. Die Spezifität des Signals hängt hauptsächlich von der Sequenzumgebung des Phosphotyrosinrestes innerhalb der katalytischen Domäne ab [374]. Zusätzlich wird die Spezifität von der Nachbaresequenz der unterschiedlichen Autophosphorylierungsstellen gesteuert. Jeder Phosphotyrosinrest kann somit als Bindungsstelle für ein spezifisches Effektorprotein dienen [11]. Durch die spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem aktivierten Rezeptor und den nachgeschalteten Effektorproteinen werden diese entweder durch die Bildung eines Signalkomplexes oder durch die Tyrosinphosphorylierung der Effektorproteine aktiviert. Beim Insulinrezeptor (IR) führt die Autophosphorylierung zur Aktivierung der Tyrosin-Kinaseaktivität. Als Folge davon wird hauptsächlich ein Effektorprotein, das Insulinrezeptorsubstrat (IRS), an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert. Die Phosphotyrosinreste dienen als Bindungsstellen für die SH2-Domänen weiterer zugeordneter Proteine. Unter anderem wird die PI 3-Kinase durch die Bindung ihrer SH2-Domänen (in der regulatorischen p85 α -Untereinheit) an die phosphorylierten Tyrosinreste des IRS-1 aktiviert [375]. Andere SH2-Proteine, z.B. SHP2 [376] GRB-2 [377] und nck [378], assoziieren ebenfalls mit IRS-1 und vermitteln dadurch die pleiotrope Insulinantwort.

2.6.3. *Der Insulinrezeptor*

Der Insulinrezeptor kommt in nahezu allen Geweben der Vertebraten vor. Beim Menschen befindet sich das Rezeptorgen auf dem kurzen Arm von Chromosom 19. Es ist über 150 Kilobasen groß und enthält 22 Exons, welche eine 4,2kb große cDNA kodieren [379]. Der Insulinrezeptor besitzt eine $\alpha_2\beta_2$ -Struktur. Zwei α -Untereinheiten sind jeweils über Disulfidbrücken mit den beiden β -Untereinheiten verbunden. Beide Untereinheiten entstehen infolge proteolytischer Spaltung eines einzelnen Prorezeptors. Der reife heterotetramere Rezeptor enthält komplexe N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten mit terminalen Sialinsäureresten. In der SDS-PAGE migriert der Rezeptor bei einem Molekulargewicht von 300-400 kDa. Die α -Untereinheiten sind vollständig extrazellulär lokalisiert und enthalten die Insulin-Bindungsstellen. Die β -Untereinheit trägt einen Transmembranabschnitt und insulinregulierte Tyrosin-Kinasedomäne auf der cytosolischen Seite. Die Insulinrezeptor-Familie enthält noch zwei weitere strukturverwandte Moleküle, den IGF-1-Rezeptor und den insulinrezeptorverwandten Rezeptor (IRR) [380].

2.6.3.1. Die Insulinbindung

Die α -Untereinheit übt vor der Insulinbindung offensichtlich einen negativen Effekt auf die Tyrosinkinase-Aktivität aus [381-383]. Die Dimerisierung benachbarter Rezeptoruntereinheiten bewirkt die Aktivierung der assoziierten Tyrosinkinase [373,384]. Benachbarte Insulinrezeptormoleküle sind schon während der Biosynthese und Prozessierung kovalent verbunden. Erst durch die Bindung von Insulin an die extrazelluläre α -Untereinheit, erfolgt die *trans*-Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste innerhalb der cytoplasmatischen Domäne und die Initialisierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade [385-389]. Die Insulinbindung ändert wahrscheinlich die Quartärstruktur des Rezeptors, insbesondere die gegenseitige Anordnung der cytosolischen β -Untereinheiten. Jede α -Untereinheit enthält zwei in gesonderten Bereichen liegende Insulinbindungsdomänen, *site-1* α und *site-2* α [20,390]. *Site-1* α bindet die Reste A1-A5, A16, A19 und eventuell A21 der Insulin-A-Kette, die *site-2* α bindet B12, B15, B16, B23, B24, B25 und möglicherweise B26 der Insulin B-Kette [391-393]. Über eine weitere Stelle, welche die Leucine A13 und B17 enthält, wurde ebenfalls berichtet [390]. Es lässt sich somit zusammenfassen, dass sowohl für das Insulin als auch für den Insulinrezeptor je zwei unabhängige Bindungsstellen vorhanden sind, welche die Verknüpfung zwischen den kovalent gebundenen α -Untereinheiten vermitteln [394].

2.6.3.2. Die Transmembranregion

Die extrazellulär gelegene ligandenbindende Domäne des Insulinrezeptors ist mit der Tyrosinkinase über ein einzelnes transmembranes Segment verbunden, welches eine große Toleranz für Aminosäuresubstitutionen aufweist [395,396]. Man nimmt an, dass diese Region die insulininduzierten konformativen Änderungen stabilisiert [397].

2.6.3.3. Die Tyrosinkinasedomäne

Die gesamte Architektur der Tyrosinkinasedomäne enthält einen kleineren N-terminalen Lappen, dessen vorherrschende strukturelle Charakteristik ein fünfsträngiges β -Faltblatt ist und einen größeren C-terminalen Lappen, welcher hauptsächlich aus einer α -Helix besteht. ATP bindet an dem Spalt zwischen den beiden Lappen. Die tyrosinhaltigen Proteinsubstrate binden, an den C-terminalen Lappen. In der Aktivierungsschleife der Domäne liegen drei Autophosphorylierungsstellen (Y1146/1150/1151). Im C-terminalen Lappen befindet sich ein essentieller Argininrest, welcher vermutlich als katalytische Base beim Phosphattransfer wirkt. Bei der Regulation der Tyrosinkinase-Aktivität ist eine regulatorische Schleife, welche den Tyrosinrest 1150 enthält, von besonderer Bedeutung. Bei der Insulinbindung an den Rezeptor wird dieser Rest autophosphoryliert und aktiviert dadurch wiederum den Rezeptor. Im inaktiven Zustand wird eine Konformation der Schleife bevorzugt, in der Y1150 in die aktive Stelle eingelagert ist und sowohl die Substrat- als auch die ATP-Bindungsstelle blockiert [398]. Infolge der Ligandenbindung kommt es zu einer konformativen Änderung innerhalb der Aktivierungsschleife. Das inhibitorische Y1162 wird im Zuge der Aktivierung aus dem aktiven Zentrum entfernt, die ATP-Bindungsstelle wird somit zugänglich. Die aktiven Stellen der beiden Untereinheiten des Dimeren gelangen nun in gegenseitige Reichweite und ermöglichen somit die *trans*-Phosphorylierung [399]. Die Phosphorylierung bewirkt nun wiederum eine drastische Veränderung der Schleifenkonformation, sodass sowohl ATP als auch die Proteinsubstrate ungehindert an die Bindungsstellen gelangen können [400]. Die Aktivierung der Tyrosinkinase bewirkt insbesondere die

Autophosphorylierung von Y960 innerhalb der Juxtamembranregion und Y1146/1150/1151 innerhalb der regulatorischen Schleife, sowie Y1316 und Y1322 im C-terminalen Bereich der intrazellulären β -Untereinheit [385,401-403]. Die Aktivität der Rezeptor-Tyrosinkinase ist von entscheidender Bedeutung für die Insulinwirkung. Die ATP-Bindung kann durch Punktmutation der ATP-Bindungsstelle verhindert werden. In kultivierten Zellen führt dies zur Aufhebung der Insulinsignalwirkung [404,405]. Natürlich vorkommende Mutationen des Insulinrezeptors, welche die Kinaseaktivität hemmen, stehen in Zusammenhang mit einer ausgeprägten Insulinresistenz [406,407]. Die Autophosphorylierung der drei Tyrosinreste 1146/1150/1151 innerhalb der regulatorischen Schleife bewirkt eine 10-20fache Aktivierung der Tyrosinkinase [408]. Die Mutation von einem oder mehreren dieser Tyrosinreste bewirkt eine fortschreitende Verringerung der insulinstimulierten Tyrosinkinase-Aktivität mit einem einhergehenden Verlust der biologischen Aktivität [409,410]. Bei einigen in Kultur gehaltenen Zelllinien führt die Insulinstimulierung lediglich zu einem *bi*-phosphorylierten Zustand. Dies könnte unter Umständen das Ausmaß der Insulinsignalwirkung im Abwärtsstrom einschränken.

2.6.3.4. Die Juxtamembranregion

Aufgrund der Vermittlung der Substratauswahl, vermutlich durch Besetzung der Phosphotyrosin-Bindungs-Domänen (PTB) der IRS-Proteine und des Shc, hat die intrazelluläre Juxtamembranregion der Insulinrezeptor- β -Untereinheit eine wichtige Rolle bei der Signalübermittlung. Im Bereich der Juxtamembranregion befindet sich neben einigen Serinphosphorylierungsstellen auch ein NPXY960-Motiv [401]. Bei dem Austausch von Tyr960 durch andere Aminosäuren wird trotz der normalen Aktivität der Tyrosinkinase die Rezeptorsignalübermittlung *'in vivo'* vermindert [411,412]. Die Insulinreaktion kann jedoch durch Überexpression von IRS-1 und dem mutierten Rezeptor aufrecht erhalten werden. Man nimmt deshalb an, dass das NPXY960-Motiv bei der Sensitivierung der Rezeptor/Substrat Kupplung zwar nicht notwendig, wenngleich sehr nützlich ist [413]. Aus dem Vergleich der NPXY-Motive der Insulin-, IGF-1- und Interleukin-4-Rezeptoren (sie phosphorylieren alle IRS-1), ergibt sich ein längeres Sequenzmotiv (LxxxxNPXYxSxSD), welches vermutlich die bevorzugte Erkennungsstelle für IRS-Proteine darstellt [414]. Die tyrosinphosphorylierten Motive binden vermutlich an die PTB-Domänen, welche im N-terminalen Bereich der IRS-Proteine und des Shc liegen [415,416].

2.6.3.5. Das COOH-terminale Ende

Alle Proteintyrosinkinasen enthalten einen C-terminalen Rest, welcher sich an das Ende des homologen Tyrosinkinasebereichs anschließt. Der Insulinrezeptor enthält C-terminal neben den beiden Autophosphorylierungsstellen Y1316/1322 auch Threonin- und Serinphosphorylierungsstellen. Die Entfernung der letzten 43 C-terminalen Aminosäurereste ($IR_{\Delta 43}$) hat weder Einfluss auf die insulinstimulierte Autophosphorylierung der anderen Bereiche noch auf die insulinstimulierte Rezeptorkinaseaktivität und die biologische Aktivität [417-419]. Die Deletion der letzten 82 Aminosäurereste ($IR_{\Delta 82}$) führt zwar zu einer deutlich verringerten insulinstimulierten Autophosphorylierung; die Substratphosphorylierung und die stromabwärts liegenden biologischen Effekte werden jedoch nur wenig beeinflusst [420]. Somit scheint der C-terminale Bereich eher für die Regulation des Insulinsignals und nicht für die Anbindung der SH2-Proteine an den Insulinrezeptor wichtig zu sein.

2.6.3.6. Substrathypothese für die Insulin-Signaltransduktion

Zahlreiche unterschiedliche metabolische Reaktionen werden durch Insulin stimuliert oder inhibiert (Abb. 2.17). Eine erniedrigte Insulinresistenz, welche letztlich zu Diabetes Typ 2 führt, beeinträchtigt nicht nur den Glucosemetabolismus, sie verringert auch die generellen Zellfunktionen. Zellen, welche empfindlich auf die chronischen Effekte der Hyperglykämie reagieren, sind davon besonders stark betroffen. Dementsprechend war die Entdeckung der Insulinrezeptorsubstrate von großer Bedeutung [425,426]. Das erste entdeckte Insulinrezeptorsubstrat (IRS-1) wurde zwar als Substrat des Insulinrezeptors entdeckt, es wird jedoch auch von vielen anderen aktivierten Rezeptorsystemen unterschiedlicher Zytokine (Wachstumshormone, Interleukine und Interferone) phosphoryliert. Damit stellt es eine allgemeine Schnittstelle für die verschiedenen Signaltransduktionsnetzwerke dar [427-430].

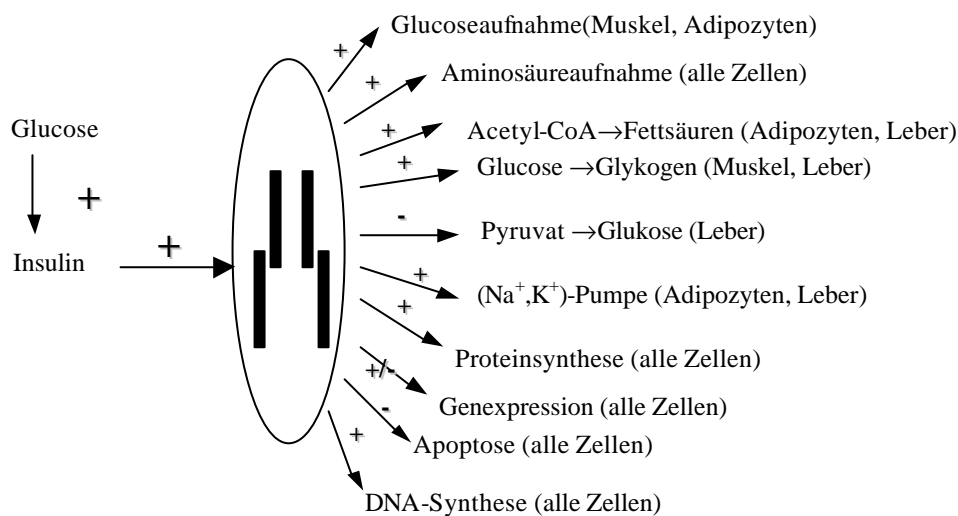


Abb. 2.17. Schematische Darstellung der bekannten biologischen Effekte, welche durch Insulin vermittelt werden. + stimuliert durch Insulin; - inhibiert durch Insulin; +/- durch Insulin reguliert.

2.6.4. Unmittelbare Substrate des Insulinrezeptors

Neben den Insulinrezeptorsubstraten IRS-1, -2, -3, -4, phosphoryliert der Insulinrezeptor auch Shc, Gab-1, Cbl, APS, sowie Mitglieder der SHP-Familie an spezifischen Tyrosinresten [421]. Zu den Substraten des Insulinrezeptors zählen auch einige Phosphatasen. Die intrazelluläre tyrosinspezifische Proteinphosphatase SHP2 (auch Syp oder SH-PTP2) [422] kann über ihre beiden SH2-Domänen mit dem Insulinrezeptor assoziieren und wird von diesem phosphoryliert [423]. Die Tyr-Phosphorylierung reguliert dabei die katalytische Aktivität der SHP2 [422]. Der Insulinrezeptor wird jedoch nicht von der SHP2 dephosphoryliert [423]. SHP1 und SHP2 können ebenso wie PTP1B an den aktivierten Insulinrezeptor binden und von diesem phosphoryliert werden [422,424,425].

2.6.5. Die Familie der IRS-Proteine

IRS-1 wurde durch Immunpräzipitation mit immobilisierten Antiphosphotyrosin-Antikörpern (α PY) aus insulinstimulierten Ratten-Leberzellen und 3T3-L1 Zellen isoliert [431-433]. Aufgrund seiner Migration in der SDS-PAGE wurde es ursprünglich als pp185 bezeichnet [431]. Das IRS-1-Gen ist auf dem humanen Chromosom 2q36-37 lokalisiert und lässt auf ein Molekulargewicht von 131 kDa schließen [434,435]. Aufgrund des hohen

Phosphorylierungsgrades migriert das IRS-1 Protein während der SDS-PAGE jedoch erheblich langsamer. Bei der SDS-PAGE wurde neben dem IRS-1 ein comigrierendes Substrat, das IRS-2 (ursprüngliche Bezeichnung 4PS von IL4r Phosphoproteinsubstrat), gefunden [436]. Die Identität zwischen IRS-1 und IRS-2 beträgt 43 %. Zwei ausgedehnte 100-150 Aminosäuren umspannende Bereiche im N-terminalen Bereich, die IH-1- (IRS-Homolog-1) und IH-2-Domänen weisen aber eine höhere Übereinstimmung von 65 bzw. 75 % auf. In ihrem C-terminalen Bereich enthalten die IRS-Proteine eine größere Anzahl von Tyrosinphosphorylierungs-Motiven. Alleine IRS-1 enthält 21 potentielle, auf allgemeinen Tyrosinkinasespezifitäten beruhenden, Tyrosinphosphorylierungsstellen [374,426]. Die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 wurde während Insulinstimulation ebenfalls schon von Okada *et al.* untersucht [437]. Die Insulinrezeptor-Tyrosinkinase phosphoryliert 8 Tyrosinreste innerhalb des IRS-1: Dazu gehören Y608/628/939/987, welche alle innerhalb eines YMXM-Motivs liegen. Die Methioninreste an den Y⁺¹- und Y⁺³-Positionen fördern dabei die Insulinrezeptor-abhängige Phosphorylierung [438]. Daneben werden aber auch noch folgende Motive phosphoryliert: Y460ICM, Y895VNI, Y1172IDL und Y1222ASI [437]. Zudem können noch 30 weitere in der Nähe von Asparagin- oder Glutaminresten liegende Tyrosine durch den Insulinrezeptor phosphoryliert werden. Das IRS-1 dient aber auch anderen Tyrosinkinasen unterschiedlicher Selektivität als Substrat (Kap. 2.6.7). Weitere Mitglieder aus der Familie der IRS-Proteine sind IRS-3 [439,440], IRS-4 [439], Gab1 [441], Shc (src-Homologes und Collagen) [442] und p62^{dok} [443]. Die Gesamtarchitektur aller IRS-Proteine ist nahezu identisch. Sie enthalten eine NH₂-terminale Pleckstrin-Homologe (PH) und/oder Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne (PTB), mehrere Tyrosinreste, welche Bindungsstellen für SH2-Proteine bilden, prolinreiche Regionen für die Wechselwirkung mit SH3 oder WW-Domänen und serin/threoninreiche Regionen [20]. Gab1, zunächst als Grb-2 bindendes Protein erkannt, teilt viele Merkmale der IRS-Proteine. Es wird von aktivierten Insulin- und EGF-Rezeptoren phosphoryliert [441]. Das Molekül enthält eine N-terminale PH-Domäne, keine benachbarte PTB-Domäne, zwei SH3-bindende prolinreiche Regionen und mehrere Tyrosinphosphorylierungsstellen innerhalb SH2-bindender Motive. Gab1 bindet Grb-2, p85, PLC- γ und SHP2. Es wirkt während der EGF- und/oder Insulinsignalisierung als multifunktionelles Dockingprotein. Shc ist ebenfalls ein tyrosinphosphoryliertes Substrat des Insulinrezeptors. Phosphoryliertes Shc bindet an die SH2-Domäne von Grb-2. Diese Kupplung aktiviert infolge der Grb-2/Sos-Wechselwirkung den MAP-Kinase Reaktionsweg [377,444].

2.6.5.1. Die Funktion der IRS-Proteine

Die IRS-Proteine haben für die Rezeptorsignalwirkung einige wichtige Aufgaben. Zunächst verstärken sie das Rezeptorsignal, indem sie die stöchiometrische Anbindung der SH2-Proteine an die Autophosphorylierungsstellen der Rezeptoren erleichtern. Des weiteren leiten sie die Signale des aktivierten Rezeptors intrazellulär weiter. Die Möglichkeit eines einzelnen Rezeptors, mehrfach IRS-Proteine an unterschiedlichen Positionen zu phosphorylieren, dient der Initiierung verschiedenster Signalwege.

2.6.6. Die Wechselwirkung zwischen dem Insulinrezeptor und den IRS-Proteinen

Die Wechselwirkung des Insulinrezeptors mit einer begrenzten Anzahl zellulärer Proteine, darunter IRS-1, IRS-2 und Shc, lässt vermuten, dass ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt. Es konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Teil des IRS-1 die Wechselwirkung mit Y960 des Insulinrezeptors vermittelt [416,7445-449]. Die Substitution von Y960 im Insulinrezeptor (NPXY960-Motiv) vermindert erheblich die insulinstimulierte

Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 [426,441]. In seinem N-terminalen Bereich enthält IRS-1 eine 109 Aminosäuren große PH-Domäne (Pleckstrin-Homolog) und getrennt, durch einen 46 Aminosäuren umfassenden Bereich, eine 160 Aminosäuren große PTB-Domäne [415]. Die Peptidbindungsstelle der PTB-Domäne befindet sich in Form einer großen kationischen Tasche (an der Basis der PH-Domäne) vollständig an der Oberfläche des Moleküls. Wahrscheinlich binden hier die Kopfgruppen der Phosphatidyl-Inosit-Phosphate (PIP) [449,450]. Bindungsversuche zeigten, dass die PIPs an die PH-Domäne, nicht aber an die PTB-Domäne binden [448,451]. Durch die Bindung der Liganden an die PH-Domäne wird die Wirkung der PTB-Domäne nicht verändert, ebenso umgekehrt. Bei den Phosphorylierungen agieren die beiden Bindungsdomänen zwischen den Einheiten wahrscheinlich kooperativ. Die PTB-Domänen binden ebenso wie die SH2-Domänen phosphorylierte Tyrosine. Die PH-Domäne bindet die Phosphatidyl-Inosit-Phosphate (PIP). Unter nicht stimulierten Bedingungen könnte die PH-Domäne bevorzugt mit $PI(4,5)P_2$, dem PI mit der höchsten Konzentration innerhalb der Membran, interagieren. Durch Insulinstimulation nimmt die lokale Konzentration von $PI(3,4,5)P_3$ und $PI(3,4)P_2$ zu. Damit stehen zusätzliche Stellen für die Wechselwirkung mit IRS-1 zur Verfügung. Die subzelluläre Verteilung des IRS-1 verändert sich durch die Umlagerung vom 3-dimensionalen cytosolischen Bereich zur 2-dimensionalen Plasmamembran. Durch die Bindung der PH-Domänen erhöht sich die Konzentration von IRS-1 innerhalb des *IR-Compartments* und ermöglicht somit eine produktive Bindung zwischen dem IR und der PTB-Domäne (Abb. 2.18). Durch die Fixierung des Substrats an der katalytischen Kinasedomäne des Rezeptors kann die Phosphorylierung zahlreicher Tyrosinreste innerhalb der IRS-1 Aktivierungsdomäne (etwa 1000 Reste und mehr als 15 potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen) erfolgen.

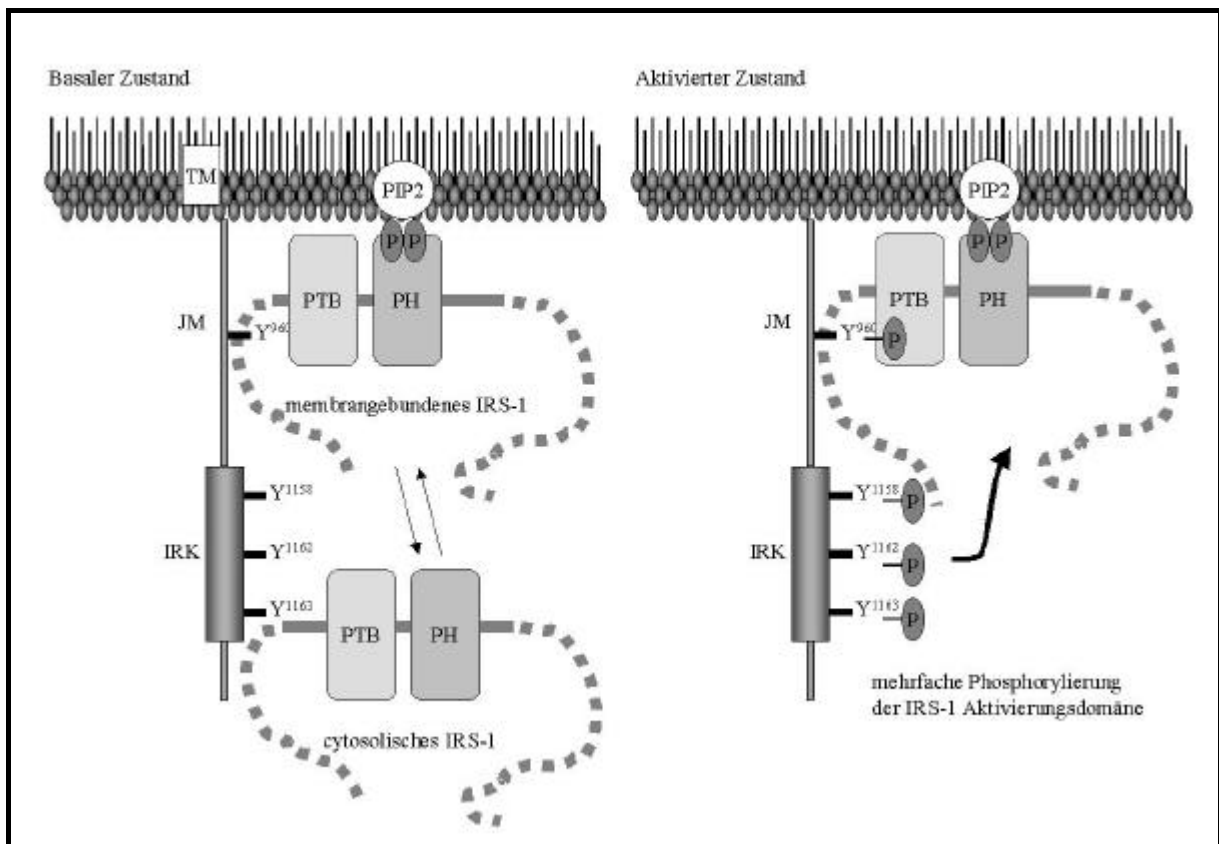


Abb. 2.18. (vorherige Seite) Modell für die Insulin-Signalwirkung entlang der IR/IRS-Achse. (A) Unter basalen Bedingungen (bei Fehlen von Insulin) liegt der Insulinrezeptor (IR) nicht phosphoryliert vor (TM: Transmembrandomäne; JM: Juxtamembrandomäne; IRK: IR-Kinase). IRS-1 assoziiert reversibel mit dem PI(4,5)P₂ in der Plasmamembran. (B) Insulin stimuliert die IR-Aktivierung, es erfolgt die Phosphorylierung dreier Tyrosinreste innerhalb der Aktivierungsschleife der IRK-Domäne und eines Tyrosinrestes in einem NPXY-Motiv innerhalb der JM. Membrangebundenes IRS-1 assoziiert mit der JM des IR. Durch die vorübergehende Fixierung der beiden Proteine kann eine Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste innerhalb der IRS-Aktivierungs-Domäne erfolgen.

2.6.7. IRS-1-Rezeptoren

Aufgrund seiner starken Übereinstimmung mit dem Insulinrezeptor zieht auch der IGF-1-Rezeptor IRS-1 und IRS-2 als Substrate heran. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IRS-Proteine die Wachstumseffekte unterschiedlicher Rezeptorsysteme vermitteln können. Die Phosphorylierung der IRS-Proteine durch GH (*growth hormone*) könnte somit für die IGF-1-artigen Effekte verantwortlich sein [452]. Zytokinrezeptoren der IL6-Familie und der IL2-Familie (IL2, IL4, IL7, IL9, IL13 und IL15) steuern ebenfalls die IRS-Phosphorylierung [428,453]. Nicht alle Rezeptorsysteme, die IRS-Proteine phosphorylieren, fördern das Wachstum oder das Überleben der Zellen. Zum Beispiel vermittelt die IFN α/β - und IFN γ -stimulierte Tyrosinphosphorylierung von IRS-Proteinen anti-mitogene/anti-virale Reaktionen [429,430]. Angiotensin-II vermittelt ebenfalls die Phosphorylierung der IRS-Proteine. In Bezug auf die Insulin-Signalwirkung scheint die Phosphorylierung hier aber einen unterdrückenden Effekt zu haben [453,454].

2.6.8. Signalmoleküle im Abwärtsstrom der IRS-Proteine

Im Verlauf der Signaltransduktionskaskade kommt es zur direkten Bindung der IRS-Proteine mit zahlreichen Enzymen und Adapterproteinen. Für eine größere Anzahl dieser Wechselwirkungen sind Tyrosinphosphorylierungen erforderlich, u.a. PI-3-Kinase, SHP2, Fyn, Grb-2, nck und crk (Abb.1.3.) [376-378,455-457]. Die Proteine SV40large T Antigen, 14-3-3 und das Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden IRS-1 über einen noch unzureichend untersuchten Mechanismus (Abb. 1.19) [454,459].

2.6.8.1. Die Rolle der SH2-Proteine in der Insulin-Signalkette

Der Insulinrezeptor bindet im Gegensatz zu vielen anderen Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptoren nur sehr schlecht an SH2-Proteine [460]. IRS-1 und andere Moleküle (z.B. Shc und pp115) wirken aber als Schnittstelle zwischen dem Rezeptor und den unterschiedlichen SH2-Proteinen. So können z. B. Enzyme (u.a. PI3-Kinase und SHP2), welche über ihre SH2-Domänen an IRS-1 binden, aktiviert werden. Das IRS-1 kann zur Erzeugung eines gemeinsamen Signals dazu dienen, heterogene Signalmoleküle in eng benachbarte Positionen zu dirigieren. Außerdem ist der IRS/SH2-Proteinkomplex frei beweglich und kann sich dadurch unabhängig vom Rezeptor fortbewegen.

2.6.8.2. Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3-Kinase), PKB/AKT und PKC-z

Das zuerst entdeckte SH-2 Protein, welches mit IRS-1 assoziiert und von diesem aktiviert wird, ist die PI-3-Kinase (PI3-K) [426]. Die PI3-K spielt in vielen insulinregulierten metabolischen Abläufen eine wichtige Rolle (Glukoseaufnahme, allgemeine und

wachstumsspezifische Proteinsynthese, Glykogensynthese). Basierend auf Untersuchungen mit unterschiedlichen Inhibitoren nimmt man an, dass es mehrere Enzyme gibt, welche das durch die Aktivierung der PI-3-Kinase ausgelöste Signal zu seinem letztlichen Bestimmungsort weiterleiten. Vermutlich liegen zahlreiche Proteine, u.a. p70^{6k}, PKB/AKT und PKC- ζ im Abwärtsstrom der PI-3-Kinase [461-463]. Diese drei Serin/Threonin-Proteinkinasen sind wesentlich an der Regulation der Genexpression und des Zellwachstums beteiligt. Speziell PKB und PKC- ζ sind an der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran beteiligt (Abb. 1.19) [461-463]. Die PI-3-Kinase ist ein heterodimeres Enzym, das zwei katalytische Untereinheiten mit Phospholipid- und Serinkinase-Aktivität enthält [464]. Neben der 110 kDa großen katalytischen Untereinheit (p110 α oder p110 β) enthält die PI3-K eine von fünf bekannten Untereinheiten (p85**a**, p85**b**, p55^{PIK}, p55**a**, oder p50**a**), die alle jeweils zwei regulatorisch wirkende SH2-Domänen tragen. Aufgrund der Wechselwirkung der beiden SH2-Domänen mit den phosphorylierten Tyrosinresten innerhalb der YMXM-Motive des IRS-1 wird bei Insulinstimulation die katalytische Untereinheit aktiviert [465-467]. Die PI3-Kinase phosphoryliert bevorzugt Phosphatidyl-Inosit-4-Phosphat (PI(4)*P*) und Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)*P*₂) an der D-3 Position des Inositolrings. Infolge Insulinstimulation werden somit PI(3,4)*P*₂ und PI(3,4,5)*P*₃ gebildet. Im Bereich der Plasmamembran bilden diese Phospholipide Adaptorstellen für die PH-Domänen der Proteinkinase B (AKT/PKB) sowie den phospholipidabhängigen Kinasen PDK1 und PDK2 [468].

PKB/AKT

Die PKB wird bei ihrer Anlagerung an die Plasmamembran infolge der Phosphorylierung durch PDK1 und PDK2 (Ser473 und Thr308) aktiviert [469-471]. Durch die glucosestimulierte Insulinausschüttung wird GLUT-4 vom Cytosol in die Plasmamembran verlagert und führt somit zu einem erhöhten Glukosetransport im Skelettmuskel und in den Adipozyten [472]. Der Effekt der GLUT-4-Translokation erreicht schon wenige Minuten nach Insulinstimulation einen Maximalwert. Etliche Resultate deuten darauf hin, dass die Aktivierung der PI-3-Kinase während der Zusammenlagerung mit den IRS-Proteinen eines der entscheidenden Signale zur GLUT-4-Translokation beisteuert [375,426, 473-476]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression aktiver PKB ebenfalls die GLUT-4-Translokation stimuliert. Man nimmt deshalb an, dass ein Serinphosphorylierungsschritt involviert ist [477]. Die zellulären Substrate der PKB scheinen deshalb geeignete Kandidaten für die Ausdehnung des Insulinsignalweges bis hin zur GLUT-4-Translokation zu sein. Die genaue Rolle der IRS-Proteine bleibt aber unklar.

PKC-z

Die insulinstimulierte Aktivierung der atypischen PKC-Isoform ζ (nicht durch Diacylglycerol oder Phorbolester aktivierbar) infolge PI-3-Kinase-abhängiger Zunahme von PI(3,4,5)*P*₃ ist ein Hinweis darauf, dass diese stromabwärts der PI-3-Kinase liegt [478-482]. PKC- ζ wird in fast allen Geweben exprimiert. Im aktivierten Zustand erfährt sie keine Translokation vom Cytosol zur Membran. Die Aktivierung der PKC- ζ erfordert die PDK-1-abhängige Phosphorylierung von Thr410 innerhalb der Aktivierungsschleife [483]. Entweder wird PDK-1 direkt durch PIP₃ aktiviert [469] oder PIP₃ erleichtert deren Wirkung auf die Substrate PKC- ζ bzw. PKB/Akt (s.o.) [484,485]. Die insulinstimulierte Aktivierung der PKC- ζ konnte durch Inhibitoren der PI-3-Kinase blockiert werden [478,480]. Durch die Verwendung spezifischer PKC- ζ -Inhibitoren konnte die GLUT-4-Translokation in Adipozyten verringert werden. Aktivierte PKC- ζ bewirkte im Vergleich dazu eine Erhöhung der GLUT-4-Translokation. Dies deutet darauf hin, dass die PKC- ζ in einer insulinabhängigen Weise im Abwärtsstrom der PI-3-Kinase zur Aktivierung der GLUT-4-Translokation beiträgt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass PKC- ζ sowohl 'in vitro' als auch 'in vivo' von PDK1

phosphoryliert und aktiviert wird [486,487]. Erst kürzlich wurde über eine Wechselwirkung von IRS-1 mit PKC- ζ berichtet [488]. Dabei wurde festgestellt, dass die PKC- ζ unter *in vitro*-Bedingungen das IRS-1 erheblich serinphosphoryliert. Die Überexpression von PKC- ζ führte zur starken Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von cotransfiziertem IRS-1. Damit verbunden war eine ebenfalls deutlich erniedrigte PI3-Kinase-Aktivität. Zudem bewirkte die Überexpression der PKC- ζ eine insulinstimulierte Dissoziation des IRS-1 vom Insulinrezeptor sowie eine beschleunigte Tyrosindepshosphorylierung des IRS-1 [489].

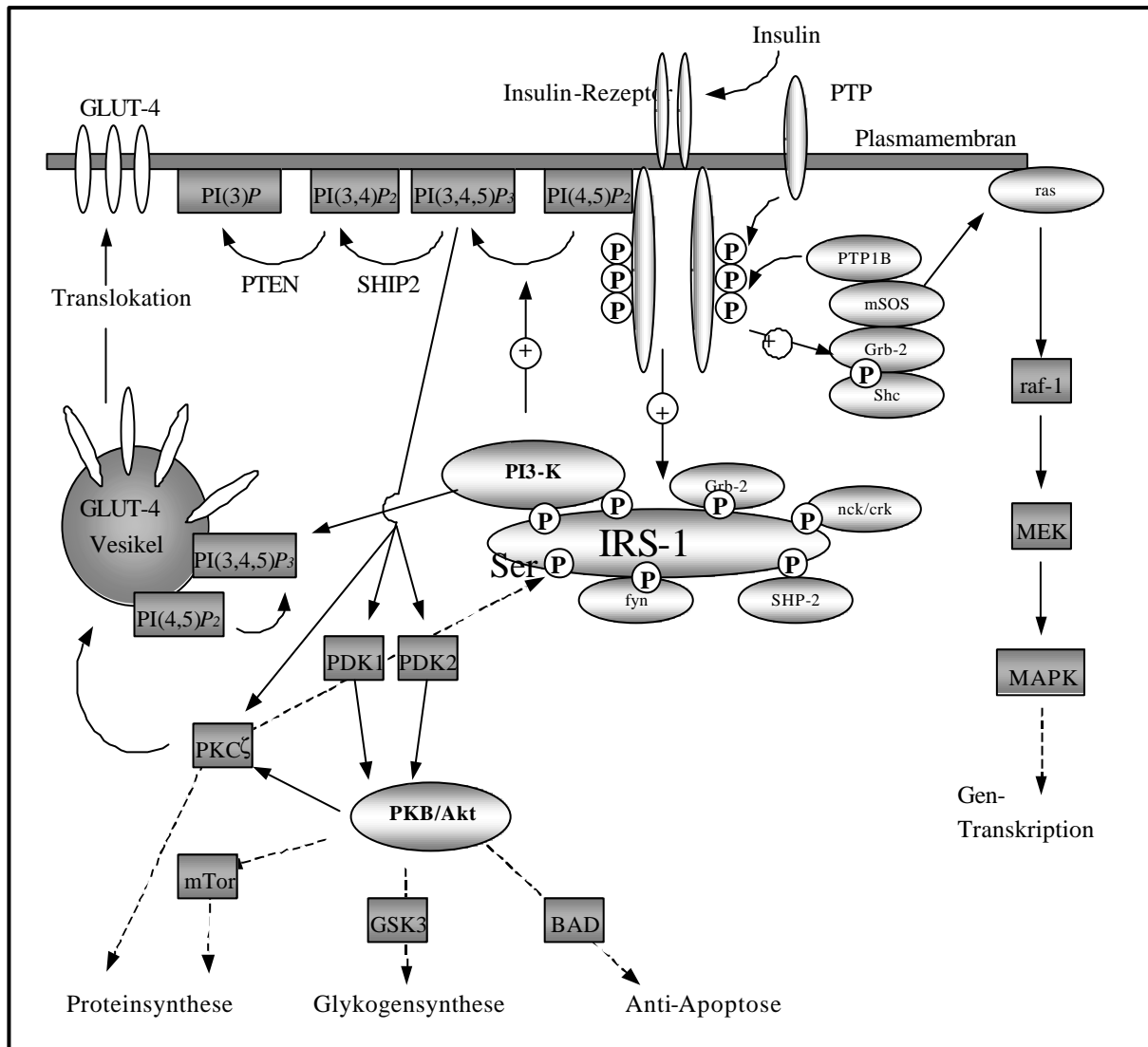


Abb. 2.19. Das Insulin-Signalsystem. Schematische Darstellung der molekularen Details der Insulin-Signaltransduktion. Die Insulin-Signalkaskade enthält Kaskaden direkter Protein-Protein-Wechselwirkungen, welche durch den Insulinrezeptor initiiert werden. Die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors führt zur Phosphorylierung von IRS-1, IRS-2 und Shc. Die Phosphotyrosinreste dieser Proteine wechselwirken über ihre SH2-Domänen mit den Adaptoruntereinheiten der Effektorproteine des Signalsystems. Darin enthalten sind Grb-2, fyn, SHP-2, nck/crk sowie die PI3-Kinase. Die IRS-1-, PI3-Kinase- und PKB-abhängigen Kaskaden sind hier nur äußerst vereinfacht dargestellt.

2.6.8.3. *Phosphotyrosin-Phosphatase SHP2*

Die SHP2 (SH2-haltige Phosphatase, auch Syp oder SH-PTP2) ist eine intrazelluläre, tyrosinspezifische Proteinphosphatase [422]. SHP2 trägt zwei SH2-Domänen und kann durch die Zusammenlagerung mit dem Insulinrezeptor durch dessen Tyrosinkinase phosphoryliert werden [423]. Die katalytische Aktivität der SHP2 wird dabei durch die Tyrosinphosphorylierung reguliert [422]. Bei der Bindung mit SHP2 wird der Insulinrezeptor jedoch nicht an seinen Tyrosinresten dephosphoryliert [423]. Im Gegensatz dazu bindet SHP2 nicht nur an IRS-1, sondern dephosphoryliert dieses auch [490]. Man nimmt an, dass die SHP2 eine positive regulatorische Rolle in der Insulin-Signalisierung einnimmt.

2.6.8.4. *Grb-2*

Grb-2 ist ein kleines cytoplasmatisches Protein, welches eine SH2- und zwei SH3-Domänen enthält. Es dient als Adaptormolekül, welches an die prolinreiche Region von mSos (ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor zur Stimulation des GDP/GTP-Austausches für p21^{ras} [377]) und Tyrosinphosphoproteine (z.B. den EGF-Rezeptor, IRS-1, IRS-2, SHP2 und Shc) bindet [455,491-494]. Aktiviertes p21^{ras} assoziiert und aktiviert die raf-1-Kinase. Diese phosphoryliert und aktiviert die MAP-Kinase-Kinase (MEK), welche nun wiederum die mitogenaktivierte Protein-Kinase (MAPK) phosphoryliert und aktiviert [495]. Man nimmt deshalb an, dass die Wechselwirkung von Grb-2/Sos mit tyrosinphosphorylierten Signalmolekülen sowohl p21^{ras} als auch die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert [496].

2.6.8.5. *Fyn und nck*

Fyn wechselwirkt über die Aminosäuren Y895 und Y1172 mit IRS-1. Die Funktion von Fyn innerhalb der Insulin-Signaltransduktion ist jedoch unklar. Bei nck handelt es sich um ein 47 kDa großes Adaptorprotein welches drei SH3-Domänen und eine SH2-Domäne enthält. Crk enthält zwei SH3-Domänen und eine SH2-Domäne. Diese Adaptorproteine binden über ihre SH3-Domänen an viele andere Signalmoleküle. Nck und crk wurden beide als Protoonkogene identifiziert. Man nimmt deshalb an, dass sie im Bereich des Zellwachstums eine regulatorische Rolle spielen.

2.6.9. *Die Rolle der Tyrosinphosphatasen in der Insulin-Signaltransduktion*

Die Kernelemente des Insulin-Signalsystems werden zum Großteil durch Serinkinase-katalysierte Phosphorylierungen und Tyrosinphosphatase-katalysierte Dephosphorylierungen reguliert. Unlängst durchgeführte Untersuchungen weisen deutlich darauf hin, dass die Tyrosinphosphatasen bei der *steady-state*-Regulation der reversiblen Tyrosinphosphorylierungsereignisse innerhalb des Insulin-Signalweges eine wichtige Rolle spielen [497]. Zu diesen Tyrosinphosphatasen zählen u.a. SHP1, SHP2, PTP α , PTP-1B, LAR und LRP [423,424,498-501]. Die SHP2 bindet ebenso wie SHP1 an den aktivierten Insulinrezeptor und wird von dessen Rezeptor-Tyrosinkinase phosphoryliert [422,424]. Die Rolle von SHP1 in der Insulin-Signaltransduktion ist jedoch noch unklar. Die Phosphotyrosinphosphatase LAR (*leucocyte common antigen-related*) ist eine Transmembranphosphatase, die hauptsächlich in der Leber exprimiert wird [498]. In '*in vitro*'-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese den Insulinrezeptor an Tyr1150 (eine der Hauptphosphorylierungsstellen infolge Insulinstimulation) dephosphorylieren kann [498]. PTP α ist ebenfalls eine Transmembran-Proteinphosphatase, die sehr effektiv den Insulinrezeptor dephosphorylieren kann [499].

2.6.10. Modulation der Insulin-Signaltransduktion durch Serin/Threoninkinasen

Obwohl die Insulin-Signaltransduktionskaskade mit der Tyrosinphosphorylierung beginnt, enthalten die Kaskaden im Abwärtsstrom hauptsächlich Serin- und Threoninkinasen. Es wird deshalb angenommen, dass eine oder mehrere dieser Kinasen für die anschließende Regulation und Terminierung des Insulinsignals verantwortlich sind und insbesondere die IR/IRS-Wechselwirkung in negativer Weise durch Serin/Threoninphosphorylierungen regulieren. Bei der Erniedrigung des Insulinrezeptorsignals könnte die Serin/Threoninphosphorylierung der Insulinrezeptor- β -Untereinheit einen wichtigen Mechanismus darstellen. Kasuga *et al.* konnten zeigen, dass der Insulinrezeptor 'in vivo' serinphosphoryliert wird [502]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Phorbolster (PKC-Stimulatoren) die Serin/Threoninphosphorylierung der Insulinrezeptor- β -Untereinheit stimulieren und dadurch die insulininduzierte Autophosphorylierung des Rezeptors unterdrücken [503]. Die Umsetzung des isolierten Insulinrezeptors als direktes Substrat der PKC führte zur Inhibierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität [503-506]. Bei den PKC-abhängigen Phosphorylierungsstellen handelt es sich um Ser955, Ser956 innerhalb der Juxtamembranregion [401,507], Ser1023 und Ser1025 in der Nähe der ATP-Bindungsstelle [401,507], Ser1315 und Ser1336 im C-terminalen Bereich des Rezeptors [508-512]. Die Stimulation der PKC-Isoformen -*a* und -*b* durch Phorbolster hat eine inhibierende Wirkung auf die Insulinrezeptorkinase [513]. IRS-1 und IRS-2 enthalten jeweils über 30 potentielle Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen, die innerhalb der Motive unterschiedlicher Kinasen wie Caseinkinase-2, MAP-Kinasen, PKCs und cdc2 [415,426] liegen. Bei Insulinstimulation werden die im basalen Zustand schon erheblich serin- und threoninphosphorylierten IRS-1- und IRS-2-Proteine noch zusätzlich serinphosphoryliert [473]. Die Serin- und Threoninphosphorylierung von IRS-1 könnte somit die IRS-abhängige Signalwirkung infolge der Unterdrückung der insulinstimulierten Tyrosinphosphorylierung herabregulieren [513-518]. Ein möglicher IRS-1-Serinphosphorylierungs-abhängiger Mechanismus zur negativen Regulation des Insulinsignals wurde erst kürzlich von Aguirre *et al.* vorgeschlagen [517]. Bei ihren Untersuchungen konnten Aguirre *et al.* zeigen, dass sich die Insulin-Signaltransduktion durch TNF α -induzierte (Tumor Nekrose Faktor, TNF) Serinphosphorylierung von IRS-1 verschlechtert wird. TNF α aktiviert die JNK (Jun NH₂-terminale Kinase), welche schließlich IRS-1 an Ser307 phosphoryliert. Infolgedessen wird wahrscheinlich die Wechselwirkung zwischen der PTB-Domäne des IRS-1 und dem Insulinrezeptor blockiert. Wie Kellerer *et al.* zeigten, führt auch die Phorbolster-abhängige Aktivierung von PKC- θ zur Inhibierung der Insulinsignalwirkung [519]. Hierbei nimmt man ebenfalls an, dass IRS-1 serinphosphoryliert wird und dadurch die IR/IRS-1-Wechselwirkung verschlechtert. Somit resultiert schließlich eine verminderte IR-Tyrosinkinase-abhängige Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 [519,520]. Neben dem Insulinrezeptor und IRS-1 konnten bislang auch MAPK, GSK3 und PI3-K als Substrate der PKC identifiziert werden [516,518,521-524]. Die Beteiligung der spezifischen PKC-Isoformen an der negativen Regulation der Insulinsignalwirkung könnte somit zur Beendigung des Insulinsignals führen.

2.6.11. Die PKC-Familie

Die Enzyme der Proteinkinase C-Familie (PKC) spielen in der Signaltransduktion vieler extrazellulärer Stimulantien (Hormone, Wachstumsfaktoren) eine bedeutende Rolle [525]. Bei den Säugetieren teilt man die 12 verschiedenen PKC-Subtypen entsprechend ihren enzymatischen Eigenschaften, welche von der Sequenz, der Stimulierbarkeit sowie der Regulation der PKCs bestimmt werden, wie folgt in kleinere Unterfamilien ein:

Klassische Proteinkinase C (cPKCs):

α , β I und β II (zwei alternative Splicevarianten), γ .

Diese Isoformen werden durch Phosphatidylserin (PS) in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise aktiviert. Ebenso binden sie Diacylglycerol (DAG), was sowohl die Spezifität des Enzyms für PS als auch die Affinität für Ca^{2+} innerhalb der physiologischen Grenzen verbessert [526]. Sie werden zudem durch den Tumorpromotor TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) aktiviert, welcher die zur Aktivierung des Enzyms erforderlichen DAG- und Ca^{2+} -Konzentrationen herabsetzt [527].

Neue Proteinkinase C (nPKCs):

ϵ , η , δ , θ , μ .

Diese Isoformen sind bezüglich Ca^{2+} nicht sensitiv, werden aber durch DAG oder Phorbol ester in Anwesenheit von PS aktiviert [528].

Atypische Proteinkinase C (aPKCs):

ζ , ι/λ .

Diese Isoformen sind wie die nPKCs weder sensitiv bezüglich Ca^{2+} noch erfordern sie DAG und/oder TPA.

Da sich die PKC-Subtypen in den unterschiedlichen Geweben in ihrer Expression und Art ihrer Aktivierung unterscheiden, nimmt man an, dass jedem Subtyp eine spezifische Aufgabe innerhalb der Signaltransduktionsprozesse zukommt [525,529]. Bislang konnten etliche Proteine gefunden werden, welche 'in vivo' und/oder 'in vitro' durch PKC phosphoryliert werden. Dazu gehören unter anderem Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Ionenkanäle, Ionenpumpen, Transkriptionsfaktoren und Translationsfaktoren [525,530]. Die PKCs phosphorylieren in der Regel Serin- oder Threoninreste, welche innerhalb basischer Sequenzen liegen. Die PKC zeigt im Vergleich zur PKA jedoch nur eine geringe Spezifität [531]. Für die Phosphorylierungsmotive der PKC konnte die Konsensussequenz RXXS/TXRX ermittelt werden, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht [530]. Jeder PKC-Subtyp zeigt jedoch eine unterschiedliche Substratspezifität.

Struktur, Aktivierung und Regulation der PKC

Die Mitglieder der PKC-Familie bestehen aus einer Polypeptidkette, welche eine N-terminale regulatorische Region (ca. 20-40 kDa) und eine C-terminale katalytische Region (ca. 45 kDa) enthält. Innerhalb dieser beiden Domänen befinden sich konservierte und variable Sequenzabschnitte.

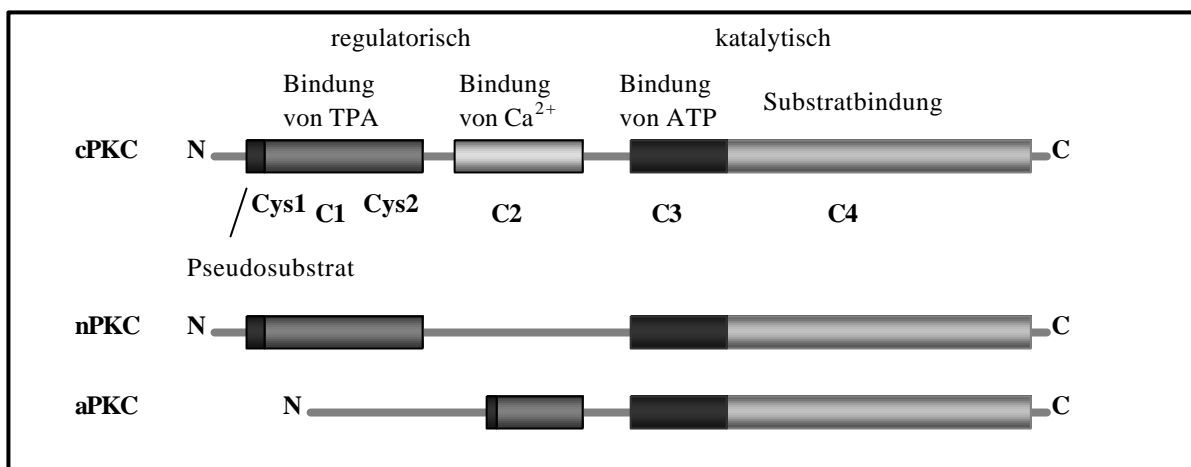


Abb. 2.19. Schematische Darstellung der Primärstruktur der klassischen, neuen und atypischen PKCs. Gekennzeichnet sind: Pseudosubstrat-Domäne, C1-Domäne mit ein oder zwei Cys-reichen Bindungsschleifen, C2-Domäne in der regulatorischen Hälfte, ATP-

katalytische Region. Den neuen PKCs fehlt die C2-Domäne und damit die Regulierbarkeit durch Ca^{2+} . Atypische PKCs haben nur ein Cys-reiches Motiv. Eine Phorbolsterbindung wurde bei diesen nicht gefunden.

Die C1-Domäne enthält ein cysteinreiches Zinkfinger-Motiv, welches in den meisten Subtypen doppelt vorhanden ist und die Diacylglycerol/Phorbolster-Bindungsstelle bildet [532]. In direkter Nachbarschaft zur C1-Domäne befindet sich eine autoinhibitorische Pseudosubstrat-Sequenz. Diese interagiert mit der katalytischen Domäne und ist vor der Kofaktor-Bindung für die intramolekulare Unterdrückung der katalytischen Aktivität verantwortlich. Die Sequenz des Pseudosubstrates gleicht sehr stark den Substratsequenzen der PKC-Phosphorylierungsstellen, besitzt jedoch keine phosphorylierbaren Serin- oder Threoninreste [533,534]. Die atypischen PKCs enthalten keine C1-Domänen. Sie zeigen somit keine Sensitivität gegenüber Phorbolstern, enthalten aber dennoch ein Zinkfinger-Motiv. Die C2-Domäne enthält die Erkennungsstelle für saure Lipide sowie in einigen Subtypen die Ca^{2+} -Bindungsstelle [535]. Die konservierten C3- und C4-Domänen bilden die ATP- und Substrat-Bindungsstellen [536]. Man nimmt an, dass die Bindung aktivierender Kofaktoren eine Konformation der PKC stabilisiert, bei welcher das katalytische Zentrum für die Substratproteine zugänglich wird. Die Aktivierung der PKCs wird von der Entfernung des Pseudosubstrats aus dem katalytischen Zentrum begleitet. Diacylglycerol und Phorbolster dienen als hydrophobe Anker. Sie rekrutieren die PKC an die Membran und fördern damit die Membranassoziation der PKC. Die Bindung von Diacylglycerol und/oder Phorbolster vergrößert die hydrophobe Oberfläche des Cys2-Elements innerhalb der C2-Domäne und begünstigt somit eine teilweise Einlagerung dieses Elements in die Membran. Phosphatidylserin wirkt als eine Art Membranfaktor. Kalziumionen erhöhen die Affinität der klassischen PKCs gegenüber negativ geladenen Lipiden und erhöhen dadurch die Membranaffinität der PKCs. Somit besteht offenbar ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der cytosolischen und membrangebundenen Form der PKC. Ein Hauptaspekte der Aktivierung der PKC stellt letztlich die Phosphorylierung dar. Der Phosphorylierungs-abhängige Reagulationsmechanismus der PKC-Aktivierung konnte am Beispiel der PKC- β II gezeigt werden [537]. Das frisch synthetisierte, inaktive PKC-Vorläuferprotein liegt unphosphoryliert, assoziiert mit einer Detergens-unlöslichen Zellfraktion, vor. Die Aktivierung erfolgt aufgrund einer trans-Phosphorylierung (PKC-Kinase) innerhalb der Aktivierungsschleife. PKC- β II wird wahrscheinlich von PDK-1 an Thr500 phosphoryliert, worauf sich eine Autophosphorylierung von Thr641 und Ser660 im C-terminalen Bereich der PKC anschließt. Die Autophosphorylierung stabilisiert wahrscheinlich die katalytisch aktive Konformation der Kinase. Über eine Translokation gelangt das wirksame Enzym schließlich vom Cytosol an die Membran, wo es dann durch das Pseudosubstrat reguliert wird.

3. Themenstellung

Bei der reversiblen Proteinphosphorylierung handelt es sich um einen wichtigen Mechanismus, mit welchem grundlegende zelluläre Ereignisse, darunter auch die Signaltransduktion reguliert werden. Eine gestörte Signaltransduktion führt bei einem Organismus in der Regel zu dessen Erkrankung. Im Laufe der letzten Jahre rückte deshalb im Bereich der biomedizinischen Forschung die Untersuchung der Signaltransduktionswege verstärkt in den Vordergrund. Im Falle des Typ 2 Diabetes (nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus) konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der beobachteten Effekte auf die Störung von Proteinphosphorylierungen innerhalb der Insulin-Signaltransduktionskette zurückzuführen sind. Die Identifizierung von Proteinphosphorylierungen ist jedoch auch heute noch eines der schwierigsten bioanalytischen Probleme. Die Einführung der modernen Proteom-Forschung führte zu einer enormen Weiterentwicklung der proteinbiochemischen Analyseverfahren. Mit Hilfe der Gelelektrophorese trennt man komplexe Proteinmischungen auf und spaltet die isolierten Proteine mit Hilfe spezifischer Proteasen im Gel. Die resultierenden Peptide analysiert man mittels LC/ESI-MS oder MALDI-MS und identifiziert bzw. charakterisiert basierend auf den MS-generierten Daten die Proteine mit Hilfe moderner Computeralgorithmen in Protein- und DNA-Datenbanken.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen die aktuellen Proteom-Methoden zur Analyse SDS-PAGE getrennter Proteine etabliert werden:

- Entwicklung und Optimierung einer tryptischen im Gel-Verdaumethode,
- Entwicklung von Mikro-Tips zur Aufreinigung von Proteinverdaus und Phosphopeptiden,
- Etablierung des ESI-MS- und NanoES-MS-basierenden Peptid-*Mappings* und der Fragmentationsanalyse zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen und Anwendung zur Analyse von 'in vivo' isolierten Proteinen (aus kultivierten Zellen) und
- Vergleich verschiedener MS-Datenauswertungsprogramme.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen RP-HPLC- und IMAC-gekoppelte ESI-MS- sowie *off-line*-NanoES-MS-Methoden zur Identifizierung von Proteinphosphorylierungen etabliert und entwickelt werden:

- Detaillierte Untersuchung und Optimierung der *off-line*-NanoES-MS Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken zur Analyse von Phosphopeptiden und deren Anwendung zur Analyse eines tryptischen β -Caseinverdaus,
- Entwicklung und Vergleich von *on-* und *off-line*- μ IMAC-ESI- bzw. NanoES-MS-Verfahren zur Detektion von Phosphopeptiden,
- Etablierung eines μ LC/ESI-API-CID-Hybrid-Scan-Verfahrens (TFA-saure Bedingungen, positiv/negativ-Ionisierung, *in source*-CID, m/z 79-Markerionen) zur Detektion von Phosphopeptiden und
- Entwicklung einer empfindlicheren und spezifischeren μ LC/ESI-API-CID-Hybrid-Scan-Methode unter alkalischen Bedingungen (ausschließlich negativer Ionenmodus, *in source*-CID, m/z 79- und 97-Markerionen) zur Detektion von Phosphopeptiden.

Im dritten Teil der Arbeit sollen die entwickelten Methoden zur Analyse von 'in vivo'- und 'in vitro'-phosphorylierten Proteinen aus dem Bereich der Insulin-Signaltransduktion angewendet werden:

- Radioaktiv-unterstütztes (^{32}P -Markierung) *off-line*- μ RP-HPLC/MALDI-MS-Phosphopeptid-*Mapping* der β -Untereinheit des humanen Insulinrezeptors ('in vivo'),
- negativ-Ionen-NanoES-MS-Vorläuferionen-Analyse (m/z 79) der β -Untereinheit des humanen Insulinrezeptors ('in vivo')

-
- ESI-MS-basierende Untersuchung der *'in vitro'*-Substratspezifität verschiedener PKC-Subtypen,
 - Entwicklung eines neuen 2-D-RP-HPLC-Verfahrens (1. Dimension TFA-sauer, 2. Dimension alkalisch) in Kombination mit einer neuen MikroESI-MS-Methode (mit *on-line*-Fraktionierung) zur Identifizierung der Phosphopeptide eines *'in vitro'* durch die PKC-Isoformen β I und ζ phosphorylierten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins und
 - positiv-Ionen-NanoES-MS³-Experimente zur Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen mit Hilfe eines Ionenfallen-MS-Gerätes.

In der vorliegenden Arbeit sollen chromatographische und massenspektrometrische Methoden optimiert und entwickelt werden, mit denen die Proteinphosphorylierungen im Bereich der Insulin-Signaltransduktion besser erkannt und untersucht werden können. Die Arbeit soll dazu beitragen, dass die Regulation der Insulin-Signaltransduktion und somit auch die Erkrankung an Typ 2 Diabetes besser untersucht und verstanden werden kann.

4. Experimenteller Teil

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid-Lösung, 25 %	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau (BPB)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure	Sigma, Deisenhofen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Eisen(III)chlorid	Sigma, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Gallium(III)chlorid	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Glycerin	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad, München
Nitrocellulose	Fluka, Buchs (Schweiz)
o-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt
10 % Trimethylsilylchlorid in trockenem Toluol	Serva, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt
4-Vinylpyridin	Sigma, Deisenhofen
Wasser (LiChrosolv ^R , spez. Widerstand: 18,2 M Ω ·cm ⁻¹)	Merck, Darmstadt

4.1.2. Enzyme, Proteine und Peptide

Endoproteinase Lys-C	Roche, Basel (Schweiz)
GST-IRS-1-Fusionsproteine	AG Haring, Tübingen
HSP 27-Fragment (81-94, CLNRQLpSSGVSEIR)	Bachem, Heidelberg
GST-IRS-1 ^{Nk} 'in vitro'-Kinase-Assay mit PKC ζ und β_1 rekombinante Kinasedomäne der β -Untereinheit (941-1343) des humanen Insulinrezeptors	K. Moeschel, Tübingen
MARCKS PSD-Derived Peptide, PKC Substrate	Calbiochem, Darmstadt

MARCKS Kinase-Assay
 phosphoryliertes β -Casein
 (Position 16-224 des *Precursors*, $M_w = 23.583,29$ Da,
 SwissProt: P02666; pSer30/32/33/34/50)
 pp60 c-src (521-533, TSTEPQpYQPGENL)
 synthetische Peptide zur MS-Kalibration
 TPCK-(L-1-Tosylamido-phenylethylchlormethylketon)
 -Trypsin
 unphosphoryliertes β -Casein
 (Position 16-224 des *Precursors*; $M_w = 23.263,69$ Da;
 SwissProt: P02666)
 β -Untereinheit des humanen Insulinrezeptors

K. Moeschel, Tübingen

Sigma, Deisenhofen
 Bachem, Heidelberg
 H. Echner, Tübingen

Worthington, Lakewood (USA)

Sigma, Deisenhofen
 AG Häring, Tübingen

4.1.3. Chromatographie

Cartridge filters for protein sequencer
 Eppendorf *Gelloader-Tips* 1-10 μ l
Fingertight und stainless steel fittings
Microthight tubing sleeves
Micro unions, adapter
Mini microfilter assembly
 μ MAC-Säule Poros MC20 95 mm x 250 μ m (I.D.)
 μ RPC C2/C18 SC 2.1/10
 PEEK-Tubing
 POROS 20 R2
 POROS Oligo R3
 POROS MC 20
Stainless steel unions
 RP-HPLC-Säule TSK Super ODS 125 x 0,3 (I.D.) mm
Uncoated fused-silica-Kapillaren (365 μ m A.D.):
 50, 75, 100 μ m I.D.

ABI, Foster City (USA)
 Eppendorf, Hamburg
 Upchurch, Oak Harbor (USA)
 Upchurch, Oak Harbor (USA)
 Upchurch, Oak Harbor (USA)
 Upchurch, Oak Harbor (USA)
 E. Rapp, Uni Magdeburg
 Pharmacia, Uppsala (Schweden)
 Grom, Herrenberg
 PerSeptive, Framingham (USA)
 PerSeptive, Framingham (USA)
 PerSeptive, Framingham (USA)
 Upchurch, Oak Harbor (USA)
 Grom, Herrenberg
 Grom, Herrenberg

4.1.4. Kapillarelektrophorese

Uncoated fused-silica-Kapillare:
 50 μ m I.D. (365 μ m A.D.)

Grom, Herrenberg

4.1.5. Verbrauchsmaterial

Nanospray Nadeln
Uncoated fused-silica-Kapillaren:
 365 μ m A.D.: 50, 75, 100 μ m I.D.
 190 μ m A.D.: 50, 75 μ m I.D.
 Pipettenspitzen
 Millipore Filter 0,22 und 0,45 μ m Porengröße

Protana, Odense (Dänemark)

Grom, Herrenberg
 Eppendorf, Hamburg
 Millipore, Bedford (USA)

4.2. Geräte

4.2.1. Triple-Quadrupol Massenspektrometer

Harvard Apparatus 22 Spritzenpumpe	Harvard (USA)
Flussplitter	VICI/Valco, Schenk (Schweiz)
<u>Triple-Quadrupol-Massenspektrometer:</u>	
TSQ700 mit ESI-I Quelle	Finnigan MAT, Palo Alto (USA)
Auswertesoftware:	
ICIS Bioworks Software Version 8.3.0.	Finnigan MAT, Palo Alto (USA)
DEC 3000 Workstation	Digital, Maynard (USA)
Digital UNIX (Version 4.0 E)	
<u>Autoinjektor:</u>	
A200S mit VICI-Injektionsventil	Carlo Erba (Schweiz)
	VICI/Valco, Schenk (Schweiz)
<u>μLC-Kopplung:</u>	
Fittings, Adapter und Verbindungen	Upchurch, Oak Harbor (USA)
PicoTip TM FS 360-75-30-N-5	New Objective (USA)
Titan Mikro-T-Union Z-VI-MU.5XCTI	VICI/Valco, Schenk (Schweiz)
<u>NanoES-Quelle:</u>	
Eigenbau Dr. M. Deeg, xyz-justierbar	
mit Videokamera und Monitor	Dr. M. Deeg, Tübingen
<u>Kunststoffhalterung für Mikro-ESI:</u>	A. Beck in Zusammenarbeit mit Lehrwerkstatt der Firma Fischer, Waldachtal, Tumlingen

4.2.2. MALDI-TOF Massenspektrometer

Kratos Kompact MALDI II	Shimadzu, Duisburg
Voyager	PerSeptive Biosystems, Wiesbaden

4.2.3. HPLC

Eldex Micro Pro1000	Eldex, Napa (USA)
Pumpe Pharmacia LKB 2150	Pharmacia LKB, Freiburg
Controller Pharmacia LKB 2156	Pharmacia LKB, Freiburg
Linear Detektor	Linear Instruments (USA)
UV-Detektor GAT PHD 601	GAT, Bremerhafen
LKB UV-Detektor mit	
Flusszelle 0,8 μ l Volumen, 2 mm Weglänge	Pharmacia LKB, Freiburg
UV-Bubble-Zelle	
(hergestellt aus f.s. 75 μ m I.D. Kapillare)	Grom, Herrenberg
Rheodyne 7125	Rheodyne, Rohnert Park (USA)
Hamilton-Injektionsspritzen	Hamilton, Reno (USA)
Integrator	Merck, Darmstadt
A/D Aufnahme-Interface mit Software	Bischoff, Leonberg
<u>Sykam HPLC-Anlage:</u>	
S 1100 Solvent Delivery System	Sykam, Gilching
S 2000 HPLC Controller	Sykam, Gilching
S 8110 Low Pressure Gradient Mixer	Sykam, Gilching

4.2.4. Kapillarelektrophorese

BioFocus CE3000	BioRad, München
-----------------	-----------------

4.2.5. *Sonstige Laborausstattung*

Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer RS2	IDL, Nidderau
4010 Multi-Tube Vortexer	Corning, Medfield (USA)
pH-Meter pH 535 Multi Cal	WTW, Weilheim
ausgestattet mit Elektrode	Mettler Toledo
Lichtmikroskop	Karl Zeiss, Jena
β-Counter LS 6500	Beckmann, München
<u>Zentrifugen:</u>	
Heraeus Sepatech Biofuge A	Heraeus, Hanau
Hettich Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen
<u>Waagen:</u>	
Sartorius MC 1	Sartorius, Göttingen
AB 104	Mettler-Toledo, Gießen
<u>Ultraschall-Bad:</u>	
Transsonic 460/H	Elma, Singen
<u>Elektrophorese-System:</u>	
Multiphor II	Pharmacia LKB, Freiburg
<u>Scanner:</u>	
Sharp JX-330	Sharp (Japan)
<u>Vakuum-Konzentrator:</u>	
Speed Vac	Savant, Farmingdale (USA)
<u>Heizrührer:</u>	
MR 2002	Heidolph, Schwabach

4.3. *Methoden*

4.3.1. *SDS-PAGE* [259]

4.3.1.1. *10 % Trenngel*

In einem Standzylinder wurde unter Rühren zu 3,75 ml einer 1,5 M Tris·HCl, 2 % SDS (pH 8,8) 5 ml Acrylamid-Lösung und 6,25 ml ddH₂O zugegeben. Nach guter Durchmischung wurden 30 µl einer wässrigen 10 %igen Ammoniumpersulfat-Lösung und 7,5 µl TEMED zupipettiert.

4.3.1.2. *6 % Sammelgel*

In einem Standzylinder wurden 1,875 g 100 % Glycerin eingewogen. Unter Rühren wurden 1,25 ml einer 1,5 M Tris·HCl, 2 % SDS (pH 6,8), 1 ml Acrylamid-Lösung und 1,25 ml ddH₂O zugegeben. Nach guter Durchmischung wurden 10 µl einer wässrigen 10 %igen Ammoniumpersulfat-Lösung und 2,5 µl TEMED zupipettiert.

4.3.1.3. *Denaturierungspuffer*

Vor Auftragen der Proteinproben wurden diese für 3 min im Dunkeln bei 95°C in Denaturierungspuffer inkubiert. Als Denaturierungspuffer wurde eine Mischung aus 1M Tris·HCl (pH 6,8), 50 % Glycerin, 10 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau und 50 % DTT verwendet.

4.3.1.4. Lösung zum Anfärben der Gele

Die getrennten Proteine wurden mit einer Mischung, bestehend aus 0,1 % coomassie BBR-250, 45 % Methanol, 45 % ddH₂O und 10 % Eisessig im Gel gefärbt.

4.3.1.5. Lösung zum Entfärben der Gele

Zum Entfärben der Gele wurde eine Mischung aus 45 % Methanol, 45 % ddH₂O und 10 % Eisessig verwendet.

4.3.2. Verdau

4.3.2.1. Aufbewahrung der Proteasen

Zur Langzeitlagerung wurden die Proteasen in lyophilisierter Form bei 4°C aufbewahrt. Für die tägliche Benutzung wurden die Proteasen in Verdau-puffer (1 µg·µl⁻¹) gelöst und aliquotiert bei -20°C eingefroren. Vor ihrem Gebrauch wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut. Auf diese Weise sind die Proteasen über ein Jahr haltbar [165].

4.3.2.2. Allgemeine Vorschrift zur tryptischen Spaltung von b-Casein in-Lösung

Für die massenspektrometrischen Experimente wurden tryptische β-Caseinverdaustammlösungen (100 pmol·µl⁻¹) hergestellt und entsprechend den Experimenten verdünnt eingesetzt. Das Enzym-zu-Substrat-Verhältnis der Stammlösung betrug 1:50 (w/w). Dazu wurden in einem Eppendorf-Gefäß 2,36 mg lyophilisiertes β-Casein in 953 µl Verdau-puffer (100 mM Tris·HCl (pH 8,2) oder 50 mM NH₄HCO₃ (pH 8,0)) gelöst und 47 µl eines frisch hergestellten 1 µg·µl⁻¹ TPCK-trypsinhaltigen Verdau-puffers zupipettiert. Die Mischung wurde anschließend 30 sec lang gevortext. Der Verdau erfolgte 8 Stunden lang bei 37°C und wurde durch Zugabe von 5 µl TFA (pro ml Verdau-lösung) abgebrochen. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

4.3.2.3. Verdau im Gel

Zur Ermittlung von Phosphorylierungsstellen wurde eine möglichst komplette Abdeckung der Proteinsequenz angestrebt. Vor dem Verdau wurden die Proteine deshalb im Gel reduziert und alkyliert. Aufgrund der in der Regel äußerst niedrigen Phosphorylierungsstöchiometrie sollten die zu analysierenden Proteinbanden eine deutliche Färbung mit CBB aufweisen. Für die Proteinidentifizierung gelgetrennter Proteine ist eine hohe Sequenzabdeckung nicht erforderlich. Reduktion und Alkylierung der Proteine sind deshalb beim Gel-Verdau nicht notwendig. Sowohl Silber- als auch nur schwach CBB-gefärbte Proteinbanden können auf diese Weise "in-Gel" verdaut werden. Sowohl bei Trypsin (25 ng·µl⁻¹) als auch bei Endoprotease Lys-C (10 ng·µl⁻¹) wurde der unten aufgeführte Verdau-puffer verwendet.

4.3.2.3.1. Allgemeine Vorschrift für den enzymatischen Verdau im Gel mit Reduktion und Alkylierung (4-Vinylpyridin) CBB-gefärbter Proteinbanden

Lösungen:

- 1) Wasser:Acetonitril 1:1 (v/v)
- 2) 100 mM Tris·HCl (pH 8,2)
- 2) 200 mM Tris·HCl, 2 mM EDTA (pH 8,4)

- 3) 200 mM Tris·HCl, 2 mM EDTA (pH 8,4), Acetonitril (1:1) (v/v)
- 4) 10 mM Dithiothreitol, 2 mM EDTA, 200 mM Tris·HCl (pH 8,4)
- 5) 2 % 4-Vinylpyridin in 200 mM Tris·HCl, 2 mM EDTA (pH 8,4) (v/v)
- 6) 25 ng· μl^{-1} Trypsin (TPCK-*treated* oder *sequencing grade*) in 100 mM Tris·HCl, 1 mM CaCl_2 , (pH 8,0), 10 % ACN (v/v)
- 7) 25 mM Tris·HCl-Lösung
- 8) wässrige 5 % Ameisensäure, 50 % Acetonitril (v/v)

Silylierung der Reaktionsgefäße

Zur Verhinderung irreversibler Wandadsorptionen wurden alle Eppendorf-Gefäße vor Gebrauch silyliert. Die *Cups* wurden dazu mit einer Lösung von 10 % Trimethylsilylchlorid in trockenem Toluol benetzt. Nach vollständigem Trocknen wurden sie mehrfach mit Methanol nachgespült.

Allgemeine Bemerkungen

Zur Verdaukontrolle und zur Ermittlung der Eigenverdaufragmente der Protease wurde eine Proteinbande des Molekulargewichtsmarkers und ein proteinfreies Gelstück ausgeschnitten und parallel mit den Proben verdaut. Das Lösungsmittelvolumen war immer doppelt so groß wie das Volumen der vollständig aufgequollenen Gelstücke. Die Flüssigkeitsvolumina wurden stets niedrig bemessen, insbesondere bei der Extraktion der Peptide aus den Gelstückchen. Bei der Extraktion der enzymatisch erzeugten Peptide aus dem Gel wurde darauf geachtet, dass bei der Entnahme der Eluate keine Gelstücke mit aufgenommen wurden.

A. Ausschneiden der Proteinbanden aus dem Polyacrylamid-Gel

Das gefärbte Gel wurde mit Wasser feucht gehalten und zum Schutz vor Keratinverunreinigungen unter eine durchsichtige Plexiglasscheibe gelegt. Mit einem sauberen, rostfreien Skalpell wurden die zu untersuchenden Proteinbanden ausgeschnitten. Zur Verringerung des chemischen Hintergrunds wurde so eng wie möglich ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden auf einem Glas-Objektträger in 1 mm³ große Würfel zerschnitten und in ein sauberes silyliertes Eppendorf-Gefäß (0,5 ml Volumen) gegeben.

B. Waschen der Gelstücke

Die Gelstücke wurden zunächst mit ddWasser versetzt und 15 min lang auf einem Schütteltisch bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, danach wurden die Gelstücke in gleicher Weise 2 x mit 50 % ACN in Wasser (v/v) gewaschen. Zum Schluss wurde die gesamte Flüssigkeit abgenommen und soviel ACN zugeben, dass die Gelstücke bedeckt waren (beim Schrumpfen sollten die Gelstücke ihren durchsichtigen Charakter verlieren und eine milchige, weiße Farbe annehmen). Die Spülschritte wurden solange wiederholt bis die Gelstücke kein CBB mehr enthielten. Nach dem Schrumpfen der Gelstücke wurden diese in 100 μl 200 mM Tris·HCl, 2 mM EDTA (pH 8,4) rehydratisiert. Nach 5 min wurde 100 μl ACN zupipettiert. Danach wurde die Lösung 15 min lang bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Lösungsmittel abgenommen und die Gelstücke im Vakuumkonzentrator getrocknet.

C. Reduktion und Alkylierung

Die trockenen Gelstücke wurden in 100 μl frisch angesetzter 10 mM Dithiothreitol, 2 mM EDTA, 200 mM Tris·HCl (pH 8,4) rehydratisiert, dann bei 56°C 60 min lang unter N₂-Schutzgasatmosphäre inkubiert (PCR-Cycler). Nach dem Abkühlen der *Cups* wurde der Überstand abgenommen und 100 μl ebenfalls frisch angesetzte 2 %ige 4-Vinylpyridin in 200 mM Tris·HCl, 2 mM EDTA (pH 8,4) (v/v) zugegeben und 30 min lang bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Alkylierungslösung wurde abgenommen und die Gelstücke mit 100 μl ddH₂O versetzt und 15 min lang auf dem Schütteltisch bei RT gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke ebenso mit 100 μl 50 % ACN in Wasser (v/v) gewaschen. Die Flüssigkeit wurde vollständig entfernt, die Gelstücke durch Zugabe von 100 μl ACN

geschrumpft (s.o.). Das ACN wurde abgenommen und die Gelstücke in 100 µl 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, (pH 8,0), 10 % ACN (v/v) rehydratisiert. Nach 5 min wurden 100 µl ACN zugegeben und 15 min lang bei RT auf dem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Lösungsmittel abgenommen und die Gelstücke im Vakuumkonzentrator getrocknet (s.o.).

D. Im Gel-Verdau

Die trockenen Gelstücke wurden mit proteasehaltigem Verdaupuffer bei 4°C rehydratisiert. Dazu wurde das Cup mit den trockenen Gelstücken auf ein Eisbad gegeben und 150 µl des proteasehaltigen Verdaupuffers (25 ng·µl⁻¹ Trypsin (TPCK-*treated* oder *sequencing grade*) in 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, (pH 8,0), 10 % ACN (v/v)) zupipettiert. Die Gelstücke wurden 30 min lang rehydratisiert. Die überstehende Lösung wurde abpipettiert und so viel proteasefreier Verdaupuffer zugegeben bis die Gelstücke vollständig bedeckt waren. Der Verdau erfolgte über Nacht bzw. 15 Stunden lang bei einer Temperatur von 37°C (PCR-Cycler).

E. Extraktion der Peptide aus dem Gel

In diesem Abschnitt wurden alle Lösungen bzw. Extrakte gesammelt! Zum pipettieren wurden fein ausgezogene Gelloader-Spitzen verwendet. Nach dem Verdauende wurde der Überstand abpipettiert, in ein GC-Glasvial gegeben und die Flüssigkeit im Vakuumkonzentrator abgezogen. Zu den feuchten Gelstückchen wurde soviel 25 mM Tris-HCl-Lösung (pH 8,2) zugegeben sodass die Gelstücke von der Flüssigkeit bedeckt waren. Dann wurde 15 min lang bei RT auf dem Schütteltisch inkubiert. Nun wurde das gleiche Volumen ACN zugegeben und für weitere 15 min auf dem Schütteltisch, ebenfalls bei RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und in das Glasgefäß gegeben. Nun wurden die Gelstücke 2 x je 15 min lang auf dem Schüttler und einmal 15 min lang im Ultraschallbad (20°C) mit wässriger 5 % Ameisensäure, 50 % Acetonitril (v/v) eluiert. Die abgenommenen Überstände wurden im Glasgefäß vereinigt und anschließend im Vakuumkonzentrator bis fast zur Trocknen eingengt.

4.3.2.3.2. Allgemeine Vorschrift für den enzymatischen Verdau im Gel ohne Reduktion und Alkylierung CBB-gefärbter Proteinbanden

Man verfährt analog zu Kap. 4.3.2.3.1. Reduktion und Alkylierung entfallen jedoch.

4.3.2.3.3. Allgemeine Vorschrift für den enzymatischen im Gel-Verdau Silber-gefärbter Proteinbanden

Man verfährt analog zu Kap. 4.3.2.3.1. Die Silberfärbung kann durch das Waschen der Gelstücke nicht entfernt werden. Somit reicht ein einziger Spülschritt.

4.3.3. Bestimmung der Cerenkov-Strahlung des tryptisch im Gel-gespaltenen [³²P] markierten HIR

Während des im Gel-Verdaus wurde von allen Gelstückchen, Spüllösungen und Gelextrakten mit Hilfe eines Flüssigkeits-Scintillators (3 x für je 3 min) die Radioaktivität bestimmt. Aus den Mittelwerten der einzelnen Datenpunkte wurden mit Hilfe einer Excel-Computerauswertung Balkendiagramme erstellt.

4.3.4. RP-Mikro-Tip-Entsalzung

4.3.4.1. Herstellung der RP-Mikro-Tips

Ein Kartuschen-Filter (zur Proteinsequenzierung) wurde zunächst mit 100 % TFA gereinigt und mit einem Skalpell eine Fritte herausgeschnitten. Die Fritte wurde mit 50 μl Methanol unter Druck (es wurde eine luftgefüllte 1 ml Insulinspritze verwendet) in die Spitze eines *Gelloader-Tips* (1-10 μl) gepresst. Danach wurden 10 μl (bzw. je nach zu entsalzender Peptidmenge) einer Suspension (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ POROS Oligo R3 (PerSeptive Biosystems) in Methanol) in den *Gelloader* gegeben und mit Hilfe der Insulinspritze auf die Fritte gespült. In gleicher Weise wurde eine zweite Fritte eingesetzt, welche dann mit 10 μl einer Suspension (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ POROS 20 R2 (PerSeptive Biosystems) in Methanol) überschichtet wurde.

4.3.4.2. Allgemeine Vorschrift zur Entsalzung mit RP-Mikro-Tips

Die Mikro-Tips wurden zunächst 3 x mit je 50 μl wässriger 60 % ACN, 0,1 % TFA (v/v) gespült und 3 x mit jeweils 50 μl wässriger 1 % TFA (v/v) equilibriert. Die zu entsalzenden Proben wurden in wässriger 1 % TFA-Lösung aufgenommen (Volumen je nach Probenmenge bemessen), wobei das Probenvolumen höchstens 50 % des Säulenbettvolumens betrug. Die Probe wurde unter Druck (Insulinspritze) 3 x über die Säule gespült (jeweils 1 min). Nach der Beladung wurde die Säule 3 x mit jeweils 50 μl wässriger 0,1 % TFA gespült, dann wurde die Säule trockengespült. Die gebundenen Peptide wurden mit einer wässrigen 60 % ACN, 0,1 % Ameisensäure (v/v) sehr langsam eluiert (maximal halbes Säulenbettvolumen). Die Eluate wurden sofort der NanoES zugeführt bzw. mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators getrocknet.

4.3.5. IMAC-Mikro-Tip-Phosphopeptid-Aufreinigung

4.3.5.1. Herstellung und Aktivierung der IMAC-Mikro-Tips

Entsprechend Kap. 4.3.4.1 wurde in einen Eppendorf *Gelloader-Tip* eine Membranfritte eingesetzt. Die Spitze wurde mit 30 μl einer Suspension bestehend aus 50 mg Metallchelate (Poros MC, PerSeptive Biosystems) in 1 ml Ethanol gefüllt. Der IMAC-Mikro-Tip wurde zuerst 2 x mit jeweils 50 μl Wasser (Insulinspritze), dann 2 x mit je 25 μl 0,1 M Essigsäure gewaschen. Danach wurden die *Tips* mit 100 μl einer 0,1 M GaCl_3 in 0,1 M Essigsäure aktiviert. Nicht gebundene Metallionen wurden durch zweimaliges Spülen mit je 50 μl 0,1 M Essigsäure herausgewaschen.

4.3.5.2. Allgemeine Vorschrift für die IMAC-Mikro-Tip-Phosphopeptid-Aufreinigung

Zur Beladung wurde die Probenlösung (10 μl einer 6 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ HSP in 0,1 M Essigsäure) sehr langsam 4 x über das aktivierte Metallchelate (Insulinspritze) gespült. Danach wurde der *Tip* 2 x mit jeweils 50 μl 0,1 M Essigsäure gewaschen. Die Elution der Phosphopeptide erfolgte 3 x mit jeweils 5 μl NH_4OH -Lösung (pH 11). Die Eluate wurden vereinigt und sofort im Vakuumkonzentrator eingengt.

4.3.6. Kapillarelektrophoretische Bestimmungen [538]

Zur Trennung der Analyten wurde die CZE (Kapillarzonenelektrophorese) eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch *on-line*-Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 195 nm. Zur Äquilibrierung der Kapillare wurde diese zunächst 15 min lang mit 1 N NaOH, dann für weitere 15 min mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 2,5) gespült. Anschließend wurde 10 min lang eine Spannung von 10 kV angelegt. Vor jedem CE-Lauf wurde die Kapillare unter Druck wie folgt gespült:

60 sec	0,1 N NaOH
60 sec	ddH ₂ O
180 sec	50 mM Phosphatpuffer (pH 2,5)

4.3.6.1. CZE-Bestimmung zur Etablierung der RP-Mikro-Tips

Für RP-Mikro-Tips wurden folgende kapillarelektrophoretische Bedingungen angewandt:

Kapillare: uncoated *fused silica*-Kapillare, 50 cm x 50 µm (I.D.)

CZE-Trennpuffer: 50 mM Phosphatpuffer (pH 2,5)

Polarität: Kathode am Auslaß

Spannung: 25 kV

Kapillar-Temp.: 25°C

Injektion: 20 psi-sec

Für die CZE-Bestimmungen wurden 10 µl einer 6 pmol·µl⁻¹ (theoretische Konzentration) wässrigen HSP-Lösung nach erfolgter Entsalzung (unterschiedliche Säulenbettvolumen) und ohne Entsalzung (Kontrollen) eingesetzt.

4.3.6.2. CZE-Bestimmung von tryptisch gespaltenem β-Casein

Für die RP-Mikro-Tip-Untersuchung des β-Caseinverdaus wurden folgende kapillarelektrophoretische Bedingungen angewandt:

Kapillare: uncoated *fused silica*-Kapillare, 90 cm x 50 µm (I.D.)

CZE-Trennpuffer: 50 mM Phosphatpuffer (pH 2,5)

Polarität: Kathode am Auslaß

Spannung: 25 kV

Kapillar-Temp.: 25°C

Injektion: 15 psi-sec

Für die CZE-Bestimmungen wurden 2 µl eines nicht entsalzten 100 pmol·µl⁻¹ tryptischen β-Caseinverdaus in 8 µl wässriger 0,1 % TFA (v/v) gelöst. Bei der entsalzten Probe (Kap. 4.3.4.2 Mikro-Tip-Entsalzung) wurde das Säuleneluat (200 pmol Ausgangsmenge) nach Trocknung im Vakuumkonzentrator in 10 µl wässriger 0,1 % TFA aufgenommen.

4.3.6.3. CZE-Bestimmungen zur Etablierung der Mikro-IMAC-Tips

Für IMAC-Mikro-Tips wurden folgende kapillarelektrophoretische Bedingungen angewandt:

Kapillare: uncoated *fused silica*-Kapillare, 90 cm x 50 µm (I.D.)

CZE-Trennpuffer: 50 mM Phosphatpuffer (pH 2,5)

Polarität: Kathode am Auslaß

Spannung: 25 kV

Kapillar-Temp.: 25°C

Injektion: 30 psi-sec

Zur Kontrolle (ohne IMAC- und RP-Aufreinigung) wurde eine Lösung bestehend aus 1 µl einer wässrigen 60 pmol·µl⁻¹ HSP, 2 µl ACN und 7 µl ddH₂O (HSP-Endkonzentration 6 pmol·µl⁻¹) eingesetzt. Die zweite Probe wurde zunächst mit Hilfe der Mikro-IMAC-Aufreinigung (Kap. 4.3.5.2) konzentriert, anschließend mit Hilfe eines RP-Mikro-Tips (Kap. 4.3.4.2.) entsalzt. Die Elution erfolgte mit 3 µl einer wässrigen 60 % ACN, 0,1 % TFA (v/v). Für die CE-Bestimmung wurde das Eluat mit 7 µl ddH₂O verdünnt.

4.3.7. Allgemeine Vorschrift für die RP-HPLC mit UV-Detektion

Alle Lösungsmittel und Puffer, welche für die Chromatographie verwendet wurden, wiesen die höchste Reinheit auf, wurden vor ihrer Verwendung filtriert (0,2 µm Millipore-Filter), im Ultraschallbad 10 min entgast und 5 min mit Helium gesättigt. Alle Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Für die Microbore-RP-HPLC-Trennungen (2,1 mm I.D. Säule: µRPC C2/C18 SC 2.1/10) wurde eine Sykam-HPLC-Analge verwendet. Die HPLC-Pumpe wurde bei einer Flussrate von 750 µl·min⁻¹ betrieben und durch Vorsäulensplit (T-Stück, VICI und *fused silica*-Kapillare) im Verhältnis 5:1 auf 150 µl·min⁻¹ reduziert. Die Detektion der Peptide erfolgte *on-line* durch Messung der UV-Absorption (Peptidbindung) bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die Probeninjektion erfolgte über ein Rheodyne Injektionsventil mit 100 µl Probenschleife. Zur Injektion wurde die Probe in Puffer A (0 % ACN, 0,05 % TFA in Wasser (v/v)) gelöst. Die Elution der Peptide erfolgte im Gradienten-Modus. Als organischer Puffer B wurde 80 % ACN, 0,065 % TFA in Wasser (v/v) verwendet. Für die Kapillar-RP-HPLC Trennungen (TSK Super ODS 125 x 0,3 mm I.D.) wurde entweder eine HPLC-Spritzenpumpe (Eldex) bei einer Flussrate von 5 µl·min⁻¹ oder eine Sykam-HPLC-Analge, ebenfalls bei 5 µl·min⁻¹ Flussrate (Split-Verhältnis 150:1), verwendet. Die Probeninjektion erfolgte über ein Rheodyne Injektionsventil mit 10 µl Probenschleife. Die Detektion der Peptide erfolgte *on-line* durch Messung der UV-Absorption (Peptidbindung) bei einer Wellenlänge von 214 nm mit Hilfe einer Kapillar-Bubble-Zelle (ca. 150-200 µm I.D.). Zur Datenaufzeichnung wurde ein Integrator oder ein A/D-Interface mit nachgeschaltetem computerunterstützten Auswertprogramm verwendet.

4.3.8. Ermittlung des µRP-HPL-Cerenkov-Chromatograms von [³²P]-markiertem und tryptisch im Gel gespaltenem HIR

Die µRP-HPLC-Trennung der tryptischen Peptide erfolgte entsprechend Kap. 4.3.7. Zur Ermittlung der Cerenkov-Spur wurde das Säuleneluat fraktioniert (jeweils 2 min in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen). Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde anschließend mit einem Flüssigkeits-Scintillator bestimmt (3 x für je 3 min). Aus den Mittelwerten der einzelnen Datenpunkte wurde dann das Cerenkov-Chromatogramm erstellt.

4.3.9. MADLI-Massenspektrometrie

4.3.9.1. Präparation der mikrokristallinen Matrix

Bei der MALDI-MS wurde die *fast evaporation* Technik nach Shevchenko *et al.* [142] modifiziert nach O'Connell und Stults [539] angewendet. Auf einer Position des MALDI-Probenschlittens wurden zunächst 0,5 µl einer Mischung aus 20 g·l⁻¹ α-Cyano-4-hydroxymizsäure und 5 g·l⁻¹ Nitrocellulose in Aceton/2-Propanol (1:1(v/v)) pipettiert. Durch die rasche Verdunstung des Lösungsmittels kam es zur Ausbildung eines feinen Matrixfilmes. Die dünne Matrixschicht wurde mit 0,25 µl einer wässrigen 5 % TFA-Lösung angesäuert und anschließend ein Probenaliquot (0,5-10 µl) der verdauten Peptide (gelöst in wässriger 0,1 % TFA) zugegeben. Nach Trocknung der Matrixschicht wurden 5 µl Wasser auf die Matrixschicht pipettiert. Nach 5 sec wurden das Wasser mittels Druckluft von der Matrixoberfläche abgeblasen.

4.3.9.2. Aufnahme der MALDI-Massenspektren

Die Proben wurden an einem Shimadzu Kratos Kompact MALDI FTOF Massenspektrometer vermessen. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 337 nm mit einem fokussierten Laserstrahl mit einer Energiedichte von 10^6 - 10^8 W·cm⁻² und einer um 30-60 % verminderten Intensität des Laserstrahls sowie einer Beschleunigungsspannung von 20 keV. Zur Aufnahme der Spektren wurden unter gleichbleibenden Bedingungen mehrere Laserpulse akkumuliert. Die Kalibration erfolgte extern mittels humaner Substanz P ($M_w = 1347,7$ Da) und Rinderinsulin ($M_w = 5733,6$ Da).

4.3.10. ESI-Massenspektrometrie

4.3.10.1. Allgemeiner Betrieb, Kalibration und Feinabstimmung

Die ESI-MS-Analysen wurden an einem Finnigan MAT TSQ 700 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (San Jose, California, USA), ausgestattet mit einer konventionellen Finnigan MAT (San Jose, CA) Elektrospray-Quelle (50 μ m I.D. *fused silica*-Kapillare) durchgeführt. Je nach Bedingungen wurde eine Spannung von $\pm 3,5$ -5 kV an die ESI-Nadel angelegt. Bei *on-line*-LC-ESI-MS-Experimenten wurde *Sheath*-Gas (N₂, 99,999 % Reinheit, 50-75 psi Druck) und *Sheath*-Flüssigkeit (MeOH/H₂O, 70/30 (v/v) oder 100 % Isopropanol) zur Stabilisierung des Elektrosprays während der Gradientenelution verwendet. Je nach Bedingungen wurde die Temperatur der beheizten Kapillare auf 190-210°C eingestellt. Die Aufnahme von Übersichtsspektren erfolgte in Q1 oder Q3 bei einer Scan-Geschwindigkeit von 500 Da·s⁻¹. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit Hilfe einer DEC 3000 *Workstation*. Die Daten wurden mit Hilfe der ICIS Bioworks-Software (Version 8.3.0.) auf einer *DEC-Station* ausgewertet [540]. Die vollautomatische Interpretation der CID-Massenspektren erfolgte mit Hilfe des SEQUESTTM Algorithmus welcher in der ICIS Software (Version 8.3.0.) enthalten war. Kalibration und Tuning erfolgten mit Hilfe synthetischer Peptide. Die Kalibrationslösungen wurden entweder mit Hilfe der Spritzenpumpe oder der NanoES in das MS-Gerät infundiert. Die MS-Linsen wurden massenunabhängig, alle anderen Variablen dagegen massenabhängig eingestellt. Für die Feinabstimmung der phosphorylierungsspezifischen Scantechniken wurden synthetische Phosphopeptide verwendet. Eine detaillierte Beschreibung von Kalibration und Feinabstimmung findet sich im Bedienungs-Handbuch des TSQ 700. Bei Anwendung spezieller Scanmethoden wurden einige gerätetechnische Einstellungen und Abläufe mit Hilfe der *Instrument Control Language* (ICL) programmiert. Die *on-line*-Kopplung von Kapillar-LC und MS erfolgte mit Hilfe von *Micro Unions* (Upchurch). Bei Flussraten < 10 μ l·min⁻¹ kommt es bei der Finnigan-ESI-Konstruktion zur Bildung von Luftblasen, was schließlich zu unregelmäßigen Pulsationen des Elektrosprays führt. Aus diesem Grund wurde mit einer Spritzenpumpe stabilisierende *Sheath*-Flüssigkeit über ein T-Stück am Einlass der ESI-Kapillare zugeführt [76]. Zur optimalen totvolumenfreien Kopplung wurden die Kapillarenden plan geschnitten, wenn erforderlich nachgeschliffen.

4.3.10.2. Allgemeine Vorschrift zur Spritzenpumpeninfusion

Hierzu wurde die Probenlösung mit einer Glasspritze, welche über eine *fused silica*-Kapillare (50 μ m I.D.) direkt an die ESI-Kapillare des ESI-Interfaces gekoppelt wurde, bei den ausgewählten Flussraten ins MS infundiert. Im positiven Ionisierungsmodus wurden die Proben in wässriger 50 % MeOH, X % Ameisensäure (X = 0,1-1), im negativen Ionisierungsmodus in wässriger 50 % MeOH X % NH₄OH (X = 1-5) gelöst.

4.3.10.3. Allgemeine Vorschrift zur NanoES-MS

Für die NanoES-MS-Bestimmungen wurde die Probe in 1-10 µl Nanospraylösung gelöst. Im positiven Ionisierungsmodus wurde hierzu wässrige 50 % MeOH, X % Ameisensäure (X = 0,1-5; entsprechend den Experimenten), im negativen Ionisierungs-Modus wässrige 50 % MeOH, X % NH₄OH (X = 1-5) verwendet. Die mit Probenlösung gefüllte Nanospraynadel wurde 2 min lang bei 4000 U·min⁻¹ zentrifugiert und dann unter mikroskopischer Kontrolle die Spitze der Nanospraynadel geöffnet. Anschließend spannte man die Nanospraynadel in die NanoES-Halterung und positionierte diese unter Videobeobachtung coaxial 1-2 mm vor die Öffnung der beheizten Kapillare (MS-Einlass). Die Zündung der Nadel erfolgte durch Anlegen der Spannung (in der Regel 700-900V).

4.3.10.4. µLC-MS-Experimente

Über ein *Microthight Union* (Upchurch) wurde entweder der Säulenauslaß (ohne UV-Detektion) oder der Auslaß der *Bubble-Zelle* (mit *on-line*-UV-Detektion) an die ESI-Kapillare (190 µm A.D., 50 oder 75 µm I.D.) des ESI-Interfaces gekoppelt. Zur Stabilisierung des Sprays wurde dem Säuleneluat (5 µl·min⁻¹ Flussrate) mit einem T-Stück *Sheath*-Flüssigkeit (100 % i-Propanol oder wässriger 50 % MeOH, Flussrate 5 µl·min⁻¹) zugeführt.

4.3.10.5. TFA-saure positiv/negativ-Ionen-µLC/ESI-sCID-MS-Hybrid-Scantechnik

On-line-µLC/UV/ESI-sCID-MS-Hybrid-Scanmethode mit Polaritätswechsel und Potentialstufung im ersten fokussierenden Quadrupol (Oktapol) des Massenspektrometers. Die von der Säule eluierenden enzymatisch erzeugten Peptide wurden *on-line* mittels *fused-silica*-Kapillare (75 µm I.D.) ins MS-Gerät infundiert. Zur Erzeugung der phosphorylierungsspezifischen [PO₃]-Markerionen (bei *m/z* 79) wurde im Skimmerbereich im negativen Ionenmodus ein hohes Potential (sCID, apicid = 40 V) angelegt und dabei auf *m/z* 79 gescannt (1,5 sec). Zur Ermittlung der Molekülionen wurde im positiven Ionenmodus bei niedrigem Potential (apicid = -10 V) für 3,5 sec (in Q3) über den Bereich von *m/z* 300-2500 gescannt.

Die MS-Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe folgender ICL-Aufnahmeroutine:

```
ICL-Verfahren:  mpeptd99.icl
sw 79           # auf m/z 79 umschalten
avg 2          # Aufnahme Einstellung
initg          # Grafik initialisieren
while rt       # 'während der LC-Elution'
%1=sens (59)   # Sensor 59 für UV-Spur
neg; spray=5.0; apicid=40; neghyb; fm=78.7; lm 78.9; st=1.5;go
                # negativer Modus; ESI-Spannung 5 kV; Oktapol Offset 40 V; Tune-
                # File neghyb einlesen; 1,5 sec scannen m/z 78,7-78,9
pos; spray=5.0; apicid=-10; poshyb; fm=300; lm 2500; st=3.5;go; stop (%1) plot ( ,%1,1)
                # positiver Modus; ESI-Spannung 5 kV; Oktapol Offset -10 V; Tune-
                # File poshyb einlesen; 3,5 sec scannen m/z 300-2500

end
avg 0
```

4.3.10.6. Alkalische negativ-Ionen- μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scanntechnik

Alkalische *on-line* negativ-Ionen- μ LC/ESI-sCID-MS-Hybrid-Scanmethode mit Potential-Stufung im ersten fokussierenden Quadrupol (Oktapol) des Massenspektrometers. Das von der Säule eluierende HSP (30 pmol absolut) wurde *on-line* (75 μ m I.D. *fused-silica*-Kapillare) ins MS-Gerät infundiert. Zur Erzeugung der phosphorylierungsspezifischen $[\text{PO}_3]^-$ und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Markerionen (bei m/z 79 bzw. m/z 97) wurde im Skimmerbereich im negativen Ionenmodus ein hohes Potential (sCID, apicid = 70 V) angelegt und dabei für 1,5 sec über den Bereich von m/z 75-100 gescannt. Zur Ermittlung der Molekülionen wurde im negativen Ionenmodus bei niedrigem Potential (apicid = 0 V) für 3 sec (in Q3) über den Bereich von m/z 300-2500 gescannt.

Die MS-Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe folgender ICL-Aufnahmeroutine:

```
EMULT=1800;prof;avg=2;neg
WHILE RT <0.3
GO;STOP
END
WHILE RT <5
apicid=70
fm=75;lm=100;st=1.5;go
apicid=0
fm=300;lm=2000;st=3;go
STOP
END
avg=0
OFF;ASTOP
```

4.3.10.7. Mikro-Spraytechnik für die alkalische negativ-Ionen- μ LC/ESI-MS-Peptidmassen-Bestimmung und Fraktionierung

Die Trennung der Peptidmischung erfolgte unter alkalischen Bedingungen (pH 10,5, NH_4OH) bei einer Flussrate von 4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Über ein T-Stück (VICI) wurde am Säulenauslaß Methanol bei einer Flussrate von 1 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ zugeführt. Zur gleichzeitigen Fraktionierung und *on-line*-ESI-MS-Analyse wurde der xyz-Nanosprayschlitten technisch modifiziert. Die Halterung für *off-line*-Nanospraynadeln wurde durch eine Kunststoffhalterung (A.Beck in Zusammenarbeit mit Lehrwerkstatt der Firma Fischer, Waldachtal, Tummlingen) ersetzt, mit welcher ein Mikro-T-Stück aus Titan (VICI) fixiert werden konnte. Das Mikro-T-Stück diente gleichzeitig als elektrischer Kontakt für die Mikro-ESI und zum *Splitten* des Eluates. An der Bohrung des Mikro-T-Stücks hatte die Flüssigkeit über das Metall elektrischen Kontakt. Eine PicoTip (*fused silica* 75 μm I.D., 360 μm O.D., Öffnung 30 ± 2 μm , New Objective) wurde als ESI-Nadel verwendet und etwa 2 mm vor der *Orifice*-Öffnung des MS-Gerätes unter Videokontrolle positioniert. Mit einer 50 μm I.D. *fused-silica* Kapillare wurde das Säuleneulat in einem Verhältnis von 1:2 gesplittet, wobei 1,7 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ins MS-Gerät infundiert, die restlichen 3,3 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ gesammelt wurden. Von den gesammelten Fraktionen wurde die Radioaktivität (Cerenkov-Counter) bestimmt.

4.3.10.8. μ IMAC/MS-Analysen von Phosphopeptiden

Zur μ IMAC wurde eine *fused silica*-Kapillare 95 mm x 250 μm I.D. mit hydrophilen Durapor-Fritten (0,45 μm Porengröße), gefüllt mit Metallchelate (POROS MC, 20 μm

Partikelgröße), hergestellt von E. Rapp (Uni Magdeburg), verwendet. Die Säule wurde bei einer Flussrate von $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ betrieben (Eldex-HPLC-Pumpe). Zum Auftragen der unterschiedlichen Spül-, Aktivierungs- und Probenlösungen wurden zwei Rheodyne (Modell 8125) Injektionsventile verwendet: V1 mit 200 μl Probenschleife, V2 mit 5 μl Probenschleife. Das Elutionsprofil wurde bei 214 nm UV-Absorption aufgezeichnet.

Bei der *off-line*-Methode wurde das Säuleneluat manuell fraktioniert, am Vakuumkonzentrator eingetrocknet und anschließend durch positiv-Ionen-NanoES-MS analysiert.

Bei der *on-line*-Methode wurde das Säuleneluat über ein T-Stück bei einer Flussrate von $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ zusammen mit *Sheath*-Flüssigkeit direkt dem ESI-*Interface* zugeführt.

Der exakte methodische Ablauf einschließlich aller Aktivierungs-, Spül- und Elutionslösungen ist in Kap. 5.7 aufgeführt.

4.3.10.9. SEQUEST [206,247]

SEQUEST ist ein Programm, welches automatisch nicht-interpretierte MS/MS-Spektren mit aus Proteindatenbanken stammenden Peptidsequenzen korreliert [164,247]. Die Analyse beginnt mit der Computer-Reduktion der MS/MS-Daten. Jedes Tandem-Massenspektrum durchläuft zwei Arten der Daten-Vorbereitung. Bei der ersten Methode (*search preprocessing*) werden die Daten der Spektren zu einer Liste von Massen und Intensitäten konvertiert. Innerhalb eines 10 Da großen Fensters um das Elternion werden alle Daten entfernt. Die Intensitäten der Ionen werden auf 100,0 normalisiert. Alle Ionen mit Ausnahme der 200 intensivsten werden nun aus der Datei entfernt. Mit der zweiten Methode (*correlation preprocessing*) wird das experimentell ermittelte Spektrum für die Korrelationsanalyse vorbereitet. Zunächst wird ein 10 Da großes Fenster um den m/z -Wert des Elternions entfernt und das Spektrum in 10 gleich große Sektionen eingeteilt. Die Ionen jeder Sektion werden auf einen Maximalwert von 50 normalisiert. Die Proteinsequenzen werden nun schrittweise analysiert bis die ganze Datenbank durchsucht ist. Zur Berechnung der Molekulargewichte der aus der Datenbank stammenden Peptidsequenzen werden die durchschnittlichen chemischen Aminosäuremassen verwendet. Zur Berechnung von Phosphopeptiden verwendet man die Massenwerte 167,08 Da (pSer), 181,11 Da (pThr) und 243,18 Da (pTyr).

Ein *preliminary score* (S_p) wird durch den Vergleich der vorprozessierten Daten und der vorhergesagten Fragmentationwerte aller aus der Datenbank stammenden Sequenzen nach Gl. 4.1 berechnet:

$$S_p = \left(\sum i_m \right) n_i (1 + b)(1 + r) / h_t \quad (\text{Gl. 4.1}),$$

wobei i_m die entsprechende Intensität (innerhalb ± 1 u), n_i die Anzahl der entsprechenden Fragmentationen, β die Kontinuität der b- und y-Ionen, ρ die Anwesenheit von Immonium-Ionen im Spektrum und ihre entsprechenden Aminosäuren in der errechneten Sequenz und n_τ die Gesamtanzahl der erwarteten Fragmentationen ist.

Eine hohe Übereinstimmung zwischen aufgenommenem Spektrum und Kandidaten-Sequenz liefert einen hohen S_p -Wert. Die besten 500 Sequenzen werden nun mittels einer *cross-correlation*-Analyse verglichen. Dazu bildet man für jede dieser Sequenzen ein rekonstruiertes MS/MS-Spektrum und vergleicht durch Überlagerung der Spektren deren Übereinstimmung. Sind zwei MS/MS-Spektren identisch oder nahezu gleich, dann hat die

Korrelationsfunktion ein Maximum am 0 *Offset*. Bei der *cross-correlation*-Analyse erhält man zwei unterschiedliche Werte: X_{corr} (*correlation-value*) und ΔC_n (Differenz der normalisierten X_{corr} -Werte des höchsten und der weiter unten aufgelisteten Kandidaten). Eine hohe Übereinstimmung liefert einen hohen X_{corr} -Wert, da dieser von der Qualität des MS/MS-Spektrums und der Übereinstimmung der Sequenz des Kandidaten abhängt. Für eine eindeutige Unterscheidung zwischen richtigen und falschen Treffern sollte nach Eng *et al.* der X_{corr} -Wert $> 2,0$ sein [164,179,541]. Ein hoher ΔC_n -Wert (generell $> 0,1$) steht für eine gute Korrelation zwischen dem ermittelten MS/MS-Spektrum und der Sequenz des aufgelisteten Kandidaten [179,542]. Da der ΔC_n -Wert von der Größe der Datenbank abhängt, erhöht sich mit zunehmender Anzahl der Datenbankeinträge auch die Signifikanz der Analyse. Aufgrund einer nicht ausreichenden Anzahl von Vergleichsequenzen kann eine Suche innerhalb einer einzelnen Proteinsequenz somit zu falschen Treffern mit großen ΔC_n -Werten führen. Sind die Peptide länger als 15 Aminosäuren, ausreichend Fragmentationen vorhanden und der X_{corr} -Wert zudem relativ hoch, können ΔC_n -Werte $> 0,4$ erhalten werden, die eine äußerst verlässliche Unterscheidung zwischen richtigen und falschen Treffern ermöglichen. Peptide, bestehend aus weniger als 6 Aminosäuren sind im allgemeinen für diese Art der Identifizierung nicht geeignet. SEQUEST wird insbesondere bei der Mikro- und Nano-*on-line*-LC-ESI-MS/MS-Identifizierung und/oder -Charakterisierung von Proteinen, unter anderem von Phosphorylierungen, eingesetzt [36,186,201,226,542-545]. Für die Identifizierung wurde eine "homo sapiens" Unterdatenbank der OWL Proteindatenbank (Version 30.2, <http://bmbgs11leeds.ac.uk/bmb5dp/owl.html>, 1,7 Millionen Einträge, lokal abgespeichert, aus dem *Internet* heruntergeladen) in Form eines ASCII Text-Files im FASTA Format vom National Center for Biotechnology Information (Washington, DC, USA) verwendet. OWL ist eine nicht-redundante Datenbank, welche Proteinsequenzen von GenBank (National Center for Biotechnology Information, Washington, DC, USA), SWISS-PROT (Swiss Institute of Technology, Genf, Schweiz), Protein Information Resource (National Biology Resource Foundation, Georgetown, Washington, DC, USA) und Protein Database Brookhaven (Brookhaven National Laboratory, Brookhaven, NY, USA) enthält.

4.3.10.10. Internetseiten

Die Hauptseite des ExPASy-Servers befindet sich im Internet unter folgender Adresse: <http://www.expasy.ch/>. Die *site map* von ExPASy (<http://www.expasy.ch/sitemap.html>) dient als Plattform für den Zugang der Datenbank- und Bioinformatik-Web-Seiten.

Tab. 4.1. Übersicht der Programme und Web-Seiten zur Auswertung von MS-Daten.

Programme	Web-Seiten
Peptidmassen-Fingerprinting	
PepIdent	http://www.expasy.ch/tools/pepident.html
MS-Fit	http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msfit.htm
PeptideSearch	http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/FR_PeptideSearchForm.html
MassSearch	http://cbrg.inf.ethz.ch/subsection3_1_3.html
ProFound	http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound
Mascot: Peptide Mass Fingerprint	http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html

Tab. 4.1. Fortsetzung.

CombSearch: Peptide Mass Fingerprinting	http://cuiwww.unige.ch/~hammerl4/combsearch/
Peptid-Sequenz-Tags von MS/MS oder MALDI-PSD	
MS-Tag	http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/mstagfd.htm http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/ucsfhtml3.2/mstagfd.htm
PepFrag	http://prowl.rockefeller.edu/PROWL/pepfragch.html
Peptide Search	http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/FR_PeptidePatternForm.html
Mascot	http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html
SEQUEST	http://thompson.mbt.washington.edu/quest/
Protein-Sequenz-Tags	
TagIdent	http://www.expasy.ch/tools/tagident.html
PeptideSearch	http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/FR_PeptidePatternForm.html
MS-Tag	http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/mstagunk.html
Mascot: Sequence Query	http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html
CombSearch: Tagging	http://cuiwww.unige.ch/~hammerl4/combsearch
Peptidmassen-Fingerprinting und Sequenz-Tags	
MS-Edman	http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msedman.htm http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/ucsfhtml3.2/msedman.htm
Mowse	http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse
CombSearch	http://cuiwww.unige.ch/~hammerl4/combsearch/
Mascot	http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html
Aminosäuren-Zusammensetzung	
AACompIdent	http://www.expasy.ch/tools/aacomp/
PROPSEARCH	http://www.embl-heidelberg.de/aaa.html
Protein-Aminosäuren-Zusammensetzung, Sequenz-Tag, Peptidmassen-Fingerprinting	
MultiIdent	http://www.expasy.ch/tools/multiident/
Identifizierung von Protein-Modifikationen durch Vergleich theoretischer und massenspektrometrisch ermittelter Peptidmassen	
FindMod tool	http://www.expasy.ch/tools/findmod/
Theoretische Berechnung von Peptidmassen	
MS-Digest	http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msdigest.htm
PeptideMass	http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html
Theoretische Berechnung der Fragmentionen von Peptid-CID-Experimenten	
MS-Product	http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msprod.htm
Berechnung theoretischer pI (isoelektrischer Punkt) und Mw (Molekulargewicht) von Proteinen	
Compute pI/Mw tool	http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

5. Ergebnisse

5.1. Im Gel-Verdau SDS-PAGE getrennter Proteine

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist die effektivste Methode zur Trennung komplexer Proteinmischungen. Für die anschließende massenspektrometrische Analyse der PAGE-getrennten Proteine müssen diese zunächst aus der Gelmatrix isoliert werden. Proteine lassen sich jedoch nur sehr schlecht aus dem Gel isolieren. Dagegen lassen sich Peptide relativ einfach und zudem sehr effizient eluieren. Enzymatische im Gel-Spaltung PAGE-getrennter Proteine und anschließende MS-Analyse der resultierenden Peptide ist deshalb die Methode der Wahl zur Identifizierung und Charakterisierung geringster Proteinmengen. Eine empfindliche Analyse erfordert ein hohes S/N bei der MS-Bestimmung. Neben einer effizienten Peptidelution sollte deshalb auch ein möglichst geringer chemischer Untergrund angestrebt werden. Deshalb stand zunächst die Entwicklung einer optimalen Prozedur des im Gel-Verdau im Vordergrund. Die enzymatische Spaltung im Gel sollte sowohl auf Silber- als auch auf Coomassie Brilliant Blue (CBB) gefärbte Proteingele angewandt werden können. Zudem sollte sie auch die Schritte der Reduktion (Dithiothreitol DTT) und Alkylierung (4-Vinylpyridin) enthalten. Die exakte Vorschrift des im Gel-Verdau ist in Kap. 4.3.2 beschrieben. Zur Optimierung des im Gel-Verdau wurde SDS-PAGE-getrenntes, CBB-gefärbtes Rinderserumalbumin als Modellprotein eingesetzt. Die Effizienz des Verdau wurde anhand des RP-HPLC Peptidfingerprints (UV-Absorption bei 214 nm) überprüft. Die einzelnen Schritte des optimierten im Gel-Verdau insbesondere die Elution der Peptide, wurden mit Hilfe *'in vivo'* radioaktiv markierter und SDS-PAGE getrennter HIR- β -UE (Wildtyp und Mutante) quantitativ untersucht. Die quantitative Analyse der einzelnen Verdau Schritte erfolgte anhand der ermittelten Radioaktivitäten (Cerenkov-Signale). Zusätzlich wurde der im Gel-Verdau auf eine *'in vivo'* (Zellkultur) isolierte und SDS-PAGE getrennte Mutante der HIR- β -UE angewendet. Die Effizienz des im Gel-Verdau wurde mit Hilfe eines *on-line*- μ LC(UV)/ESI-MS-Peptid-Mappings überprüft.

5.1.1. Durchführung des Experimentes

Zur quantitativen Kontrolle der einzelnen Schritte des im Gel-Verdau wurde [32 P]-radioaktiv markierte HIR- β -UE eingesetzt. Transient transfizierte (HIR) HEK 293 Zellen wurden dazu mit [32 P]Orthophosphat zunächst *'in vivo'* markiert, der Rezeptor mittels Immunpräzipitation (Antikörper 83-14) aus dem Zellysat isoliert und durch SDS-PAGE aufgereinigt. Aufgrund des radioaktiven Ansatzes konnte nur eine äußerst begrenzte Zellkulturmenge eingesetzt werden. Die β -UE konnte deshalb nur autoradiographisch und nicht durch CBB-Färbung detektiert werden. Mit Hilfe eines Cerenkov-Counters wurden bei jedem Verdau Schritt die Radioaktivitäten (*Counts Per Minute*, CPM) sowohl der Lösungen als auch der Gelstücke bestimmt und zur Beurteilung der einzelnen Schritte graphisch dargestellt. Die β -UE wurde vor ihrer tryptischen im Gel-Spaltung ebenfalls im Gel reduziert (DTT) und alkyliert (4-Vinylpyridin). Das Molekulargewicht der einzelnen Cysteinreste erhöhte sich aufgrund der Alkylierung um jeweils 105 Da (Abb. 5.2). Aufgrund unvollständiger Umsetzungen konnten Disulfidbrücken ($-S^{-1}-S^{-1}-$) zwar reduziert (Molekulargewicht der Cysteine somit 1 Da erhöht), die Thiolgruppen ($-S^{-II}H$) aber eventuell nicht alkyliert werden. Aufgrund seiner hohen Pufferkapazität im Bereich zwischen pH 8-8,5 wurde ein Tris-HCL Puffer als Spül- und Reaktionslösung verwendet. Die Konzentration der Protease (Trypsin zur Sequenzierung) betrug $25 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ im Verdau puffer. Der Verdau erfolgte bei einer Temperatur von 37°C über Nacht (16 h). Durch wiederholtes Spülen wurde zum einen der chemische Hintergrund äußerst

niedrig gehalten, zum anderen wurden die für die proteolytische Spaltung notwendigen Reaktionsbedingungen gewährleistet.

5.1.2. Reduktion, Alkylierung und Verdau

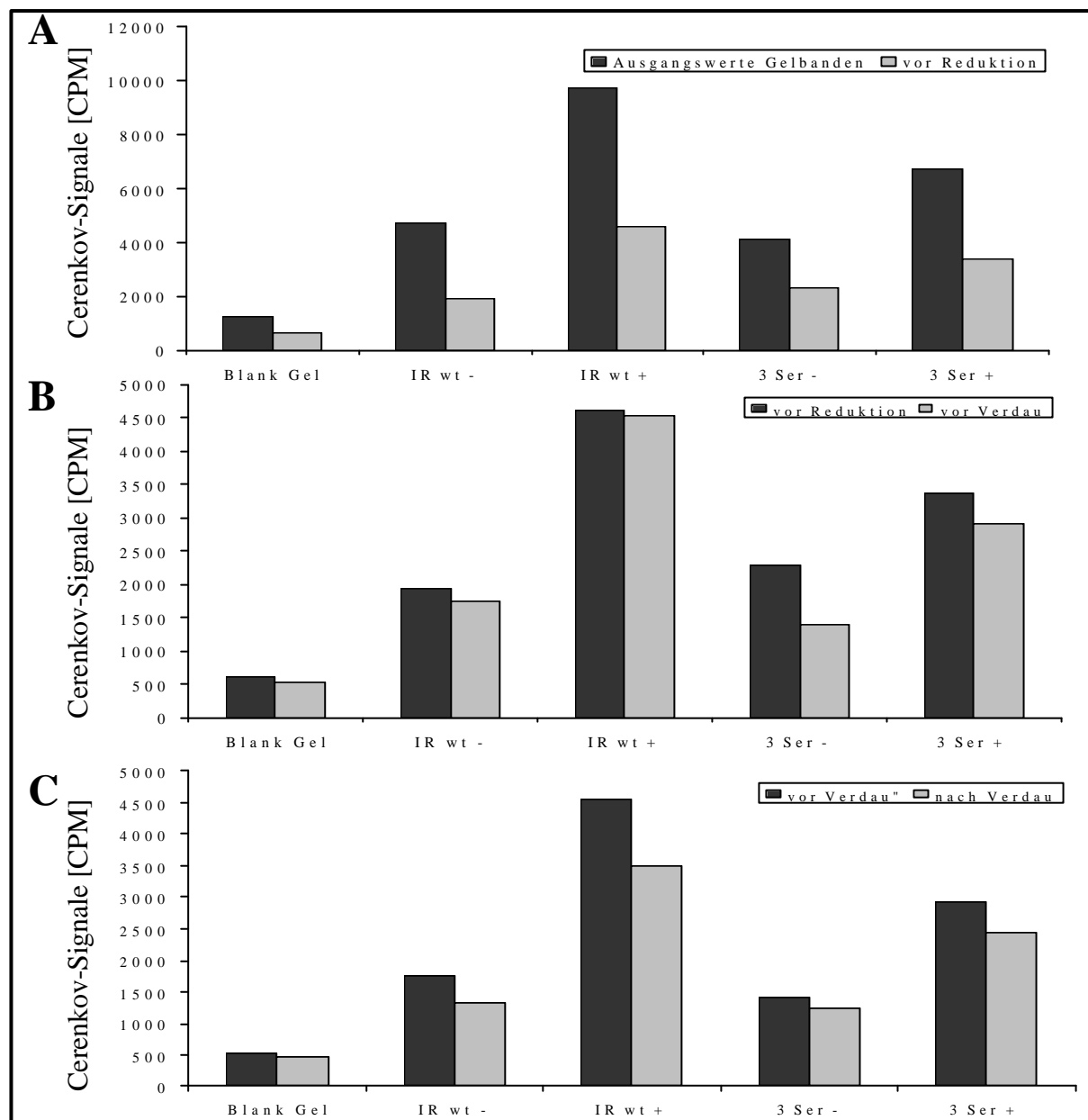


Abb. 5.1. Balkendiagramm-Darstellung der Cerenkov-Signale (CPM), welche während der einzelnen Schritte des im Gel-Verdau von den Gelstückchen bestimmt wurden. (A) Vergleich der CPM-Werte vor und nach dem ersten Spülschritt, (B) vor und nach Reduktion/Alkylierung (DTT/4-Vinylpyridin), (C) vor und nach Verdau (Trypsin). Die Proben waren: Gelbande zur Kontrolle (Blank Gel); immunpräzipitierte 'in vivo' ^{32}P -markierte HIR-b-UE (HEK-293-Fibroblastenzellen): nicht-insulinstimulierte und insulinstimulierte ($10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ für 5 min bei 37°C) Wildtypen (IR wt- bzw. IR wt+); nicht-insulinstimulierte und insulinstimulierte $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$; 5 min bei 37°C) 3fach Serin-Mutanten (3 Ser- bzw. 3 Ser+). Die abgebildeten Werte entsprechen den Mittelwerten der 3fach (je 3 min) bestimmten CPM-Werte.

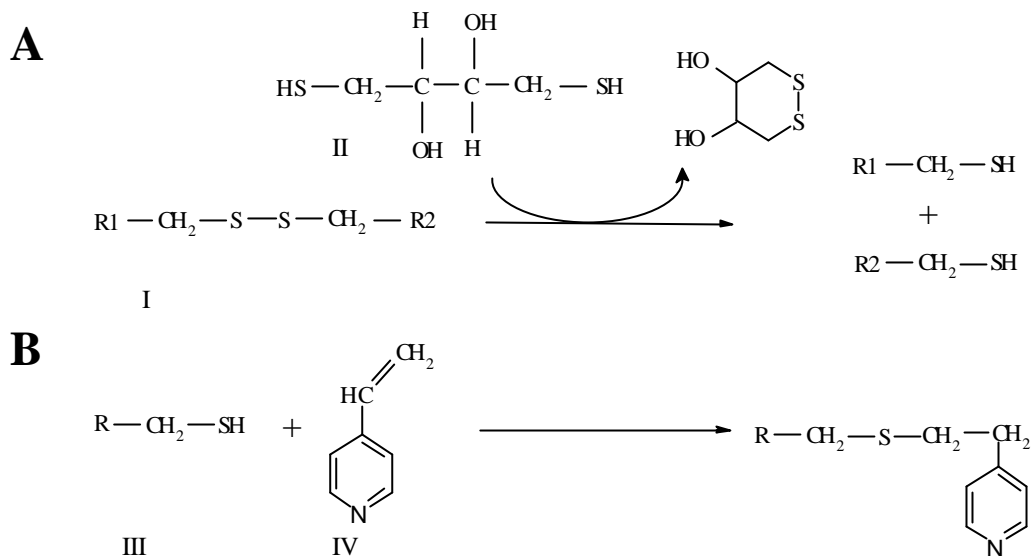


Abb. 5.2. Reaktionsschema der Reduktion (**A**) und Alkylierung (**B**) von Disulfidbrücken. I: über Disulfidbrücke ($-S^I-S^I-$) verknüpfte Proteinbereiche; II: zur Reduktion der S^I -Reste eingesetztes Dithiothreitol (DTT); III: Cysteinrest mit freier Thiolgruppe ($-S^{II}H$); IV: 4-Vinylpyridin. Reduktion (DTT) und Alkylierung (4-Vinylpyridin) der S^I führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichts um 105 Da.

Beim ersten Schritt des im Gel-Verdaus werden die Verunreinigungen (Acrylamid, SDS usw.), die infolge der SDS-PAGE auftreten, ausgewaschen. Bei CBB-gefärbten Proteinen wird dabei gleichzeitig die Färbung entfernt. Durch die Spülschritte wurde die in den Gelstücken enthaltene Radioaktivität (CPM-Werte) stark erniedrigt (durchschnittlich 51,1 %, Abb. 5.1.A). Durch das Spülen der Gelstücke konnten somit auch Salze (u.a. nicht umgesetztes [^{32}P]Orthophosphat) aus dem Gel eluiert werden. Nach der Reinigung wurden die Proteine im Gel reduziert (DTT) und alkyliert (4-Vinylpyridin). Obwohl die Gelstücke bei diesen Schritten ebenfalls ausgiebig gespült wurden, verringerten sich die CPM-Werte lediglich um durchschnittlich 15,2 % (Abb. 5.1.B). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass bei diesen Schritten nur wenig Protein verloren wurde. Die tryptische Spaltung erfolgte 16 Stunden lang bei einer Temperatur von 37°C. Während des Verdaus nahmen die CPM-Werte durchschnittlich um 17,9 % ab (Abb. 5.1.C). Die Abnahme der Radioaktivität ist jedoch nicht auf einen Verlust von Proteinen bzw. Peptiden zurückzuführen, sondern erfolgt vielmehr aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit des [^{32}P]-Isotops von lediglich 14 Tagen.

5.1.3. Elution der Peptide

Nach der proteolytischen Spaltung wurden die Peptide aus dem Gel eluiert. Um eine möglichst hohe Sequenzabdeckung zu erhalten, wurde eine vollständige Elution der Peptide angestrebt. Zur Elution wurden deshalb Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität eingesetzt. Im Durchschnitt konnte 85,4 % der Radioaktivität aus dem Gel eluiert werden (Abb. 5.3). Zur Vermeidung hydrolytischer Peptidspaltungen erfolgte die Elution unter besonders schonenden Bedingungen. Die Elutionsvolumina wurden zudem sehr knapp bemessen. Zur Verhinderung der Oxidation von Methioninresten wurde sehr rasch gearbeitet.

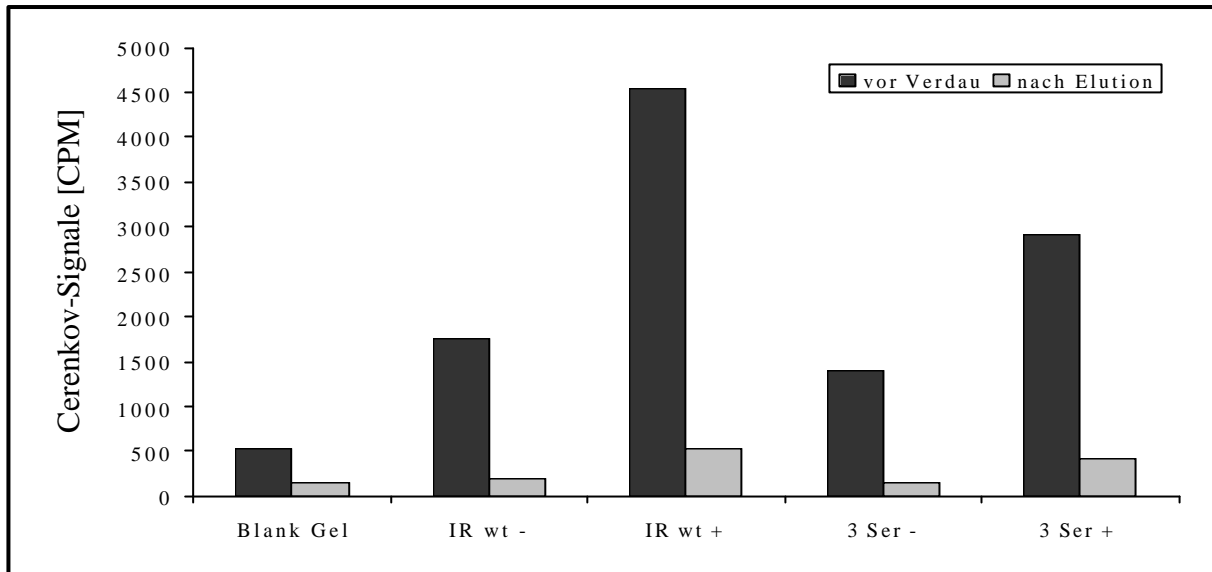


Abb. 5.3. Balkendiagramm-Darstellung der Cerenkov-Signale (CPM), welche vor und nach der Elution der Peptide aus dem Gel bestimmt wurden. Bedingungen siehe Abb. 5.1.

5.1.4. Im Gel-Verdau und μ LC/ESI-MS-Peptid-Mapping der HIR- β -UE

Bei diesem Experiment wurde die Qualität des im Gel-Verdau anhand der ermittelten Protein-Sequenzabdeckung überprüft. Ein aus Zellkultur isoliertes mutiertes Protein wurde zunächst tryptisch im Gel gespalten und anschließend die resultierenden Peptide massenspektrometrisch mit Hilfe eines positiv-Ionen- μ LC/ESI-MS-Experimentes untersucht. Die Peptide, welche die mutierten Aminosäuren enthielten, sollten ebenfalls detektiert werden. Für die Analyse wurde eine SDS-PAGE aufgereinigte, CBB-gefärbte Gelbande einer 3-fach Tyrosin (Y1146/50/51) gegen Phenylalanin (F) punktmutierten HIR- β -UE eingesetzt. Der Insulinrezeptor wurde durch Immunpräzipitation aus transient transfizierten (HIR) HEK-293-Zellen isoliert. Das Protein wurde im Gel reduziert (DTT), alkyliert (4-Vinylpyridin) und tryptisch gespalten. Die tryptischen Peptide wurden nach ihrer Elution aus dem Gel im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch Vergleich der bei der μ LC/ESI-MS-Bestimmung ermittelten tryptischen Peptidmassen mit den theoretisch berechneten Peptidmassen. Während der LC wurde ein *on-line*-UV-Chromatogramm (214 nm) aufgenommen (Abb. 5.4.C). Die eingesetzte Proteinmenge wurde auf der Basis der im UV-Chromatogramm ermittelten Signalintensitäten auf etwa 20-40 pmol (ca. 1,2-2,5 μ g) geschätzt. Bei dem μ LC/ESI-MS-Experiment konnte neben dem UV-Chromatogramm auch ein Ionenchromatogramm (*Base-Peak*-Chromatogramm, BPC, Abb. 5.4.B) aufgenommen werden. Zur Gewährung konstanter Spraybedingungen wurde dem Säuleneluat während des gesamten Experimentes *Sheath*-Flüssigkeit (70 % MeOH in Wasser (v/v), 5 μ l·min⁻¹) zugemischt. Die Peptide wurden mit Hilfe der Finnigan-ESI-Quelle ins Massenspektrometer infundiert.

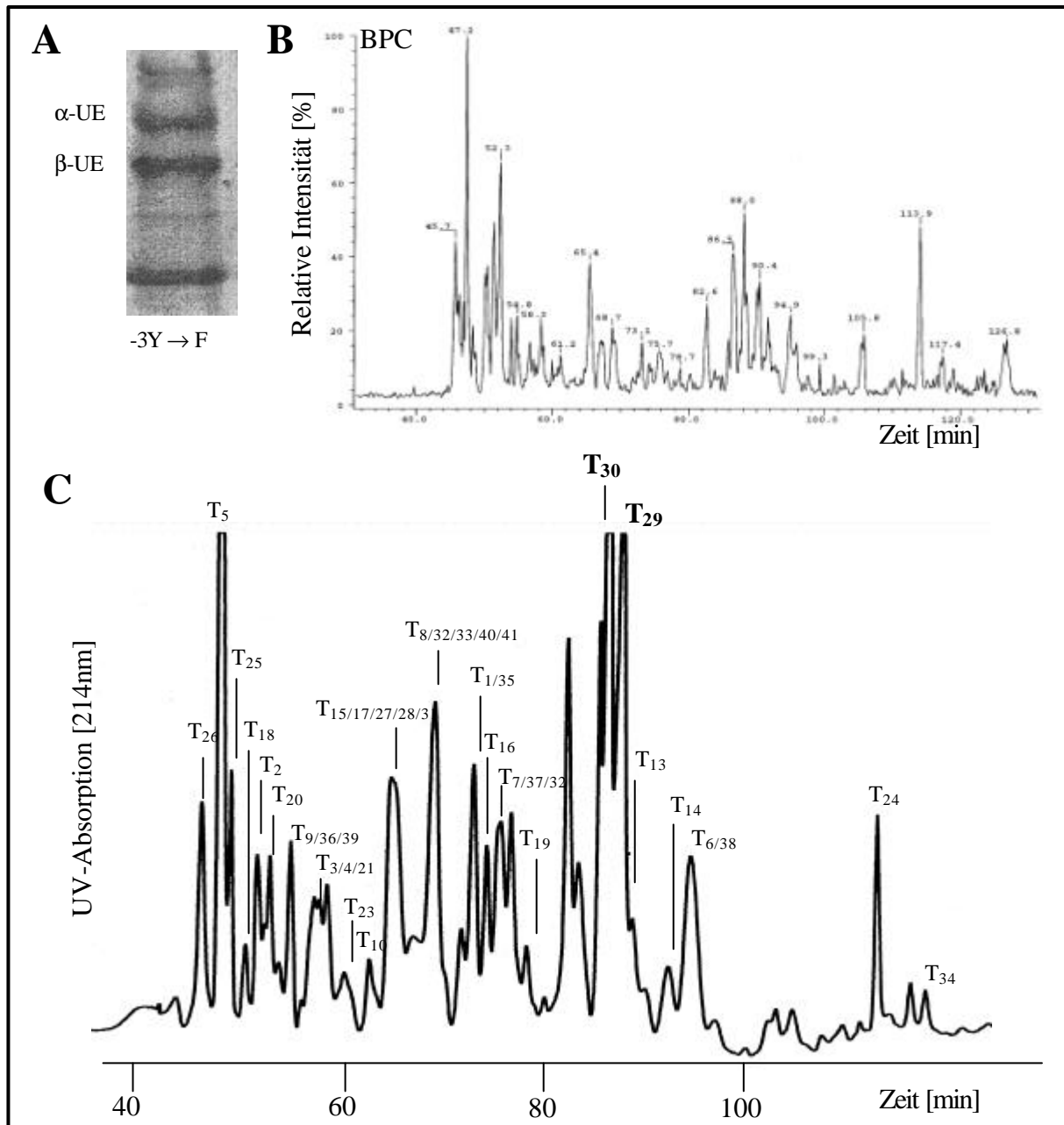


Abb. 5.4. μ LC/ESI-MS-Peptid-Mapping (TSQ 700) der tryptisch im Gel gespaltenen Mutante (Y1146/50/51F) der HIR-**b**-UE. (A) SDS-PAGE (CBB-Färbung) des isolierten HIR mit Zuordnung der Untereinheiten. (B) Base-Peak-Chromatogramm (BPC). (C) On-line-UV-Chromatogramm mit Zuordnung der tryptischen Peptide. Die punktmutierte HIR-**b**-UE wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Lysat transient transfizierter (HIR) HEK-293-Zellen isoliert, SDS-PAGE-gereinigt und durch CBB-Färbung detektiert. Die **b**-UE wurde im Gel reduziert (DTT), alkyliert (4-Vinylpyridin) und tryptisch gespalten. Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μ m I.D. (C18) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); Flussrate: 5 μ l min^{-1} ; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in H_2O ; Puffer B: 80 % ACN, 0,075 % TFA in H_2O ; Gradient: 0-10 min 0 % B; 11-20 min 5 % B; 20-100 min 45 % B; 100-130 min 95 % B; Injektion: 10 μ l (extrahierte Peptide gelöst in Puffer A); UV-Detektion bei 214 nm (Bubble-Zelle, ca. 150 μ m I.D.); MS: Sheath-Flüssigkeit: 5 μ l min^{-1} 70 % MeOH in H_2O (v/v); Sheath-Gas: 60 psi; positiver Ionenmodus; ESI-Spannung: -4,5 kV; Q3 Scan im Bereich von 400-2500 m/z in 3,5 sec.

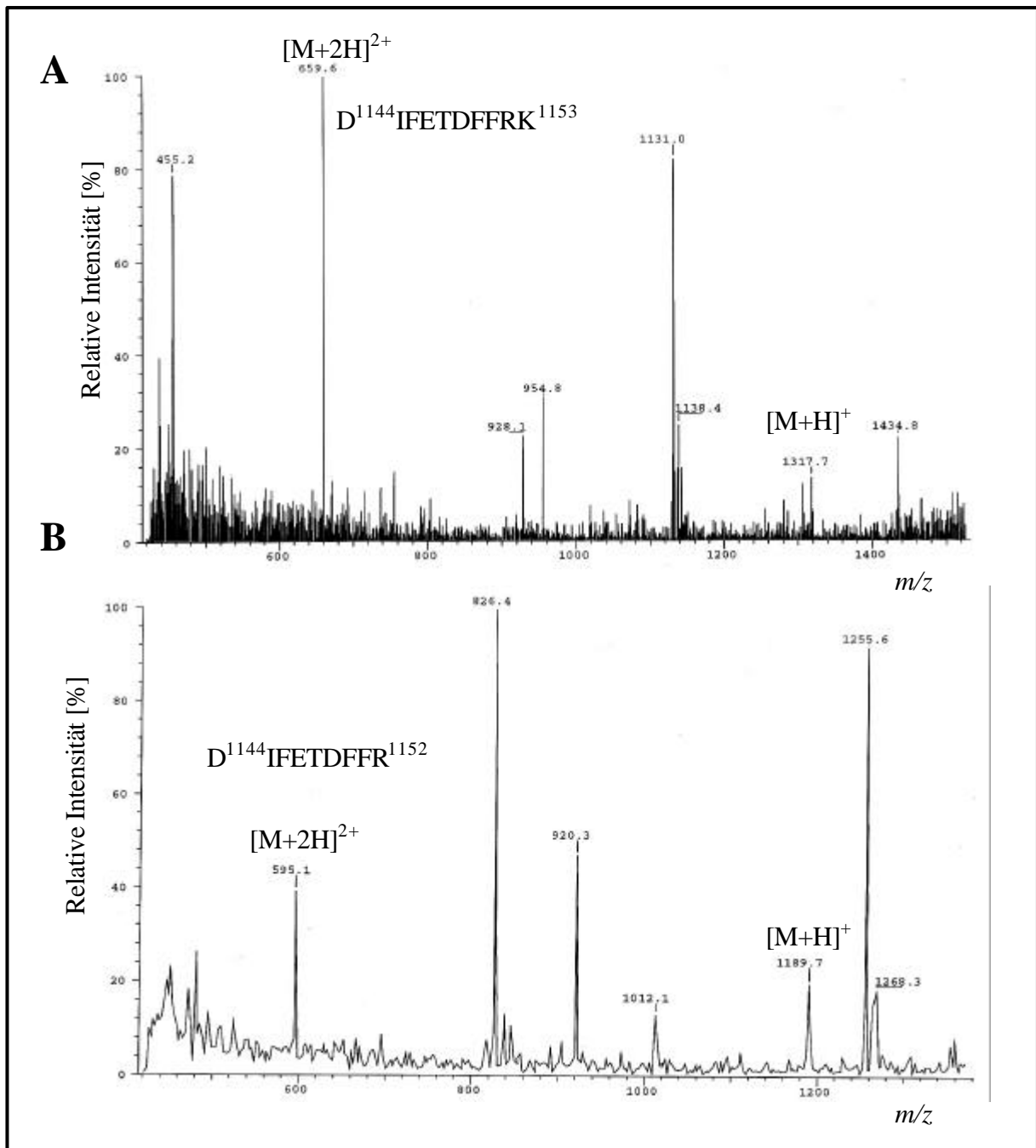


Abb. 5.5. Positiv-Ionen-ESI-Massenspektren (TSQ 700) der Signale T_{30} (A) und T_{29} (B) im UV- bzw. Base-Peak-Chromatogramm (Abb. 5.4.B und C) mit Zuordnung der mutierten Peptide: $D^{1144}IFETDFFR^{1152}$ bei m/z 595,1 $[M+2H]^{2+}$ und m/z 1189,7 $[M+H]^+$; $D^{1144}IFETDFFRK^{1153}$ bei m/z 659,6 $[M+2H]^{2+}$ und m/z 1317,7 $[M+H]^+$. MS-Bedingungen: Sheath-Flüssigkeit: $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 70 % MeOH in H_2O (v/v); Sheath-Gas: 60 psi; positiver Ionenmodus; ESI-Spannung: -4,5 kV; Q3 Scan im Bereich von 400-2500 m/z in 3,5 sec.

Tab. 5.1. Tabellarische Auflistung der Peptide, welche beim μ LC/ESI-MS-Peptid-Mapping (TSQ 700) der tryptisch im Gel gespaltenen Mutante (Y1146/50/51F) der HIR-b-UE (Abb. 5.4) ermittelt wurden.

Fragment: Pos. in b-UE ⁽¹⁾	R _t [min]	[M+H] ⁺ _{m.i.} ⁽²⁾ best.	[M+H] ⁺ _{m.i.} ⁽³⁾ theor.	Dm ⁽⁴⁾	MC ⁽⁵⁾	Mut ⁽⁶⁾	Aminosäuresequenz
T ₁ : 766-774	71,3	973,8 (+1) 487,5 (+2)	973,6	0,2	0		ESLVISGLR
T ₂ : 775-780	51,7	780,4 (+1)	780,4	0,0	0		HFTGYR
T ₃ : 781-794	57,8	1750,7 (+1) 876,3 (+2)	1750,8	0,1	0		IELQACNQDTPEER
T ₄ : 795-804	59,5	1131,7 (+1) 569,1 (+2)	1131,6	0,1	0		CSVAAYVSAR
T ₅ : 805-810	46,6	676,2 (+1)	676,3	0,1	0		TMPEAK
T ₆ : 811-836	93,9	3018,2 1509,6 (+2) 1007,0 (+3)	3017,5	0,7	0		ADDIVGPVTHEIFEN NVVHLMWQEPK
T ₇ : 837-850	87,2	1652,4 (+2) 826,7 (+3)	1651,9	0,5	0		EPNGLIVLYEVSyr
T ₈ : 852-863	68,0	1525,9 (+1) 763,6 (+2)	1525,7	0,2	0		YGDEELHLCVSR
T ₉ :864-870	55,7	900,6 (+1)	900,5	0,1	1		KHFALER
T ₁₀ :865-870	59,5	772,3 (+1)	772,4	0,1	0		HFALER
T ₁₁ :874-885	62,2	1319,2 (+1) 660,7 (+2)	1318,7	0,5	1		LRGLSPGNYSVR
T ₁₂ :876-887	62,2	1319,2 (+1) 660,7 (+2)	1318,7	0,5	1		GLSPGNYSVRIR
T ₁₃ :943-981	90,1	4433,5 2218,7 (+2) 1478,5 (+3)	4432,1	1,4	1		RQPDGPLGPLYASSN PEYLSASDVFPESVY VPDEWEVSR
T ₁₄ :944-981	92,1	4277,1 2139,1 (+2) 1426,5 (+3)	4276,0	1,1	0		QPDGPLGPLYASSNP EYLSASDVFPESVYV PDEWEVSR
T ₁₅ :984-988	63,9	615,3 (+1)	615,4	0,1	0		ITLLR
T ₁₆ :989-1004	73,7	1715,7 (+1) 858,4 (+2)	1714,8	0,9	0		ELGQGSFGMVYEGN AR
T ₁₇ :1005-1018	63,9	1529,4 (+1)	1528,9	0,5	1		DIKGEAETRVAVK
T ₁₈ :1019-1027	50,8	976,8 (+1)	976,5	0,3	0		TVNESASLR
T ₁₉ :1030-1040	77,4	1280,6 (+1) 640,9 (+2)	1280,7	0,1	0		IEFLNEASVMK
T ₂₀ :1041-1049	54,3	1160,8 (+1) 581,0 (+2)	1160,6	0,2	0		GFTCHHVVR
T ₂₁ :1050-1056	59,5	715,4 (+1)	715,5	0,1	0		LLGVVSK
T ₂₂ :1057-1073	88,8	1839,6 (+1) 920,1 (+2)	1839,0	0,6	0		GQPTLVVMELMAHG DLK
T ₂₃ :1074-1077	50,8	538,2 (+1)	538,3	0,1	0		SYLR
T ₂₄ :1078-1114	113	4025,8 2013,4 (+2) 1342,5 (+3) 1006,5 (+4)	4024,0	1,8	0		SLRPEAENNPGRPPP TLQEMIQMAAEIAD GMAYLNAK
T ₂₅ :1115-1119	47,9	686,4 (+1)	686,4	0,0	0		KFVHR
T ₂₆ :1120-1124	44,8	545,2 (+1)	545,3	0,1	0		DLAAR
T ₂₇ :1125-1135	63,9	1369,8 (+1) 685,4 (+2)	1369,6	0,2	0		NCMVAHDFTVK

Tab. 5.1. Fortsetzung.

T ₂₈ :1136-1143	63,9	896,3 (+1) 448,6 (+2)	896,4	0,1	0		IGDFGMTR
T ₂₉ :1144-1153	83,1	1317,7 (+1) 659,6 (+2)	1317,6	0,1	1	3F	DIFETDFFRK
T ₃₀ :1144-1152	86	1189,7 (+1) 595,2 (+2)	1189,5	0,2	0	3F	DIFETDFFR
T ₃₁ :1154-1162	63,9	896,3 (+1) 448,6 (+2)	896,4	0,1	1		GGKGLLPVR
T ₃₂ :1157-1162	66,3	654,4 (+1)	654,4	0,0	0		GLLPVR
T ₃₃ :1163-1170	68,0	961,5 (+1) 481,2 (+2)	961,5	0,0	0		WMAPESLK
T ₃₄ :1171-1208	117	4263,0 2132,0 (+2) 1422,1 (+3)	4262,1	0,9	0		DGVFTTSSDMWSFG VVLWEITSLAEQPYQ GLSNEQVLK
T ₃₅ :1209-1225	71,3	2061,8 (+1) 1031,5 (+2)	2060,9	0,9	0		FVMDGGYLDQPDNC PER
T ₃₆ :1226-1231	55,7	734,4 (+1)	734,4	0,0	0		VTDLMR
T ₃₇ :1272-1292	87,2	2510,4 1255,7 (+2) 837,5 (+3)	2509,1	1,3	0		APESEELEMEFEDME NVPLDR
T ₃₈ :1253-1292	93,9	4752,6 2376,8 (+2) 1584,7 (+3) 1189,1 (+4)	4751,1	1,5	0		DDLHPSFPEVSFFHSE ENKAPESSEELEMEFE DMENVPLDR
T ₃₉ :1305-1313	55,7	867,4 (+1)	867,4	0,0	0		DGGSSLGFK
T ₄₀ :1331-1339	66,3	1039,8 (+1)	1039,6	0,2	1		NGRILTLPR
T ₄₁ :1334-1339	68,0	712,4 (+1)	712,5	0,1	0		ILTLPR

(1) Numerierung nach Ullrich et al. [546]

(2) monoisotopische Molekulargewichte der einfach protonierten Peptide

(3) MS-Digest 3.1.1, ProteinProspector 3.2.1 © Copyright (1995-1999) The Regents of the University of California; theoretisch berechnete Peptidmassen unter Verwendung folgender Eingaben:

Pyridylethyl-modifizierte Cysteinreste; Protease: Trypsin mit einer möglichen verpassten Schnittstelle; **b**-Untereinheit des humanen Insulinrezeptors entspricht Aminosäuren 724-1343

(4) **Dm**: Differenz zwischen den bestimmten und berechneten monoisotopischen Massen der einfach geladenen Peptidionen

(5) Missed Cleavage (Protease überspringt eine Schnittstelle)

(6) Mut: Punktmutanten (Y @ F)

Die Base-Peak- und UV-Chromatogramme (Abb. 5.4.B und C), welche bei dem μ LC/ESI-MS-Experiment der tryptisch im Gel gespaltenen Mutante (Y1146/50/51F) der HIR- β -UE aufgenommen wurden, zeigen deutlich, dass bei der enzymatischen Spaltung des etwa 69 kDa großen Proteins eine komplexe Mischung unterschiedlicher Peptide resultierte. Bei der Ermittlung der Protein-Sequenzabdeckung wurde die Molekulargewichtserhöhung der Cysteinreste um 105 Da (Alkylierung mit 4-Vinylpyridin) sowie die Möglichkeit einer übersprungenen Proteaseschnittstelle berücksichtigt. Bei dem Peptid-Mapping konnten insgesamt 41 tryptische Peptide der mutierten HIR- β -UE bestimmt werden (Tab. 5.1), unter anderem auch die Peptide, welche die mutierten Aminosäuren (Y1146/50/51F) enthielten. Das einfach fehlgeschnittene Peptid D¹¹⁴⁴IFETDFFRK¹¹⁵³ (T₂₉) eluierte bei einer Retentionszeit von 83,1 min (Abb. 5.4.C). Es konnte anhand seiner einfach und zweifach positiv geladenen [M+H]⁺- und [M+2H]²⁺-Molekülonen bei 1317,7 *m/z* bzw. 659,6 *m/z* identifiziert werden (Abb. 5.5.A). Bei einer Retentionszeit von 86 min eluierte das korrekt geschnittene Peptid D¹¹⁴⁴IFETDFFR¹¹⁵² (T₃₀). Es konnte anhand seiner [M+H]⁺- und [M+2H]²⁺-Molekülonen

(m/z 1189,7 bzw. m/z 595,1) identifiziert werden (Abb. 5.5.B). Bei dem Peptid-Mapping konnte insgesamt eine Abdeckung der Proteinsequenz von 75 % erzielt werden (Abb. 5.6). Bei der Analyse wurden zahlreiche Signale ermittelt, die nicht den theoretisch berechneten Peptiden zugeordnet werden konnten. Da bei der Berechnung der theoretischen Verdaufragmente lediglich eine übersprungene Proteaseschnittstelle sowie Vinylpyridin-modifizierte Cysteinreste, jedoch keine zusätzlichen Modifikationen wie z.B. Acrylamid-Adduktbildung oder Oxidation von Methioninresten bzw. weitere verpasste Schnittstellen berücksichtigt wurden, stellt die ermittelte Protein-Sequenzabdeckung einen sehr hohen Wert dar.

724	734	744	754	764
SLGDVGNVTV	AVPTVAAFPN	TSSTSVPTSP	EEHRPFKVV	<u>NKESLVISGL</u>
774	784	794	804	814
<u>RHFTGYRIEL</u>	<u>QACNQDTPEE</u>	<u>RCSVAAYVSA</u>	<u>RTMPEAKADD</u>	<u>IVGPVTHEIF</u>
824	834	844	854	864
<u>ENNVVHLMWQ</u>	<u>EPKEPNGLIV</u>	<u>LYEVSYRRYG</u>	<u>DEELHLCVSR</u>	<u>KHFALERGCR</u>
874	884	894	904	914
<u>LRGLSPGNYS</u>	<u>VRIRATSLAG</u>	NGSWTEPTYF	YVTDYLDVPS	NIAKIIIGPL
924	934	944	954	964
IFVFLFSVVI	<u>GSIIYFLRKR</u>	<u>QPDGPLGPLY</u>	<u>ASSNPEYLSA</u>	<u>SDVFPCSVYV</u>
974	984	994	1004	1014
<u>PDEWEVSREK</u>	<u>ITLLRELQOG</u>	<u>SFGMVYEGNA</u>	<u>RDIKGEAET</u>	<u>RVAVKTVNES</u>
1024	1034	1044	1054	1064
<u>ASLRERIEFL</u>	<u>NEASVMKGFT</u>	<u>CHHVRLLGV</u>	<u>VSKGQPTLVV</u>	<u>MELMAHGDLK</u>
1074	1084	1094	1104	1114
<u>SYLRLRPEA</u>	<u>ENNPGRPPPT</u>	<u>LQEMIQMAAE</u>	<u>IADGMAYLNA</u>	<u>KKFVHRDLAA</u>
1124	1134	1144	1154	1164
<u>RNCMVAHDFT</u>	<u>VKIGDFGMTR</u>	<u>DIFETDFFRK</u>	<u>GGKGLLPVRW</u>	<u>MAPESLKDGV</u>
1174	1184	1194	1204	1214
<u>FTTSSDMWSF</u>	<u>GVVLWEITSL</u>	<u>AEOPYQGLSN</u>	<u>EQVLKRVMDG</u>	<u>GYLDQPDNCP</u>
1224	1234	1244	1254	1264
<u>ERVTDLRMC</u>	<u>WQFNPKMRPT</u>	<u>FLEIVNLLKD</u>	<u>DLHPSFPEVS</u>	<u>FFHSEENKAP</u>
1274	1284	1294	1304	1314
<u>ESEELEMEFE</u>	<u>DMENVPLDRS</u>	<u>SHCQREEAGG</u>	<u>RDGSSSLGFK</u>	<u>RSYEEHIPYT</u>
1324	1334			
<u>HMNGGKKNR</u>	<u>ILTLPRSNPS</u>			

Abb. 5.6. Sequenzabdeckung der Y1146/50/51F-Mutante der HIR-**b**-UE, welche bei dem μ LC/ESI-MS-Experiment (Abb. 5.4) ermittelt werden konnte. Die Aminosäuresequenz der mutierten **b**-UE ist im Einbuchstaben-Code mit Numerierung nach Ullrich et al. [546] abgebildet. Die ermittelten Sequenzabschnitte wurden unterstrichen, der Bereich, der die Punktmutationen enthält wurde grau unterlegt.

5.2. Mikro-Techniken zur Aufreinigung und Konzentration von Peptiden

Sowohl MALDI als auch ESI sind zwar schonende, jedoch auch gegenüber Verunreinigungen sehr empfindliche Ionisierungsverfahren. Bei der Analyse von Peptiden kann bei beiden Verfahren die Ionisierung teilweise oder vollständig durch Salze oder Polymere (z.B. aus SDS-Gelen) unterdrückt werden. Ebenso können schwach ionisierende Peptide durch stark ionisierende Peptide derart stark unterdrückt werden, sodass diese keine Signale im Massenspektrum erzeugen können. In der Regel wird dies bei der positiv-Ionen-MS-Analyse tryptischer Phosphopeptide beobachtet. Die Ionisierung von Phosphopeptiden kann hierbei durch stark basische nicht-phosphorylierte Peptide unterdrückt werden. Da mit MALDI- und NanoES-MS auch nicht-aufgetrennte Peptidmischungen untersucht werden können, wurden im Laufe der letzten Jahre unterschiedliche Mikro-Verfahren zur Aufreinigung bzw. Konzentration von Peptiden entwickelt. In diesem Kapitel werden deshalb sehr einfache, aber hoch effiziente Mikro-Tip-Techniken vorgestellt, mit denen Peptide sowohl gereinigt (RP-Tips) als auch konzentriert (IMAC-Tips) werden können.

5.2.1. Aufbau und Befüllung der Mikro-Tips

Die Mikro-Tips wurden aus Pipettenspitzen der Firma Eppendorf hergestellt (*Gelloader*, zur Beladung von Gelen). Um das Chromatographie-Material in den *Tips* zurückzuhalten, wurde ein Stück eines Sequenzierfilters (Proteinsequenator) eingesetzt. Die Mikro-Tips wurden mit Hilfe von Druckluft betrieben (luftgefüllte 1 ml Insulinspritze). Als Adapter zwischen *Tip* und Spritze wurde eine 100 µl Pipettenspitze verwendet, die entsprechend zurechtgeschnitten wurde (siehe Abb. 5.7).

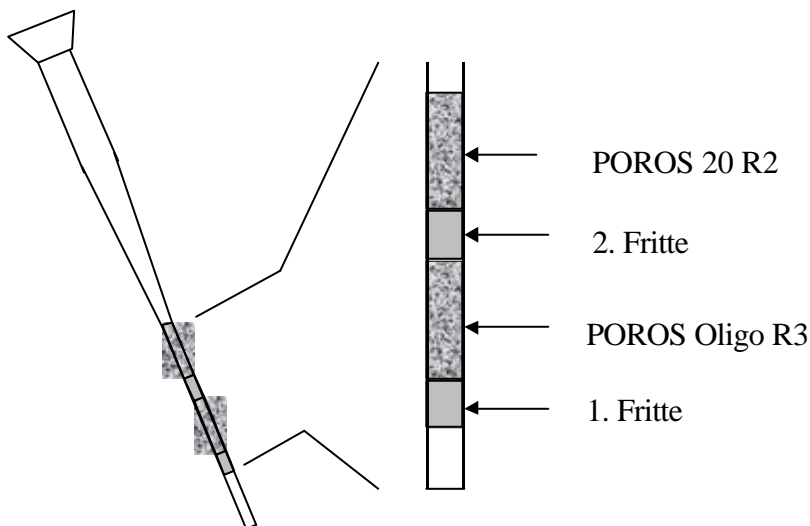


Abb. 5.7. Schematische Darstellung des Aufbaus eines RP-Mikro-Tips. Zur Zurückhaltung des Chromatographie-Materials wurde eine Fritte eingesetzt, welche dann mit dem stärker hydrophilen POROS Oligo R3 Material überschichtet wurde. Zur Verhinderung einer Durchmischung der RP-Beads wurde ein 2. Fritte eingesetzt und anschließend mit POROS 20 R2 Material überschichtet. Der IMAC-Mikro-Tip wurde ebenso angefertigt. Es wurde jedoch nur eine Fritte eingesetzt, welche mit dem Metallchelator überschichtet wurde. Bezüglich Füllung, Aktivierung und Einsatz der *Tips* siehe Kap. 4.3.4.

5.2.2. RP-Mikro-Tips zur raschen Entsalzung von Proteinverdau

Die Optimierung und Evaluierung der RP-Mikro-Tips erfolgte mit Hilfe der Kapillarzonenelktrophorese (CZE). Zur Befüllung der Tips wurde eine Suspension, bestehend aus 10 mg RP-Material in 1 ml Methanol, eingesetzt. Vor der Befüllung wurde die Suspension mit Hilfe eines Vortexers homogen durchmischt und dann das entsprechende Volumen (s.u.) auf die Fritte gegeben. Zur Optimierung der Tips wurde Hitzeschock-Peptid (HSP, $6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in Wasser) verwendet. Zunächst wurde die Wiederfindungsrate des HSP in Abhängigkeit vom RP-Säulenbettvolumen ermittelt. Das Peptid wurde dazu auf die Mikro-Tips aufgetragen, entsalzt, eluiert und anschließend mit Hilfe der CZE quantitativ bestimmt. Es erfolgten jeweils Dreifachbestimmungen unter identischen Bedingungen. Als Kontrolle wurde jeweils die HSP-Lösung verwendet ($6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in Wasser). Für den quantitativen Vergleich wurden die, bei den CZE-Bestimmungen ermittelten, Mittelwerte der HSP-Peakflächen herangezogen.

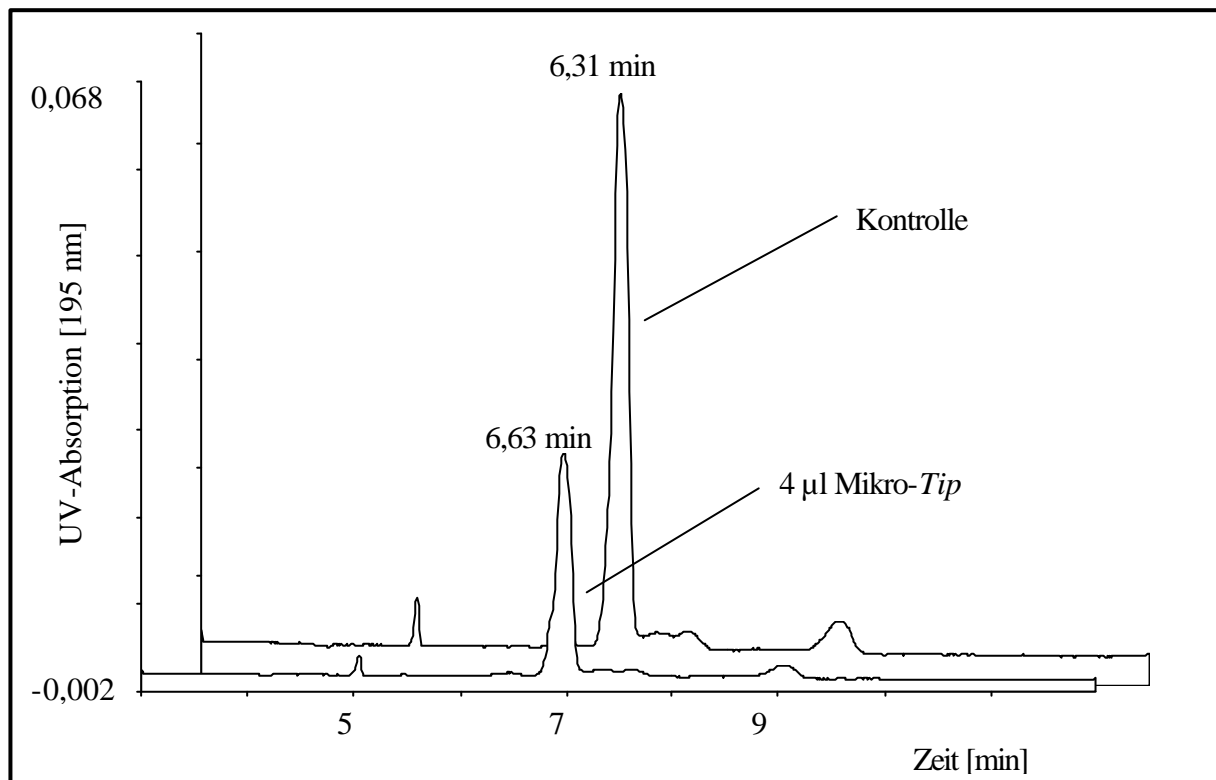


Abb. 5.8. Kapillarzonenelktropherogramme der entsalzten (Mikro-Tip mit $4 \mu\text{l}$ Säulenbettvolumen) und nicht entsalzten (Kontrolle) HSP-Lösungen ($6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in Wasser). Bedingungen: Biofocus CE3000; Kapillare: nicht-beschichtete Quarzkapillare, $50 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ I.D.; CZE-Puffer: 50 mM Phosphatpuffer (pH 2,5); Spannung: 25 kV ; Polarität: + @ -; Kapillartemperatur: 25°C ; Injektion $20 \text{ psi} \times \text{sec}$; Detektion: UV-Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 195 \text{ nm}$.

Bei den Untersuchungen wurden Säulenbettvolumina von 2, 3, 4 und $5 \mu\text{l}$ der Suspensionen (beide RP-Schichten) eingesetzt. Abbildung 5.8 zeigt die Kapillarzonenelktropherogramme, welche von den HSP-Lösungen (theoretisch $6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) ohne bzw. mit Mikro-Tip-Entsalzung ($4 \mu\text{l}$ Säulenbettvolumen bzw. Kontrolle) aufgenommen wurden. Bei den Migrationszeiten von 6,6 bzw. 6,3 min sind deutlich die Signale des HSP zu erkennen. Im Vergleich zu der

Kontrollprobe war die Intensität des Peptidsignals nach Entsalzung deutlich erniedrigt. Bei den Entsalzungen wurde somit ein erheblicher Anteil der Peptide verloren. Die Wiederfindungsrate hing sehr stark vom verwendeten Säulenbettvolumen ab (Abb. 5.9). Bei 2 μl Säulenbettvolumen gingen über 50 % der eingesetzten Peptidmenge verloren, bei 5 μl Säulenbettvolumen dagegen lediglich 12 %. Neben der hohen Wiederfindung (> 85 %) zeichnete sich die Methode zudem durch ihre einfache und sichere Handhabung aus.

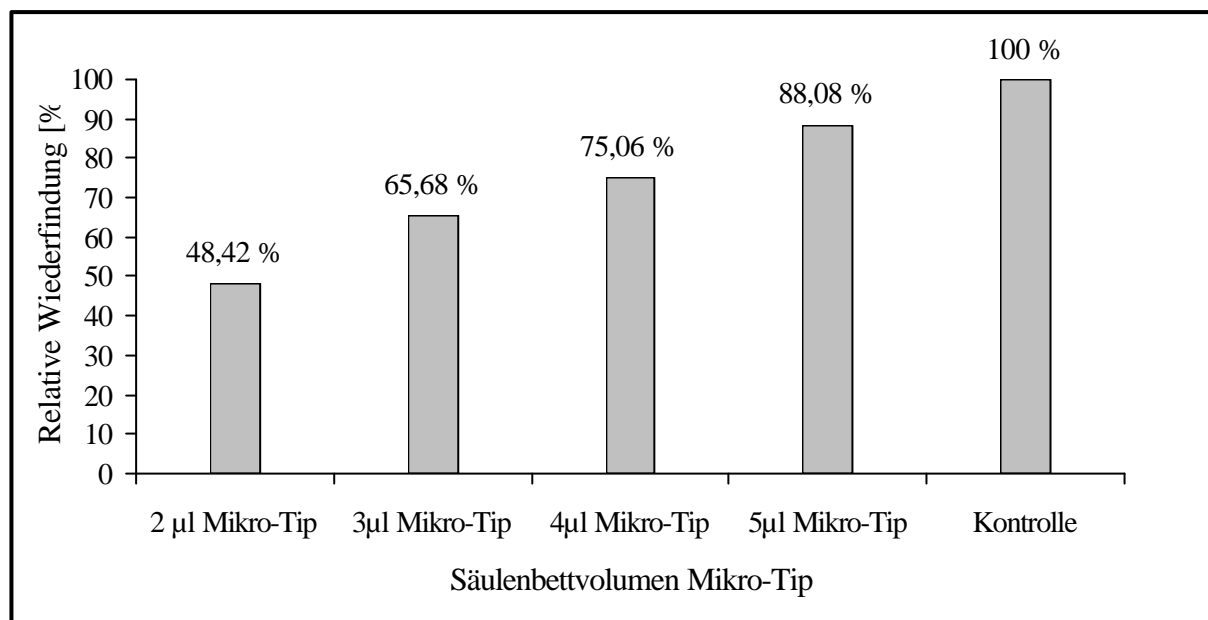


Abb. 5.9. Balkendiagramm-Darstellung der relativen Wiederfindungsrate (% HSP-Menge) in Abhängigkeit des RP-Mikro-Tip-Säulenbettvolumens. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die bei den CZE-Bestimmungen ermittelten Mittelwerte der HSP-Peakflächen wurden auf den Kontrollwert (100 %) bezogen. Bedingungen siehe Abb. 5.8.

5.2.3. RP-Mikro-Tip-Entsalzung eines tryptischen β -Caseinverdaus

Mit Hilfe der entwickelten Mikro-Tip-Technik konnte das HS-Peptid entsalzt und nahezu vollständig wiedergefunden werden. Im Vergleich zu einem einzelnen Peptid handelt es sich bei einem Proteinverdau jedoch um eine komplexe Mischung unterschiedlicher Peptide. Trotz der unterschiedlichen polaren Eigenschaften der Peptide sollten bei der Mikro-Tip-Entsalzung möglichst alle Fragmente eines Proteinverdaus nahezu quantitativ wiedergefunden werden. Mit dem folgenden Experiment sollte deshalb der Einsatz der Mikro-Tips zur Entsalzung eines Proteinverdaus überprüft werden. Bei CZE-Bestimmungen von Proteinverdau wird sowohl das Migrationsverhalten als auch die Signalintensität der einzelnen Peptidkomponenten sehr stark von den in der Probe enthaltenen Pufferbestandteilen (u.a. Salze) beeinflusst. Zur Minimierung der Salzeffekte wurde deshalb ein hochkonzentrierter tryptischer β -Caseinverdau hergestellt ($100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), welcher 1:4 mit wässriger 0,1 % TFA (v/v) verdünnt und schließlich der CZE-Bestimmung zugeführt wurde (Kontrolle, $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Für die Mikro-Tip-Entsalzung wurden 200 pmol β -Caseinverdau auf einen $10 \mu\text{l}$ Mikro-Tip aufgetragen und entsalzt. Die eluierten Peptide wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet, der Rückstand schließlich in $10 \mu\text{l}$ wässriger 0,1 % TFA aufgenommen.

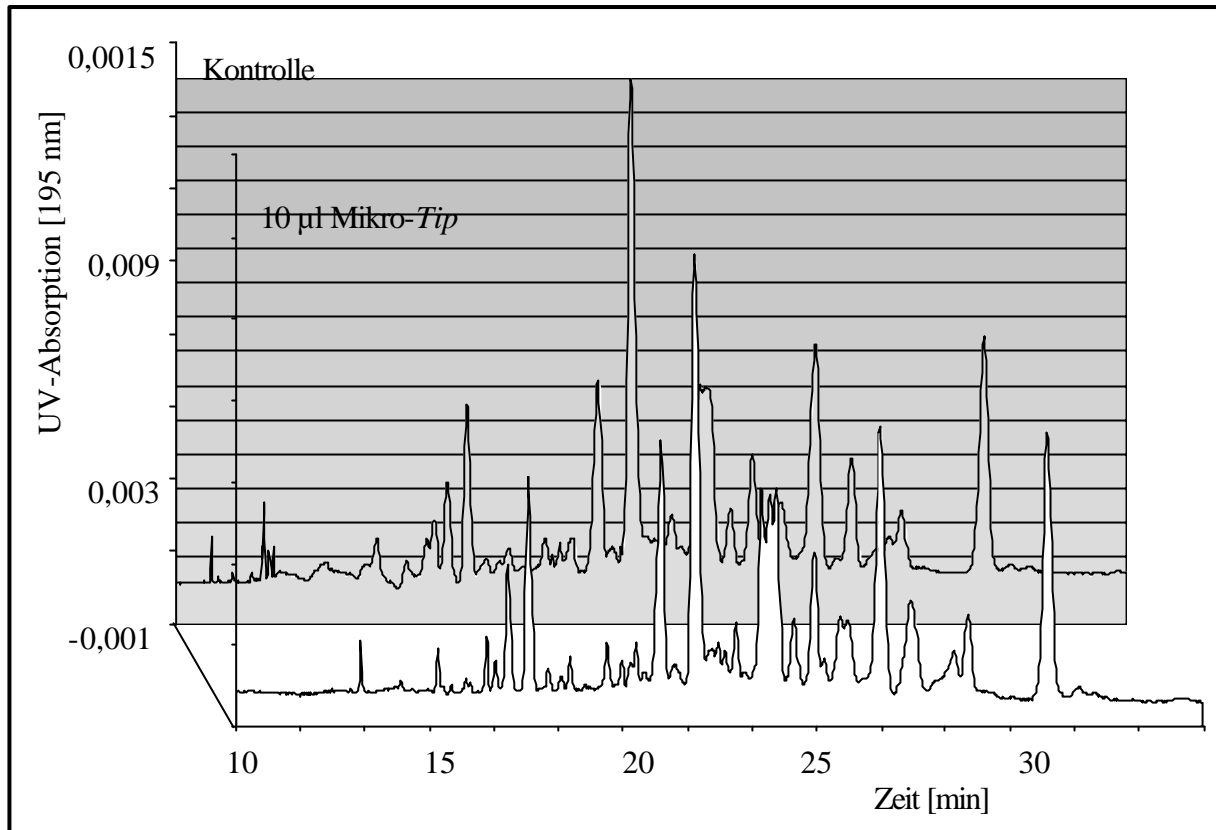


Abb. 5.10. CZE-Trennung eines β -Caseinverdaus (theoretisch $20 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$) mit ($10 \mu\text{l}$ Mikro-Tip, weiß unterlegt) und ohne Mikro-Tip-Entsalzung (Kontrolle, grau unterlegt). Bedingungen: Biofocus CE3000; Kapillare: nicht-beschichtete Quarzkapillare, $90 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ I.D.; CZE-Puffer: 50 mM Phosphatpuffer ($\text{pH } 2,5$); Spannung: 25 kV ; Polarität: $+ @ -$; Kapillartemperatur: 25°C ; Injektion $15 \text{ psi} \times \text{sec}$; Detektion: UV-Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 195 \text{ nm}$.

Abbildung 5.10 zeigt die CZE-Trennung einer β -Caseinverdaulösung (theoretisch $20 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$) mit ($10 \mu\text{l}$ Mikro-Tip, weiß unterlegt) und ohne (grau unterlegt) Mikro-Tip-Entsalzung. Die komplexe Zusammensetzung der Verdauprobe läßt sich anhand der zahlreichen Signale in den Kapillarzonenelktropherogrammen erkennen. Wie der Vergleich der beiden Elektropherogramme zeigt, erfolgte bei der Mikro-Tip-Entsalzung kein vollständiger Verlust einzelner Peptide. Vielmehr konnten alle Peptide nahezu vollständig wiedergefunden werden. Im Vergleich zur Kontrollprobe waren die Peptide bei der Mikro-Tip-entsalzten Probe deutlich besser aufgetrennt.

5.2.4. IMAC-Mikro-Tips zur raschen Anreicherung von Phosphopeptiden

Neben der RP-Aufreinigung von Proteinverdaus können die Mikro-Tips auch zur Aufkonzentration phosphorylierter Peptide eingesetzt werden. Phosphorylierte Peptide binden unter sauren Bedingungen an immobilisierte Metallionen, während die nicht-phosphorylierten Peptide ungebunden bei der Probenbeladung eluieren. Unter alkalischen Bedingungen können die Phosphopeptide dann wieder eluiert werden (IMAC, Kap. 2.5.3.2). Bei dem folgenden Experiment wurde in einen Gelloader eine Fritte eingesetzt, welche mit einer POROS MC 20-Ethanol-Suspension ($30 \mu\text{l}$ einer $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ MC in EtOH) überschichtet wurde (genaue Vorschrift siehe Kap. 4.3.5). Das POROS MC 20-Material wurde mit Ga^{3+} -Ionen beladen

(essigsäure GaCl_3 -Lösung). Als Probe wurden $10 \mu\text{l}$ einer ebenfalls essigsäuren $6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ HSP-Lösung eingesetzt. Sowohl die Beladung der aktivierten Ga^{3+} -IMAC-Mikro-Tips als auch die Elution der nicht-phosphorylierten Peptide erfolgte unter essigsäuren Bedingungen. Nach der alkalischen Elution (pH 11, NH_4OH -Lösung) der Phosphopeptide wurden diese sofort im Vakuumkonzentrator getrocknet. Der Rückstand wurde in 0,1 % wässriger TFA aufgenommen, mit Hilfe eines RP-Mikro-Tips entsalzt und schließlich der CZE-Bestimmung zugeführt. Die Überprüfung der Effizienz der IMAC-Konzentration/RP-Entsalzung erfolgte anhand der HSP-Peakflächen, welche bei den CZE-Bestimmungen der IMAC/RP-gereinigten bzw. wässrigen Phosphopeptid-Lösung ermittelt wurden (Abb. 5.11).

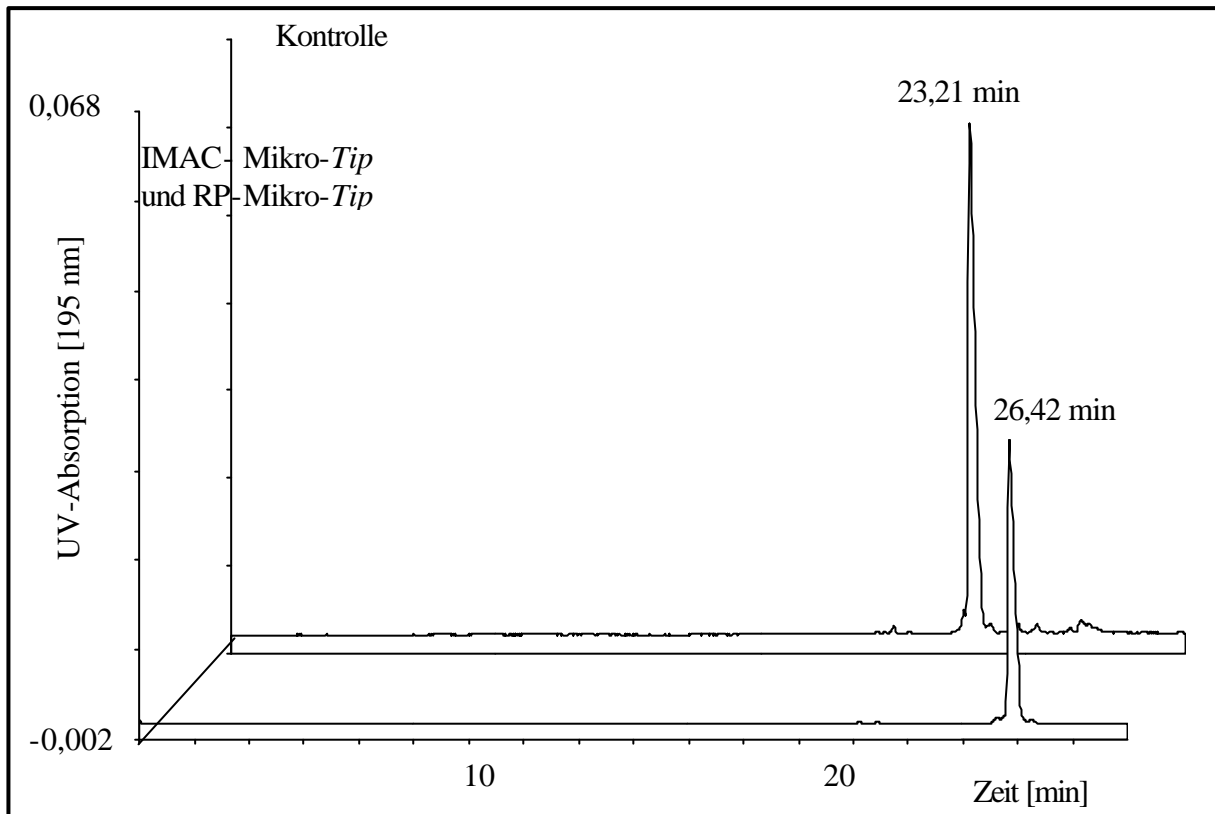


Abb. 5.11. CZE-Trennungen (Biofocus CE3000) der HSP-Lösungen ($6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in Wasser) mit und ohne IMAC/RP-Aufreinigung. Kontrollprobe: $1 \mu\text{l}$ wässrige HSP ($60 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), $2 \mu\text{l}$ ACN, $7 \mu\text{l}$ ddH₂O (HSP-Endkonzentration $6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Die zweite Probe wurde zunächst mit Hilfe der Mikro-IMAC-Tips aufkonzentriert und anschließend mit Hilfe der RP-Mikro-Tips entsalzt. Die Phosphopeptide wurden mit $3 \mu\text{l}$ wässriger 60 % ACN, 0,1 % TFA (v/v) eluiert. Das Eluat wurde für die CZE-Bestimmung mit $7 \mu\text{l}$ ddH₂O verdünnt. Bedingungen: Kapillare: nicht-beschichtete Quarzkapillare, $90 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ I.D.; CZE-Puffer: 50 mM Phosphatpuffer (pH 2,5); Spannung: 25 kV; Polarität: + ® -; Kapillartemperatur: 25°C; Injektion 30 psi x sec; Detektion: UV-Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 195 \text{ nm}$.

In den Kapillarzonenelktropherogrammen der HSP-Lösungen (theoretisch $6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), welche nach IMAC/RP-Mikro-Tip-Aufreinigung ($4 \mu\text{l}$ Säulenbettvolumen) bzw. ohne IMAC/RP-Mikro-Tip-Aufreinigung (Kontrolle) ermittelt wurden, sind deutlich die HSP-Signale bei den Migrationszeiten von 26,4 bzw. 23,2 min zu erkennen (Abb. 5.11). Nach der IMAC/RP-Aufreinigung war die Intensität des HSP-Signals im Vergleich zu der Kontrollprobe deutlich erniedrigt. Anhand der Peakflächen konnte eine Wiederfindungsrate von 57 % ermittelt werden.

5.3. NanoES-MS- und -MS/MS-basierende Identifizierung und Charakterisierung eines im Gel verdauten Proteins

Für die massenspektrometrische Identifizierung und Charakterisierung enzymatisch im Gel gespaltener Proteine stehen heutzutage zahlreiche lokale sowie über das Internet zugängliche computerunterstützte Rechenalgorithmen zur Verfügung (Kap. 2.4.7). Das folgende Kapitel beschäftigt sich deshalb mit der MS-Datenanalyse eines tryptisch im Gel gespaltenen Proteins. Für die Untersuchungen wurde die nicht phosphorylierte HIR-Kinasedomäne, ein 276 Aminosäuren umfassender Sequenzbereich (I984-F1259) innerhalb der HIR- β -UE, eingesetzt.

5.3.1. NanoES-MS- und -MS/MS-Analyse der tryptisch im Gel gespaltenen HIR-Kinasedomäne (Aminosäuren 984-1259)

Die HIR-Kinasedomäne wurde zunächst mit Hilfe der SDS-PAGE aufgereinigt. Anschließend wurde die CBB-gefärbte Bande ausgeschnitten, im Gel reduziert (DTT), alkyliert (4-Vinylpyridin) und tryptisch gespalten. Die extrahierten Peptide wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet und für die NanoES-MS-Analyse in wässriger 50 % Methanol, 0,1 % Ameisensäure (v/v) aufgenommen. Von der nicht entsalzten Peptidmischung wurde zunächst ein positiv-Ionen-NanoES-Massenspektrum aufgenommen (30 Scans, Q3 Scan im Bereich von 400-2000 m/z , Abb. 5.12). Aufgrund des hohen chemischen Untergrundes konnte nur ein stark verrauschtes Spektrum mit wenigen stabilen Peptidionensignalen im unteren m/z -Bereich ($< 750 m/z$) aufgenommen werden (Abb. 5.12). Das Peptid $G^{1157}LLPVR^{1162}$ konnte anhand seines einfach geladenen $[M+H]^+$ -Ions bei m/z 654,3 identifiziert werden. Ebenso wurde das Peptid $I^{984}TLLR^{988}$ anhand seines $[M+H]^+$ -Ions bei m/z 614,4 identifiziert. Zur Verringerung des chemischen Untergrundes bzw. zur Erhöhung des S/N-Verhältnisses wurde die Probe zunächst im Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend mit Hilfe eines RP-Mikro-Tips entsalzt (siehe Kap. 5.2).

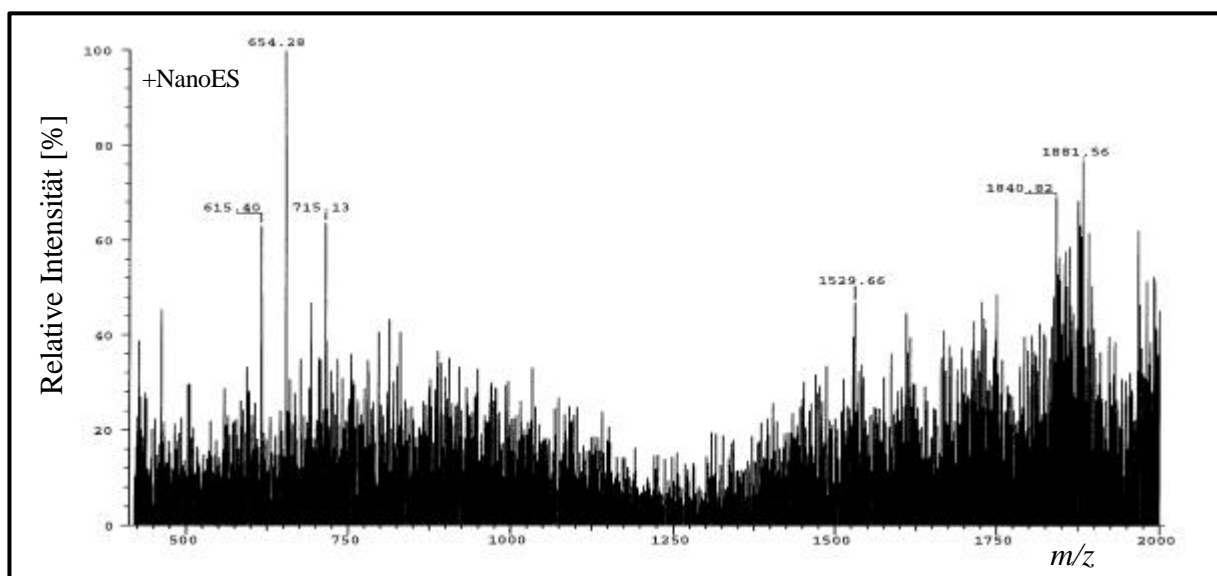


Abb. 5.12. Positiv-Ionen-NanoES-Massenspektrum (TSQ 700) eines tryptischen im Gel-Verdaus der HIR-Kinasedomäne (I984-F1259). Die Verdaulösung wurde nicht entsalzt. Für die MS-Bestimmung wurde der Speedvac-getrocknete Verdauextrakt in 10 μ l

Nanospraylösung (wässrige 50 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure (v/v)) gelöst. Bedingungen: NanoES-Spannung: -800 V; Q3-Scan im Bereich von 400-2000 m/z in 3 sec; 30 Scans.

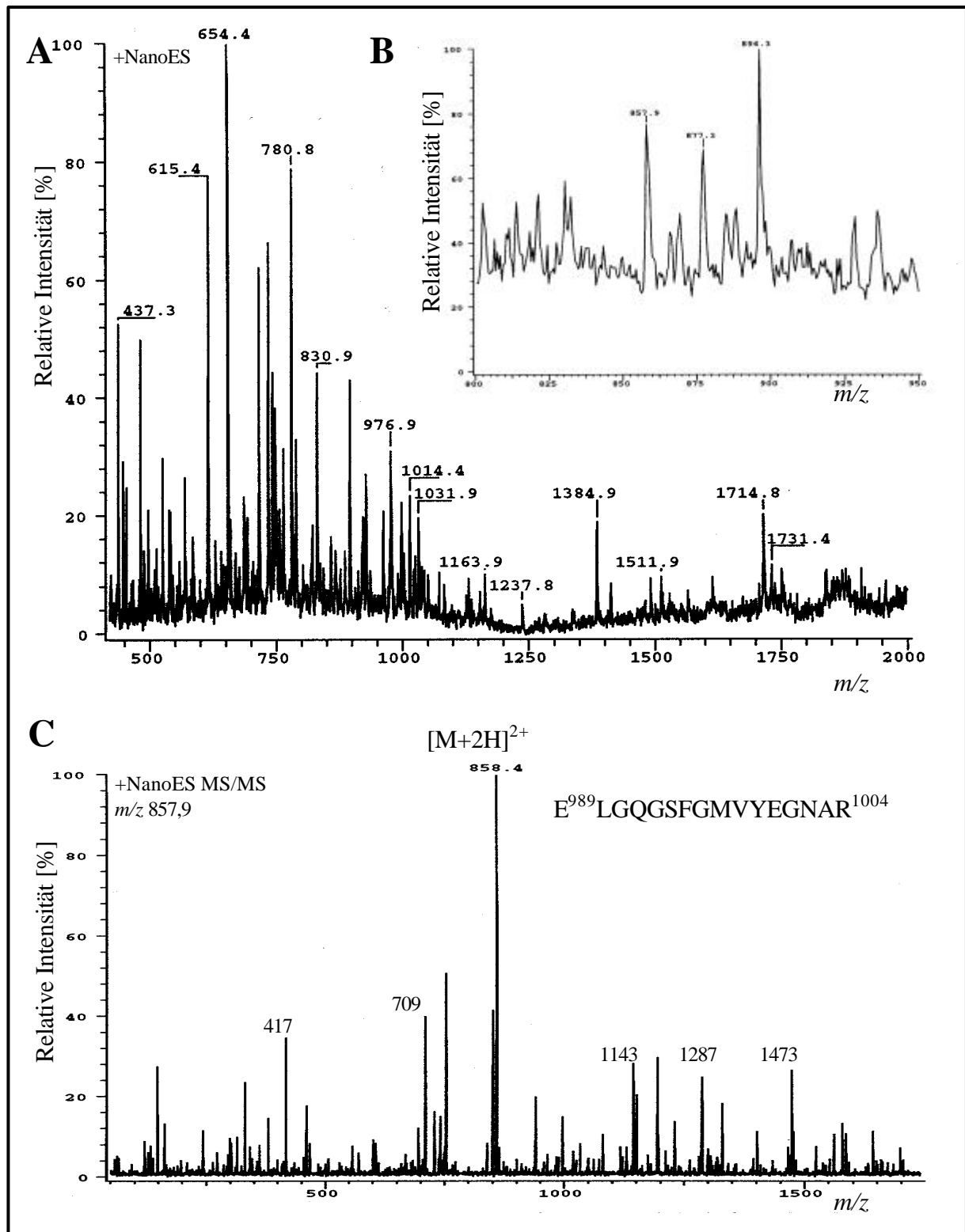


Abb. 5.13. Positiv-Ionen-NanoES-Massenspektren (TSQ 700) eines tryptischen im Gel-Verdaus der HIR-Kinasedomäne (I984-F1259). Die Verdaumischung wurde vor der MS-Bestimmung mit Hilfe eines RP-Mikro-Tips entsalzt. (A) NanoES-Übersichtsspektrum im Bereich von 400-2000 m/z. (B) NanoES-Zoom-Scan-Massenspektrum im Bereich von 800-950

m/z. (C) NanoES-MS/MS-Tandem-Massenspektrum des zweifach positiv geladenen $[M+2H]^{2+}$ -Molekülions bei *m/z* 857,9 ($E^{989}LGQGSFGMVYEGNAR^{1004}$). Bedingungen: NanoES-Spannung: -800 V; Übersichtsspektrum: Q1 Scan im Bereich von 400-2000 *m/z* in 3 sec (A) bzw. 800-950 *m/z* in 2 sec (B); 52 (A) bzw. 29 (B) Scans; MS/MS-Spektrum: $[M+2H]^{2+}$ bei *m/z* 857,9 selektiert in Q1; MS/MS in q2: CID-Offset: -24 V; Stossgasdruck: 2,6 mTorr (Argon); Q3 Scan im Bereich von 50-1600 *m/z* in 3 sec; 52 Scans. Sonstige Bedingungen siehe Abb. 5.12.

Durch die RP-Mikro-Tip-Entsalzung wurde der chemische Untergrund deutlich verringert und führte somit zu einem erheblich verbesserten S/N-Verhältnis der detektierten Peptidionen (Abb. 5.13.A). Im Vergleich zum NanoES-Massenspektrum der nicht entsalzten Peptidmischung (Abb. 5.12) erhöhte sich das S/N-Verhältnis des $[M+H]^+$ -Peptidions ($G^{1157}LLPVR^{1162}$) bei *m/z* 654,4 um das 10fache (Abb. 5.13.A). Das Protein sollte sowohl mit Hilfe eines Peptid-Mapping als auch einer Fragmentionenanalyse identifiziert werden. Das zweifach positiv geladene $[M+2H]^{2+}$ -Peptidion ($E^{989}LGQGSFGMVYEGNAR^{1004}$) bei *m/z* 857,9 wurde deshalb einem NanoES-MS/MS-Experiment unterzogen (Abb. 5.13.C). Im NanoES-Übersichtsspektrum ist ebenfalls das einfach positiv geladene Peptidion bei *m/z* 1714,8 zu sehen (Abb. 5.13.A). Vor dem CID-Experiment wurde zusätzlich ein NanoES-MS-Zoom-Scan-Spektrum im Bereich von *m/z* 800-950 aufgenommen (Abb. 5.13.B). Zur Aufnahme des Tochterionenspektrums wurde das $[M+2H]^{2+}$ -Peptidion bei *m/z* 857,9 in Q1 isoliert, unter CID-Bedingungen in q2 fragmentiert und die resultierenden Fragmentionen durch Q3-Scan detektiert (Abb. 5.13.C).

5.3.2. Auswertung der ermittelten Peptidmassen

Die Signale, welche bei dem positiv-Ionen-NanoES-MS-Experiment ermittelt wurden (Abb. 5.13.A), wurden zunächst manuell ausgewertet. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch Vergleich der experimentell ermittelten einfach geladenen Peptidionenmassen mit den 'in silico' (ProteinProspector) berechneten Peptidionenmassen. Die bei dem Experiment bestimmten Peptide deckten 80,1 % der Aminosäuresequenz der HIRKD ab (Tab. 5.2, Abb. 5.14). Für diese Art der Auswertung muss das Protein bzw. dessen Aminosäuresequenz bekannt sein. Das Auswerteverfahren kann somit nicht bei unbekanntem Proteinproben angewandt werden. Für eine Proteinidentifizierung mit Hilfe des Peptid-Mapping müssen die Peptidionenmassen (monoisotopisch oder average) zunächst aber ebenfalls ermittelt werden.

Tab. 5.2. Tabellarische Auflistung der Peptide der tryptisch im Gel verdauten HIR-Kinasedomäne (I984-F1259), welche mit Hilfe des positiv-Ionen-NanoES-MS-Experimentes. (Abb. 5.13.A) ermittelt wurden.

Pos. in KD ⁽¹⁾	$[M+H]^+$ _{m.i.} ⁽²⁾ best.	$[M+H]^+$ _{m.i.} ⁽³⁾ theor.	Dm ⁽⁴⁾	MC ⁽⁵⁾	Aminosäuresequenz
984-988	615,4 (+1)	615,4	0,0	0	ITLLR
989-1004	1714,8 (+1) 857,9 (+2)	1714,8	0,0	0	ELGQGSFGMVYEGNAR
1005-1008	487,3 (+1)	487,3	0,1	0	DIIK
1009-1018	662,3 (+1)	662,3	0,0	0	GEAETRVAVK
1019-1027	976,9 (+1) 488,8 (+2)	976,5	0,4	0	TVNESASLR
1030-1040	1281,9 (+1) 641,0 (+2)	1280,7	1,2	0	IEFLNEASVMK
1041-1049	580,8 (+2)	1160,6	0,0	0	GFTCHHVVR

Tab. 5.2. Fortsetzung.

1050-1056	715,8 (+1)	715,5	0,3	0	LLGVVSK
1057-1073	1838,8 (+1) 920,0 (+2) 613,6 (+3)	1839,0	0,2	0	GQPTLVVMEMLAHGDLK
1078-1114	4024,0 1342,0 (+3) 1006,8 (+4)	4024,0	0,0	0	SLRPEAENNPGRPPPTLQEMIQMAAEI ADGMAYLNAK
1120-1124	545,4 (+1)	545,3	0,1	0	DLAAR
1125-1135	686,3 (+2)	1369,6	2,0	0	NCMVAHDFTVK
1136-1143	896,9 (+1) 448,9 (+2)	896,4	0,5	0	IGDFGMTR
1144-1152	1237,8 (+1) 619,4 (+2)	1237,5	0,3	0	DIYETDYR
1157-1162	654,4 (+1)	654,4	0,0	0	GLLPVR
1163-1170	961,4 (+1) 481,4 (+2)	961,5	0,1	0	WMAPELTK
1209-1225	2062,8 1031,9 (+2)	2060,9	1,9	0	FVMDGGYLDQPDNCPER
1226-1231	734,4 (+1)	734,4	0,0	0	VTDLMR
1232-1239	1158,5 (+1)	1158,5	0,0	0	MCWQFNPK
1240-1252	1574,0 (+1) 787,5 (+2) 525,4 (+3)	1573,9	0,1	0	MRPTFLEIVNLLK
1253-1259	830,9 (+1)	830,4	0,5	0	VTDLMR

(7) Numerierung nach Ullrich et al. [546]

(8) monoisotopische Molekulargewichte der einfach protonierten Peptide

(9) MS-Digest 3.1.1, ProteinProspector 3.2.1 © Copyright (1995-1999) The Regents of the University of California; theoretisch errechnete Peptidmassen unter Verwendung folgender Eingaben:

Pyridylethyl-modifiziertes Cys; Protease Trypsin mit einer möglichen verpassten Schnittstelle

(10) *Dm*: Differenz zwischen bestimmten und theoretischen monoisotopischen Massen

(11) Missed Cleavage (Protease verpasst eine Schnittstelle)

984	994	1004	1014	1024
<u>ITLLRELGQG</u>	<u>SFGMVYEGNA</u>	<u>RDIKGEAET</u>	<u>RVAVKTVNES</u>	<u>ASLRERIEFL</u>
1034	1044	1054	1064	1074
<u>NEASVMKGFT</u>	<u>CHHVRLG</u>	<u>VSKGQPTLVV</u>	<u>MELMAHGDLK</u>	<u>SYLRSRLRPEA</u>
1084	1094	1104	1114	1124
<u>ENNPGRPPPT</u>	<u>LQEMIQMAAE</u>	<u>IADGMAYLNA</u>	<u>KKFVHRDLAA</u>	<u>RNCMVAHDFT</u>
1134	1144	1154	1164	1174
<u>VKIGDFGMTR</u>	<u>DIYETDYRK</u>	<u>GGKGLLPVRW</u>	<u>MAPESLKDGV</u>	<u>FTTSSDMWSF</u>
1184	1194	1204	1214	1224
<u>GVVLWEITSL</u>	<u>AEQPYQGLSN</u>	<u>EQVLKFVMDG</u>	<u>GYLDQPDNCP</u>	<u>ERVTDLMRMC</u>
1234	1244	1254		
<u>WQFNPKMRPT</u>	<u>FLEIVNLLKD</u>	<u>DLHPSF</u>		

Abb. 5.14. Abbildung der Sequenzabdeckung der HIR-Kinasedomäne, welche bei dem manuellen NanoES-Peptid-Mapping (Tab. 5.2) ermittelt werden konnte. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code mit Numerierung nach Ullrich et al. [546] abgebildet. Die ermittelten Sequenzabschnitte wurden unterstrichen.

5.3.3. Proteinidentifizierung mittels Peptid-Mapping

Für das Peptid-Mapping (Kap. 2.4.3) wurden zunächst die monoisotopischen Massen der $[M+H]^+$ -Peptidionen aus den ermittelten Ionensignalen des Massenspektrums (Abb. 5.13.A) berechnet und in Form einer Massenliste (Excel-Datei) abgespeichert. Die Peptidmassenliste wurde über das Internet mit Hilfe folgender Programme bzw. Server ausgewertet:

ProFound: <http://prowl.rockerfeller.edu/cgi-bin/ProFound>,

Mascot Search: <http://www.matrixscience.com/>,

PepIdent: <http://expasy.proteome.org.au/> und

MS-Fit: <http://prospector.ucsf.edu/>.

Die Suche erfolgte innerhalb der humanen Proteine, der auf dem jeweiligen Server bereitgestellten Protein-Datenbanken. Es wurde nur nach einem einzelnen Protein gesucht. Sonstige Bedingungen waren: Proteinmassen im Bereich zwischen 30-150 kDa, Trypsin als Protease; Cysteinreste S-pyridylethylt, maximal 2 verpasste Schnittstellen, monoisotopische Peptidmassen $[M+H]^+$, ± 2 Da Massentoleranz.

5.3.3.1. Vergleichende Übersicht der Resultate des Peptid-Mapping

Zur besseren Übersicht wurden die Resultate der Proteinidentifizierung in Tab. 5.3 zusammengefasst. Die im Gel verdaute Proteinbande konnte mit allen Proteinidentifizierungsprogrammen eindeutig als humaner Insulinrezeptor identifiziert werden. ProFound und Mascot Search ermöglichten eine noch spezifischere Identifizierung als HIR-Tyrosinkinasedomäne (Tab. 5.3). Mit PepIdent und MS-Fit konnte das Protein nicht so spezifisch identifiziert werden (HIR- β -UE bzw. der HIR). Im Vergleich zu ProFound und Mascot Search konnten bei der PepIdent- und MS-Fit-Analyse jedoch eine größere Anzahl von Peptiden bestimmt werden. Durch MS-Fit konnten 22 der insgesamt 25 eingetragenen Peptidmassen bestimmt werden, was einem Anteil von 88 % entspricht. Mit Hilfe von PepIdent und Mascot Search konnten 21 (84 %), mit ProFound lediglich 20 (80 %) Peptidmassen zugeordnet werden. Die hohe Anzahl der bei PepIdent und MS-Fit bestimmten Peptide erfolgte aufgrund falscher Zuordnungen, da die Peptidmassen innerhalb des gesamten Insulinrezeptors (156282 Da) bzw. der HIR- β -UE (69710 Da) gemappt wurden. Peptide, welche aus der Kinasedomäne stammen, wurden somit völlig falschen Proteinbereichen zugeordnet.

Tab. 5.3. Datenbank-unterstützte Proteinidentifizierung der mittels NanoES-MS untersuchten tryptisch im Gel verdauten HIR-Kinasedomäne (Abb. 5.13.A). Es wurden jeweils die ersten 3 Treffer des auf dem angegebenen Server durchgeführten Peptid-Mappings aufgelistet. Für die Identifizierung wurden 25 der ermittelten Peptidmassen ($[M+H]^+$ berechnet aus den jeweiligen Moleküllionen) verwendet. Bedingungen: Trypsin als Enzym; feste Modifikationen: Cysteinreste S-pyridylethylt; variable Modifikationen: Methioninreste oxidiert; Peptidmassen: monoisotopisch als $[M+H]^+$; Massentoleranz: ± 2 Da; maximale Anzahl verpasster Spaltstellen: 2.

ProFound (prowl):

Rang	Wahrscheinlichkeit	Eintragsnummer ^(a)	Beschreibung	M _w [Da]
1	9,8 x 10 ⁻¹	gi999510	Insulin Receptor (Tyrosine Kinase Domäne)	35000
2	2,1 x 10 ⁻²	gi2780855	A Chain A, Phosphorylated Insulin Receptor Tyrosine Kinase	35000
3	9,2 x 10 ⁻¹¹	gi3236452	embryonic ectoderm development protein	58000

Tab. 5.3. Fortsetzung.

Mascot Search (Matrixscience):

Rang	Mowse-Score	Eintragsnummer ^(b)	Beschreibung	M _w [Da]
1	137	NRL 1IR3A	insulin receptor tyrosine kinase domaine	34650
2	61	JC4577	transcription elongation factor T1-human	34735
3	54	INSR_HUMAN	INSULIN RECEPTOR PRECUSOR	161118

PepIdent (ExPasy):

Rang	Score	Eintragsnummer ^(c)	Beschreibung	Peptid-treffer	M _w [Da]
1	0,84	P06213	CHAIN2: INSULIN RECEPTOR, BETA-SUBUNIT	21	69710
2	0,56	P17252	PROTEIN KINASE C, ALPHA TYPE	14	76764
3	0,52	Q03924	ZINC FINGER PROTEIN 117	13	68493

Ms-Fit (Prospector):

Rang	getroffene Massen [%]	Eintragsnummer ^(d)	Beschreibung	Peptid-treffer	M _w [Da]
1	88	P06213	INSULIN RECEPTOR PRECURSOR	22	156282
1	88	A37348	insulin receptor precursor	22	156320
1	88	A18657		22	156796

^(a) NCBIInr (10/13/200). *Homo sapiens*.

^(b) OWL 31.4. *Homo sapeins* (26988 sequences).

^(c) SWISS-PROT 39.7. *Homo sapeins*.

^(d) OWL *Homo Sapiens*.

5.3.3.2. Die ProFound-Identifizierung

Mit Ausnahme von MS-Fit wurde bei allen Identifizierungsprogrammen ein *Score* ermittelt, welcher eine qualitative Abschätzung der Korrektheit des Resultates ermöglicht. Die Berechnung der *Scores* erfolgt auf der Basis der Wahrscheinlichkeitstheorie. Bei der ProFound-Analyse erhält man zusätzliche Informationen anhand derer die Korrektheit der Identifizierung sehr genau überprüft werden kann. Die ProFound-Identifizierung wurde aus diesem Grund genauer betrachtet.

ProFound ist ein Programm zur schnellen Proteinidentifizierung, welches über das Internet (<http://prowl.rockefeller.edu/>) zugänglich ist [547]. Bei der Identifizierung werden die experimentell ermittelten Peptidmassen eines proteolytisch gespaltenen Proteins mit den theoretisch berechneten Peptidmassen *in silico* verdauter Proteinsequenzen der OWL-Proteindatenbank verglichen. Für die statistische Gewichtung der aufgelisteten identifizierten Proteinkandidaten wird der Algorithmus von Bayes herangezogen [548]. Dabei werden die individuellen Eigenschaften eines Proteins in der Datenbank sowie weitere, für das Experiment wichtige Informationen, berücksichtigt. Mit Hilfe der Bayes'schen Wahrscheinlichkeitstheorie kann somit die Identität eines unbekanntes Proteins innerhalb einer Proteindatenbank logisch abgeschätzt werden. Bei der Ableitung werden folgende Annahmen gemacht:

1. das zu analysierende Protein existiert in der Datenbank,
2. alle detektierten Ionen sind Verdauprodukte des Proteins,
3. erfolgt ein Treffer, so wird das ermittelte Peptid als theoretisches Peptid berücksichtigt.

Die Wahrscheinlichkeit für jede Annahme *k* wird durch den folgenden Algorithmus (beruhend auf Bayes-Theorem) wiedergegeben:

$$P(k \setminus DI) \propto P(k \setminus I) \frac{(N-r)!}{N!} \prod_{i=1}^r \left\{ \sqrt{\frac{2}{p}} \frac{m_{\max} - m_{\min}}{s_i} \times \sum_{j=1}^{g_i} \exp \left[-\frac{(m_i - m_{j0})^2}{2s^2} \right] \right\} F_{\text{pattern}} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

mit der Normalisierungsbedingung

$$\sum_{k \in \text{Datenbank}} P(k \setminus DI) = 1 \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Die Einstufung der identifizierten Proteinkandidaten erfolgt entsprechend den ermittelten Wahrscheinlichkeitswerten $P(k \setminus DI)$ (Gl. 5.1), mit

- k: Hypothese, dass es sich bei Protein k um das zu analysierende Protein handelt, wobei das Protein k einen Eintrag in der Proteindatenbank darstellt
- D: experimentelle Daten
- I: verfügbare Zusatzinformation (z.B. die Gattung bzw. Abstammung des Proteins, ungefähres Molekulargewicht des Proteins, Massengenauigkeit der ermittelten Peptidmassen, enzymatische Spaltungsbedingungen usw.)
- $P(k \setminus I)$: Wahrscheinlichkeit für die Annahme k, bei ausschließlicher Verwendung der Zusatzinformation I
- N: theoretische Anzahl der Peptide, welche bei der Spaltung des Proteins k mit einer gegebenen Protease resultieren
- r: Anzahl der Treffer
- σ_i : bei der Masse m_i beobachtete Standardabweichung der Massenbestimmung
- F_{pattern} : empirischer Term
- m_i (m_{j0}): ermittelte Masse des i-ten (j-ten) Treffers, mit Multiplizität g
- $(m_{\max} - m_{\min})$: Bereich der ermittelten Peptidmassen.

Mit zunehmender Anzahl der Treffer r, zunehmender Massengenauigkeit ($m_{\max} - m_{\min}$) und abnehmender Anzahl der theoretischen Verdaufragmente N nimmt für ein gegebenes Protein k, welches in der Datenbank enthalten ist, die Wahrscheinlichkeit somit zu, dass es sich bei Protein k um das zu analysierende Protein handelt.

Betrachtung der ermittelten Kandidaten

Bei der ProFound-Identifizierung erhält man zunächst eine Liste identifizierter Proteinkandidaten. Die Kandidaten sind entsprechend ihren berechneten normalisierten Wahrscheinlichkeiten aufgeführt (Abb. 5.15.A). Im vorliegenden Experiment handelt es sich bei den beiden zuerst aufgeführten Proteinen um die HIR-Kinasedomäne, wobei der zweite Kandidat die phosphorylierte Form darstellt (Autophosphorylierungsstellen Y1146/50/51 sind phosphoryliert). Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass es sich bei dem identifizierten Protein um den ersten Kandidaten handelt, beträgt $9,8 \cdot 10^{-1}$, für den zweiten Kandidaten lediglich $2,1 \cdot 10^{-2}$. Somit handelt es sich bei dem identifizierten Protein mit einer 47fach höheren Wahrscheinlichkeit um die nicht-phosphorylierte Form der HIR-Kinasedomäne. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass es sich bei dem identifizierten Protein um den dritten Kandidaten handelt, beträgt lediglich $9,2 \cdot 10^{-11}$. Gegenüber diesem Protein ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass es sich um die nicht-phosphorylierte Form der HIR-Kinasedomäne handelt etwa $1 \cdot 10^{10}$ größer. Zur vergleichenden Übersicht wurden die

berechneten Wahrscheinlichkeiten (Absolutwerte) der ersten 10 aufgelisteten Kandidaten in Abb. 5.15.B zusätzlich graphisch dargestellt.

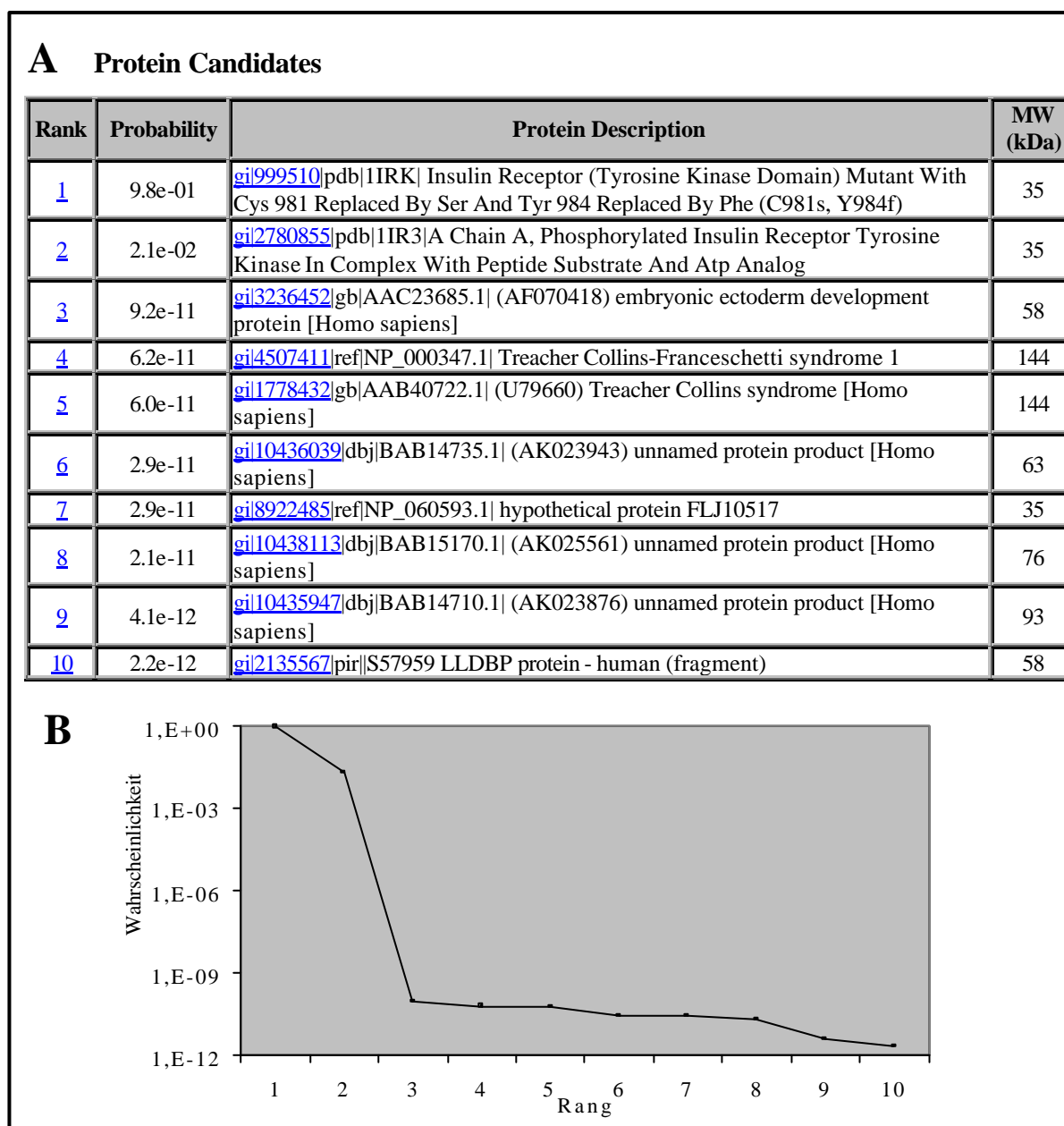


Abb. 5.15. Ergebnisse der ProFound-Identifizierung der mittels NanoES-MS untersuchten tryptisch im Gel verdauten HIR-Kinasedomäne (Abb. 5.13.A). (A) Auflistung der identifizierten Proteinkandidaten. (B) Graphische Darstellung der berechneten normalisierten Wahrscheinlichkeiten der ersten 10 Proteinkandidaten.

Zusätzliche ProFound-Resultate

Bei der ProFound-Identifizierung erhält man zusätzliche Informationen, anhand derer die Korrektheit des Resultates überprüft werden kann. Für die einzelnen Proteinkandidaten erhält man eine graphische Darstellung der Proteinsequenz, welche von den ermittelten Peptiden

abgedeckt wird (Abb. 5.16.A und B, linke und mittlere Diagramme). Des weiteren erhält man eine Peptidmassen-Fehlerkartierung (Abb. 5.16.A und B, rechte Diagramme). Bei 'bona fide' Identifizierungen können sehr häufig benachbarte Peptide innerhalb eines Sequenzbereiches und Peptide mit identischen Enden und/oder Überlappungen beobachtet werden. Bei dem am höchsten aufgelisteten Proteinkandidaten zeigt die Proteinsequenzabdeckung (Abb. 5.16.A, mittleres Diagramm), dass mehrere überlappende Peptide innerhalb zusammenhängender Sequenzbereiche ermittelt werden konnten. Von den ermittelten Peptiden konnten insgesamt 13 den 20 theoretisch berechneten tryptischen Peptiden des Proteins [gi|999510](#) zugeordnet werden. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von 43 %. Im Vergleich dazu konnten bei dem dritten Proteinkandidaten ([gi|3236452](#), Abb. 5.16.B, mittleres Diagramm) nur 12 der 20 theoretischen Peptide zugeordnet werden. Die Sequenzabdeckung betrug dementsprechend nur 33 %. Zudem konnten nur sehr wenig Peptide mit überlappenden bzw. benachbarten Sequenzbereichen beobachtet werden.

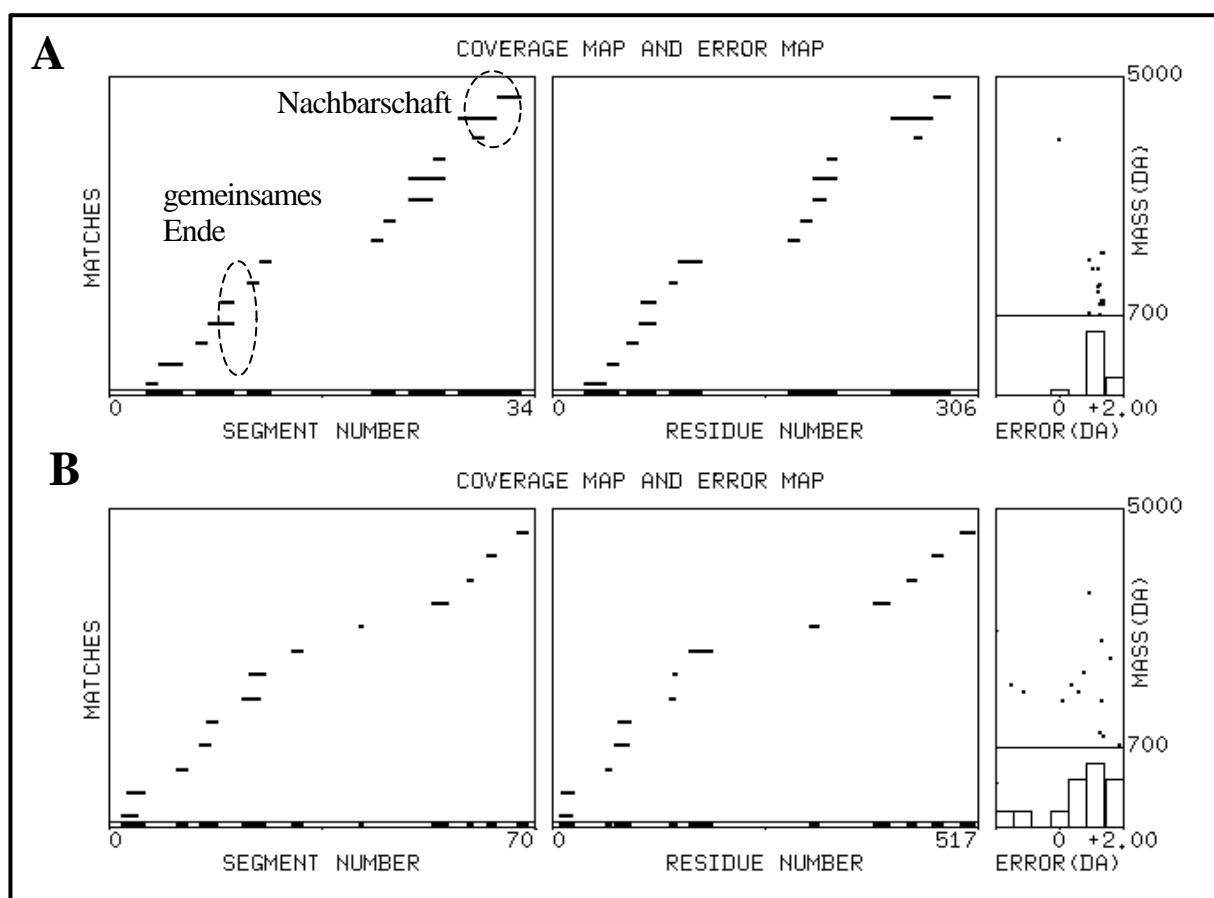


Abb. 5.16. Graphische Darstellung der detaillierten ProFound-Auswertung der mittels NanoES-MS untersuchten tryptisch im Gel verdauten HIR-Kinasedomäne (Abb. 5.13.A). Erster ([gi|999510](#)|[pdb|1IRK](#)|Insulin Receptor, Tyrosine Kinase Domain) (A) und dritter ([gi|3236452](#)|[gb|AAC23685.1](#)| (AF070418) embryonic ectoderm development protein [Homo sapiens]) (B) Proteinkandidat aus Abb. 5.15. Die linken bzw. mittleren Diagramme geben die Proteinsequenzabdeckung der beiden Kandidaten wieder. Die Diagramme auf der rechten Seite geben die Fehler für die ermittelten Peptidmassen graphisch wieder. Die Proteinsequenzabdeckung betrug beim ersten Kandidaten 43 % und beim dritten Kandidaten 33 %.

Die Überprüfung der Korrektheit der Proteinidentifizierung kann auch anhand der Abweichung zwischen den bestimmten und den berechneten Peptidmassen erfolgen. In der Fehlerkartierung (Abb. 5.16.A und B, rechte Diagramme) ist die Fehlerverteilung der bestimmten Peptidmassen (Differenz zwischen ermittelten und berechneten Massen) als Punktmuster wiedergegeben. Bei korrekter spektrometrischer Kalibrierung (keine systematischen Fehlern) liegen die Fehler der gemappten Peptide normalerweise unabhängig vom Massenwert um den 0-Wert verteilt. Somit können systematische Fehler, welche bei der Peptidmassenbestimmung auftreten, rasch erkannt werden. Beim ersten Proteinkandidaten lagen die Fehler nahezu aller bestimmten Peptide innerhalb eines sehr engen Bereiches (+ 2 Da, Abb. 5.16.A rechtes Diagramm). Das MS-Gerät war somit zwar über den gesamten m/z -Bereich um etwa 1,0 Da zu hoch kalibriert, das Verteilungsmuster der Fehler ließ jedoch klar erkennen, dass es sich bei dem untersuchten Protein um den ersten Kandidaten handelte. Im Vergleich dazu konnte beim dritten Kandidaten nur eine unsystematische Verteilung der ermittelten Fehler beobachtet werden (Abb. 5.16.B rechtes Diagramm). Unter den Fehlerdiagrammen sind zusätzlich die Projektionen der Punktmuster in Form von Histogrammen abgebildet. Die peakförmige Fehlerverteilung beim ersten Kandidaten ließ deutlich erkennen, dass das Protein korrekt identifiziert wurde (rechter unterer Teil von Abb. 5.16.A). Beim dritten Kandidaten konnte aufgrund der einheitlichen Verteilung der Massenfehler eindeutig geschlossen werden, dass die Identifizierung falsch war (rechter unterer Teil von Abb. 5.16.B). ProFound ermöglichte somit eine äußerst zuverlässige Proteinidentifizierung, welche sich insbesondere auf den Vergleich der berechneten Wahrscheinlichkeiten und der Segment- bzw. Massenfehlerdiagramme stützte.

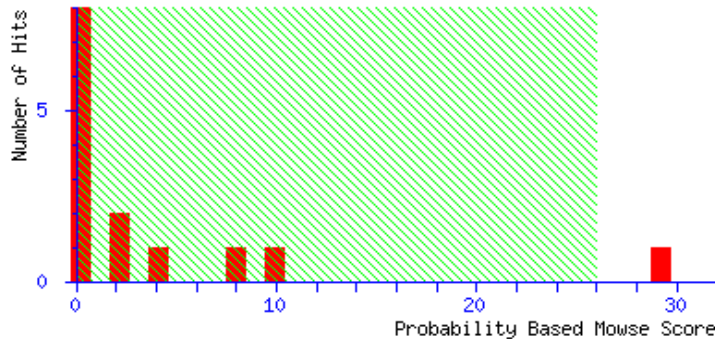
5.3.4. Proteinidentifizierung mittels Fragmentionendaten

Das Tandem-Massenspektrum eines Peptidions (Kap. 2.4.4) enthält ein für eine gegebene Sequenz völlig einzigartiges Fragmentionemuster (*fingerprint* der Aminosäuresequenz). Durch die Korrelation zwischen dem ermittelten MS/MS-Spektrum und der zu erwartenden Fragmentionen, aller mit der Masse des untersuchten Peptids isobaren Aminosäuresequenzen, kann der Grad der Übereinstimmung zwischen dem gemessenen und den errechneten MS/MS-Spektren berechnet werden. Dieses Prinzip liegt sowohl dem von Yates *et al.* entwickelten computerunterstützten Auswertalgorithmus SEQUEST [164,206,247] (siehe Kap. 4.3.10.9) als auch MS/MS Ion Search (Mascot: <http://www.matrixscience.com>) zugrunde. Bei dem NanoES-MS/MS-Experiment (Abb. 5.13.C) wurde das $[M+2H]^{2+}$ -Peptidion ($E^{989}LGQGSFGMVYEGNAR^{1004}$) bei m/z 857,9 sequenziert. Das Ion wurde in Q1 isoliert und unter CID-Bedingungen (-24 V *Offset* entspricht somit 48 eV) in q2 fragmentiert. Das Tochterionenspektrum wurde durch Q3-Scan (m/z 50-1600) aufgenommen. Für die SEQUEST- bzw. Mascot-Identifizierung wurde das Rohdaten-File (*.dat) vorprozessiert und in ein *.dta-File (ASCII-Format) umgewandelt. Mit Hilfe von SEQUEST wurde das *.dta-File anschließend auf einer lokalen DEC-Station ausgewertet. Bei der Identifizierung wurden alle Proteine der OWL-Datenbank 31.4 (312942 Sequenzen, 100800059 Reste) durchsucht. Zudem wurde berücksichtigt, dass S-, T- und Y-Reste phosphoryliert sein können. Mit Hilfe von MS/MS Ion Search wurde das *.dta-File zusätzlich über das Internet ausgewertet. Die Identifizierung erfolgte dabei innerhalb der humanen Proteine (26988 Sequenzen) der OWL-Datenbank 31.4.

5.3.4.1. Das Resultat der Mascot-Identifizierung

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 26 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).



Peptide Summary Report

1. [INSR_HUMAN](#) Mass: 156180 Total score: 29 Peptides matched: 1
 INSULIN RECEPTOR PRECURSOR (EC 2.7.1.112) (IR). - HOMO SAPIENS...
 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Rank Peptide
1 857.90 1713.79 1713.78 0.01 0 29 1 **ELGQGSFGMVYEGNAR**

Proteins matching the same set of peptides:

[INHUR](#) Mass: 156218 Total score: 29 Peptides matched: 1
 insulin receptor precursor - human
[A18657](#) Mass: 156695 Total score: 29 Peptides matched: 1
 A18657 NID: g512461 - human.
[HSIRPR](#) Mass: 155018 Total score: 29 Peptides matched: 1
 HSIRPR NID: g33972 - human.
[NRL_1IR3A](#) Mass: 34230 Total score: 29 Peptides matched: 1
 insulin receptor tyrosine kinase domain (EC 2.7.1.112) mutant...

Abb. 5.17. Mascot-Identifizierung der tryptisch im Gel verdauten HIR-Kinasedomäne mittels positiv-Ionen-NanoES-MS/MS auf m/z 857,9 ($[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion des Peptids $E^{989}LGQGSFG-MVYEGNAR^{1004}$). Der obere Teil der Abbildung gibt die ermittelten Scores der einzelnen Kandidaten graphisch wieder. Für den ersten Kandidaten ([INSR_HUMAN](#): INSULIN RECEPTOR PRECURSOR (EC 2.7.1.112) (IR).-HOMO SAPIENS) wurde ein signifikanter Score von 29 ermittelt. Im unteren Teil der Abbildung ist die Identität des ersten Kandidaten sowie die ermittelte Sequenz des analysierten Peptids ($E^{989}LGYSFGMVYEGNAR^{1004}$) abgebildet. Die Proteine, welche das ermittelte Peptid enthalten, sind ebenfalls aufgelistet. Die HIR-Kinasedomäne wurde ebenfalls aufgeführt (unterste Zeile). Bedingungen: Trypsin als Enzym; Cysteinreste S-pyridylethylt; monoisotopisch Massen; unbegrenzte Proteinmasse; Peptidmassentoleranz: $\pm 0,2$ Da; Fragmentionentoleranz: ± 1 Da; maximal eine verpasste Schnittstelle; Daten-File: alex05.0001.0001.2.dta; Datenbank: OWL 31.4 (312942 Proteinsequenzen); Gattung: homo sapiens (26988 Proteinsequenzen).

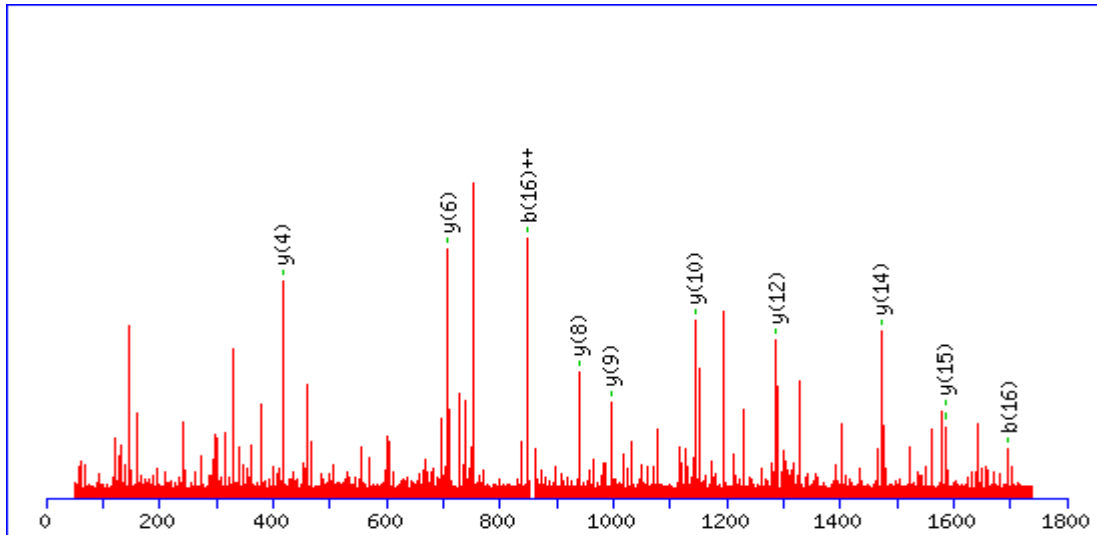


Abb. 5.18. Resultat der Mascot-Identifizierung der tryptisch im Gel verdauten HIR-Kinasedomäne. Graphische Darstellung des Tandem-Massenspektrums (m/z 857,9 $[M+2H]^{2+}$, $E^{989}LGYSFGMVYEGNAR^{1004}$), welches über das Internet als *.dta-File (ASCII-Format) auf dem Mascot-Server ausgewertet wurde. Das Spektrum zeigt die Zuordnung der identifizierten Fragmentationen des ersten Proteinkandidaten ([INSR HUMAN](#): INSULIN RECEPTOR PRECURSOR (EC 2.7.1.112) (IR).-HOMO SAPIENS). Von den 135 theoretisch berechneten Fragmentationen stimmten 12 mit denen des aufgenommenen Spektrums überein. Es traten hauptsächlich Fragmentationen des y- und b-Typs auf. Bedingungen siehe Abb. 5.13.

5.3.4.2. Das Resultat der SEQUEST-Identifizierung

ab16_6_05.0001.0052.2.out

SEQUEST v.C1, Copyright 1993-97

Molecular Biotechnology, Univ. of Washington, J.Eng/J.Yates

Licensed to Finnigan Corp., A Division of ThermoQuest Corp.

10/30/00, 01:48 PM, 2 min. on icis2.medukl.medizin.uni-tuebingen.de

mass=1714.8(+2), fragment_tol=1.00, mass_tol=0.20, MONO

amino acids = 100800059, # proteins = 312942, # matched peptides = 37151

immonium (HFYWM) = (01000), total_inten=7245.6, lowest_Sp=247.3

ion series nA nB nY ABCDVWXYZ: 0 1 1 0.3 1.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 0.0

rho=0.200, beta=0.075, top 10, /usr/users/finnigan/database/owl.fasta

(STY* +79.90) C=208.01 Enzyme:Trypsin

#	Rank/Sp	(M+H)+	Cn	deltCn	C*10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1 / 1	1714.8	1.0000	0.0000	2.2831	902.1	22/45	owl P06213 INSR +5	(R)ELGQGSFGMVYEGNAR
								owl A37348 INHUR insulin receptor precursor - human	
								owl AF102858 AF102858 AF102858 NID: g3885983 - pig.	
								owl A18657 A18657 A18657 NID: g512461 - human.	
								owl X02160 HSIRPR HSIRPR NID: g33972 - human.	
								owl NRL_1IR3A insulin receptor tyrosine kinase domain	
2.	2 /177	1714.7	0.7406	0.2594	1.6909	315.7	17/39	owl Z71786 TGM1	(R)QNSNHATRHEILS*K
3.	3 /247	1714.9	0.7089	0.2911	1.6185	291.9	16/42	owl AF021936 AF	(R)LEDAVAEASKERKLR
1.								owl P06213 INSR_HUMAN INSULIN RECEPTOR PRECURSOR (EC 2.7.1.112) (IR).	
								- HOMO SAPIENS...	
2.								owl Z71786 TGMIC1 TGMIC1 NID: g2062141 - Toxoplasma gondii.	
3.								owl AF021936 AF021936 AF021936 NID: g2736152 - Norway rat.	

Abb. 5.19. SEQUEST-Identifizierung der tryptisch im Gel verdauten HIR-Kinasedomäne mittels positiv-Ionen-NanoES-MS/MS auf m/z 857,9 ($[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion des Peptids

$E^{989}LGQGSFGMVYEGNAR^{1004}$). Im oberen Teil der Abbildung sind die Suchparameter abgebildet. Im mittleren Teil sind die identifizierten Kandidaten einschließlich der ermittelten Scores und Sequenzen tabellarisch aufgelistet. Bei dem sequenzierten Peptid handelt es sich um $E^{989}LGYSFGMVYEGNAR^{1004}$ (owl||NRL_1IR3A insulin receptor tyrosine kinase domain). Für den ersten Kandidaten wurden folgende Werte berechnet : Sp 902,1; $C \cdot 10^4$ 2,2831; ΔC_n zwischen 1. und 2. Kandidaten 0,2594. Im unteren Teil der Abbildung sind zusätzlich die identifizierten α -, β - und γ -Typ-Fragmentionen aufgeführt. Von den ermittelten Fragmentionen konnten 18 den 30 theoretisch berechneten einfach geladenen β - und γ -Typ Ionen zugeordnet werden. Bedingungen: Trypsin als Enzym; monoisotopische Massen; unbegrenzte Proteinmasse; Peptidmassentoleranz: $\pm 0,2$ Da; Fragmentionentoleranz: ± 1 Da; Cysteinreste S-pyridylethylirt; Variable Modifikation: Tyrosinreste phosphoryliert; Datenbank: OWL 31.4 (312942 Proteinsequenzen).

Das untersuchte Protein konnte sowohl mit MS/MS Ion Search als auch mit SEQUEST, basierend auf dem ermittelten NanoES-MS/MS-Tochterionenspektrum, eindeutig identifiziert werden. Bei MS/MS Ion Search wurde das Protein mit einem signifikanten Score von 29 als humaner Insulinrezeptor ([INSR HUMAN](#): INSULIN RECEPTOR PRECURSOR (EC 2.7.1.112) (IR).-HOMO SAPIENS) bzw. dessen Kinasedomäne innerhalb der humanen OWL-Proteindatenbank identifiziert (Abb. 5.17). Die Analyse enthielt neben den aufgelisteten Proteinkandidaten zudem eine graphische Darstellung des Tochterionenspektrums ($[M+2H]^{2+}$ -Ion bei m/z 857,9, $E^{989}LGYSFGMVYEGNAR^{1004}$) mit den zugeordneten identifizierten Fragmentionen (Abb. 5.18). Von den 24 intensivsten Signalen des ermittelten Tandem-Massenspektrums stimmten 12 mit den theoretisch berechneten Fragmentionen überein. Es traten überwiegend γ - und β -Typ-Fragmentionen auf. Im Vergleich zur Mascot-Identifizierung erfolgte die SEQUEST-Identifizierung unter Einbeziehung aller in der OWL-Datenbank enthaltenen Proteine (11,5 mal mehr Proteinsequenzen). Zudem wurde berücksichtigt, dass S-, T- und Y-Reste phosphoryliert sein können. Aufgrund der eingetragenen Massentoleranz ($\pm 0,2$ Da) wurden 37151 isobare Peptide ermittelt. Bei der SEQUEST-Identifizierung erhält man als Resultat eine Reihe von Proteinkandidaten, welche entsprechend ihren berechneten Sp- und C_n -Werten aufgelistet sind (Abb. 5.19). Das untersuchte Protein konnte als humaner Insulinrezeptor bzw. dessen Tyrosinkinasedomäne (owl||NRL_1IR3A insulin receptor tyrosine kinase domain) identifiziert werden. Für die Korrektheit der Identifizierung spricht sowohl der Sp-Wert von 902,1 (Rang 1 der *preliminary search*) als auch der $C \cdot 10^4$ (X_{corr})-Wert von 2,2831 (ebenfalls Rang 1). Zudem beträgt der ermittelte ΔC_n -Wert zwischen dem 1. und 2. Kandidaten 0,2594 (Abb. 5.19). Für eine eindeutige Unterscheidung zwischen richtigen und falschen Treffern sollte nach Eng *et al.* der X_{corr} -Wert $> 2,0$ sein [164,179,541]. Ein hoher ΔC_n -Wert (generell $> 0,1$) steht für eine gute Korrelation zwischen dem ermittelten MS/MS-Spektrum und der Sequenz des aufgelisteten Kandidaten [179,542]. Da der ΔC_n -Wert von der Größe der zu durchsuchenden Datenbank abhängt, erhöht sich mit zunehmender Anzahl der Datenbankeinträge auch die Signifikanz der Bestimmung. Gegenüber Mascot konnten bei SEQUEST deutlich mehr Fragmentionen (22 von 45) zugeordnet werden (Abb. 5.19 unterer Teil). Von den 30 theoretisch berechneten einfach geladenen β - und γ -Fragmentionen des Peptids konnten 18 den entsprechenden Fragmentionen-Signalen im MS/MS-Spektrum zugeordnet werden. Es wurde eine fast vollständige Serie von γ -Ionen erhalten. Für die Identifizierung des Proteins war lediglich die Information eines einzigen Peptids notwendig. Eine spezifischere Identifizierung des Proteins, wie beim Peptid-Mapping (Kap. 5.3.3.1), konnte nicht erfolgen. Deshalb wurden alle Varianten des humanen Insulinrezeptors, welche in den Datenbanken enthalten waren, gleichwertig aufgelistet.

5.4. Analyse von Phosphopeptiden mittels Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechnik

Mit Hilfe der Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken (Kap. 2.2.5.4 und 2.2.5.5) können bei einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Kap. 2.2.3) die Molekulargewichte modifizierter Peptide indirekt ermittelt werden. Unter CID-Bedingungen (Kap. 2.2.5.1) können die C-O-P-Phosphoesterbindungen phosphorylierter Peptidionen in der Kollisionszelle fragmentiert werden (Kap. 2.2.4). Im positiven als auch im negativen Ionenmodus erfolgt dabei hauptsächlich ein Neutralverlust von H_3PO_4 (98 Da) und HPO_3 (80 Da). Im negativen Ionenmodus bilden sich aufgrund der Spaltung der C-O- bzw. P-O-Phosphoesterbindungen zudem $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Ionen bei m/z 79 bzw. m/z 97 (Kap. 2.5.3.3.1) [320,321,346].

Bei relativ niedrigen Kollisions-Anregungspotentialen erleiden Phosphopeptidionen im positiven Ionenmodus bevorzugt einen Neutralverlust von H_3PO_4 (98 Da) [169,346,347,363]. Infolge der β -Eliminierung der Phosphatgruppe bildet sich aus einem Phosphoserinrest ein Dehydroalaninrest, aus Phosphothreonin entsteht Dehydroamino-2-buttersäure [348]. Der für die β -Eliminierung erforderliche energetisch bevorzugte, 6-fach cyclische Übergangszustand kann sich im Falle des Phosphotyrosins aufgrund des vorhandenen aromatischen Rings nicht ausbilden. Dennoch tritt auch beim Phosphotyrosin ein Neutralverlust von 98 Da auf, wahrscheinlich durch einen aufeinanderfolgenden Neutralverlust von HPO_3 (80 Da) und H_2O (18 Da) [169,225,348]. Mit Hilfe der Neutralverlust-Scantechnik (Kap. 2.5.3.3.3) können Phosphopeptide somit in komplexen Peptidmischungen anhand der $[\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4+z\text{H}]^{z+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen im Abstand von $98/z$ Th zum nicht-fragmentierten Phosphopeptidion detektiert werden. Die *off-line*-NanoES-MS ist besonders gut für die Neutralverlust-Scantechnik geeignet. Durch die Akkumulation vieler Spektren (ca. 20-200 Scans) kann ein hohes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis erreicht werden. Zudem können mit der *off-line*-NanoES-MS [103,104] nicht aufgetrennte Verdaumischungen analysiert werden [312,317,333,347]. Im negativen Ionenmodus können phosphorylierte Peptide mit Hilfe der Vorläuferionen-Analyse detektiert werden (Kap. 2.5.3.3.4). Beim q2-CID bilden Phosphopeptidionen $[\text{PO}_3]^-$ - bzw. $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Markerionen (m/z 79 bzw. m/z 97), anhand derer diese indirekt detektiert werden können. Der $[\text{PO}_3]^-$ - bzw. $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationenbildung liegt keine Vorläufer-Produktions-Beziehung zugrunde. Im Vergleich zur Neutralverlustreaktion bilden sich diese Ionen erst bei deutlich höheren CID-*Offset*-Werten. Man nimmt deshalb an, dass eine direkte Bindungsspaltungsreaktion stattfindet [346]. Mit Hilfe der NanoES-MS-Vorläuferionen-Analyse auf $[\text{PO}_3]^-$ (m/z 79) können Phosphopeptide ebenso wie bei der Neutralverlust-Analyse sehr empfindlich in nicht aufgetrennten Verdaumischungen detektiert werden [235,332,334,370]. Durch Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung konnten die Phosphopeptide von enzymatisch im Gel gespaltenen Modell-Phosphoproteinen (subpicomolarer Bereich) detektiert werden [367,370]. Die sensitive Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scan-Analyse phosphorylierter Peptid stellt, im Bereich der ESI-Triple-Quad-MS, allerdings höchste Anforderungen in Bezug auf die Kalibrierung und die Feinabstimmung des Massenspektrometers. Aus diesem Grund werden in diesem Kapitel die Kollisions-*Offset*-Fragmentationen-Beziehungen phosphorylierter Peptide bei der positiv- und negativ-Ionen-ESI-MS und -NanoES-MS unter verschiedenen pH-Bedingungen untersucht.

5.4.1. Positiv-Ionen-ESI-MS/MS phosphorylierter Peptide

Zur Ermittlung der Kollisions-*Offset*-Abhängigkeit der H_3PO_4^- (98 Da) bzw. HPO_3^- (80 Da) Neutralverlustreaktion wurde ein Phosphopeptid unter sauren Bedingungen in einem positiv-

Ionen-ESI-MS/MS-Experiment fragmentiert (Abb. 5.20). Zur Erstellung des Kollisions-*Offset*-Diagramms wurde das Serin-phosphorylierte Hitzeschock-Peptid ($C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$, $6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % ACN, 0,075 % TFA (v/v)) mit Hilfe der Spritzenpumpe ($5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Flussrate) über die Standard ESI-Quelle ins MS-Gerät infundiert. Die Intensität des $[M+2H]^{2+}$ -Quasimoleküliions (m/z 821,8) sowie der $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ - und $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen (m/z 772,4 bzw. m/z 781,4) wurde dabei in Abhängigkeit der CID-*Offset*-Werte ermittelt.

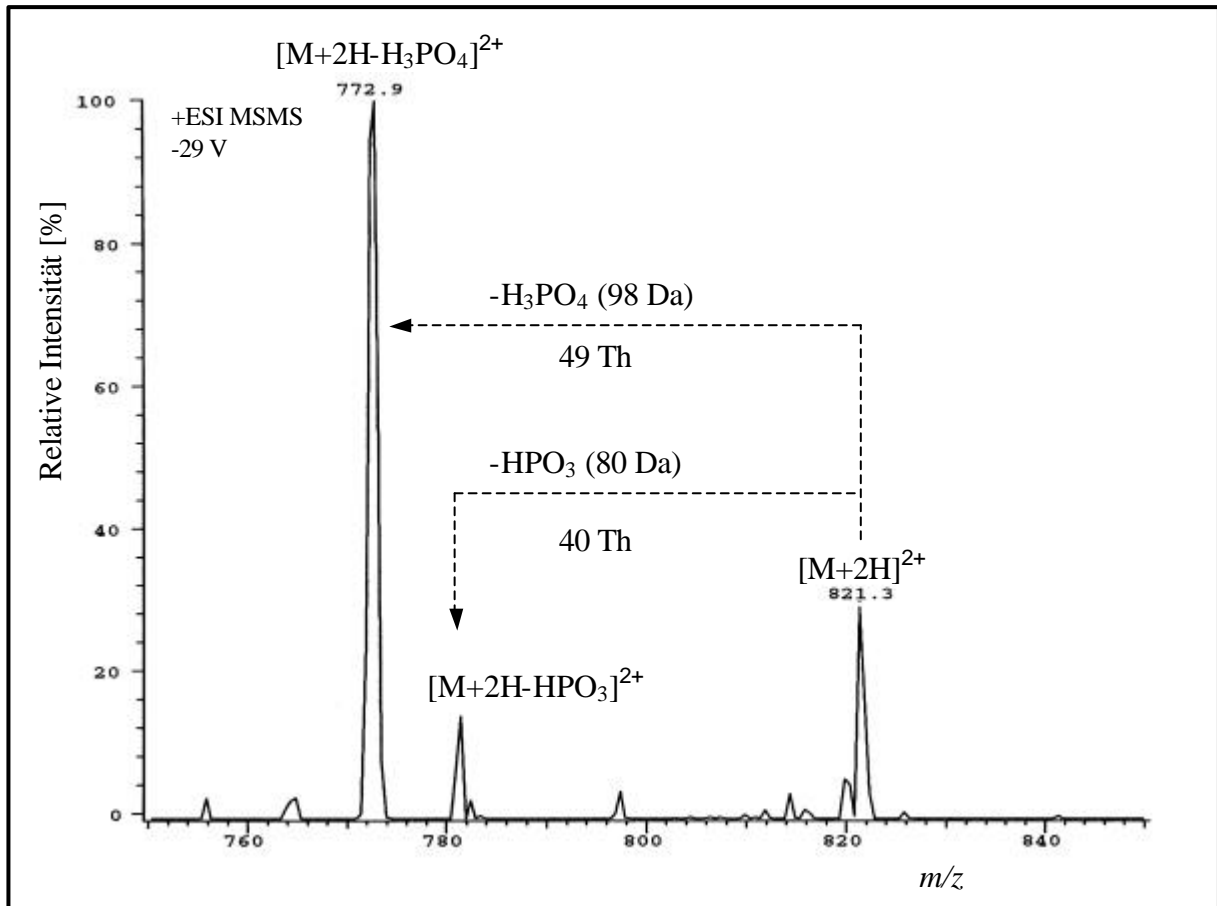


Abb. 5.20. Positiv-Ionen-ESI-Tandem-Massenspektrum (TSQ 700) des Serin-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Quasimoleküliions bei m/z 821,3. Die Bedingungen waren: $6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ HSP ($C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$) in wässriger 50 % ACN, 0,075 % TFA (v/v); $5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Spritzenpumpeninfusion; positiver Ionenmodus; -4,5 kV ESI-Spannung; 45 psi Sheath-Gas; $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 821,3 selektiert in Q1; MS/MS in q2: -29 V CID-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Scan im Bereich von 750-850 m/z in 1,5 sec; 20 Scans.

Abbildung 5.20 zeigt das positiv-Ionen-ESI-Tandem-Massenspektrum (Tochterionenspektrum), welches von dem $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Quasimoleküliion bei m/z 821,3 aufgenommen wurde (Kollisions-*Offset* von -29 V). Die Kollisionsaktivierung führte zu einem Neutralverlust von H_3PO_4 (98 Da) bzw. HPO_3 (80 Da), infolgedessen sich $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ - und $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen bei m/z 772,9 bzw. m/z 781,3 bildeten. Das $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentation erzeugte das intensivste Signal im ermittelten Massenspektrum (Abb. 5.20). Im Vergleich dazu war die Intensität des $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Moleküliions 65 %, die des $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Fragmentations sogar 90 % niedriger.

Abbildung 5.21 zeigt das Kollisions-Offset-Diagramm der phosphorylierungsspezifischen Fragmentationen, welches bei der Offset-abhängigen Fragmentierung der $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Molekülonen (m/z 821,8) ermittelt wurde. Mit zunehmendem Kollisions-Offset nahm die Intensität der $[M+2H]^{2+}$ -Ionen ab. Im Vergleich dazu nahm die Intensität der $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ - und $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen (m/z 772,9 bzw. m/z 781,3) schon bei relativ moderaten Offset-Werten (-15 bzw. -20 V) zunächst leicht zu, erreichte bei einem Offset von etwa -25 bis -30 V ein Maximum und nahm dann wieder leicht ab. Der stärker ausgeprägte Verlust von H_3PO_4 ist deutlich erkennbar. Am Maximum war die Intensität des $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -Fragmentations im Vergleich zum $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Fragmentation 7-fach höher. Die beiden Neutralverlust-Fragmentationen erreichten ihre Intensitätsmaxima zudem schon bei relativ niedrigen Offset-Werten. Beide Fragmentationen zeigten einen symmetrischen Kurvenverlauf. Im Vergleich zum HPO_3 -Neutralverlust setzte der H_3PO_4 -Neutralverlust schon bei niedrigeren Offset-Werten ein (ca. -5 V Unterschied) und erreichte sein Maximum ebenfalls bei einem niedrigeren Offset-Wert (ca. -22 V).

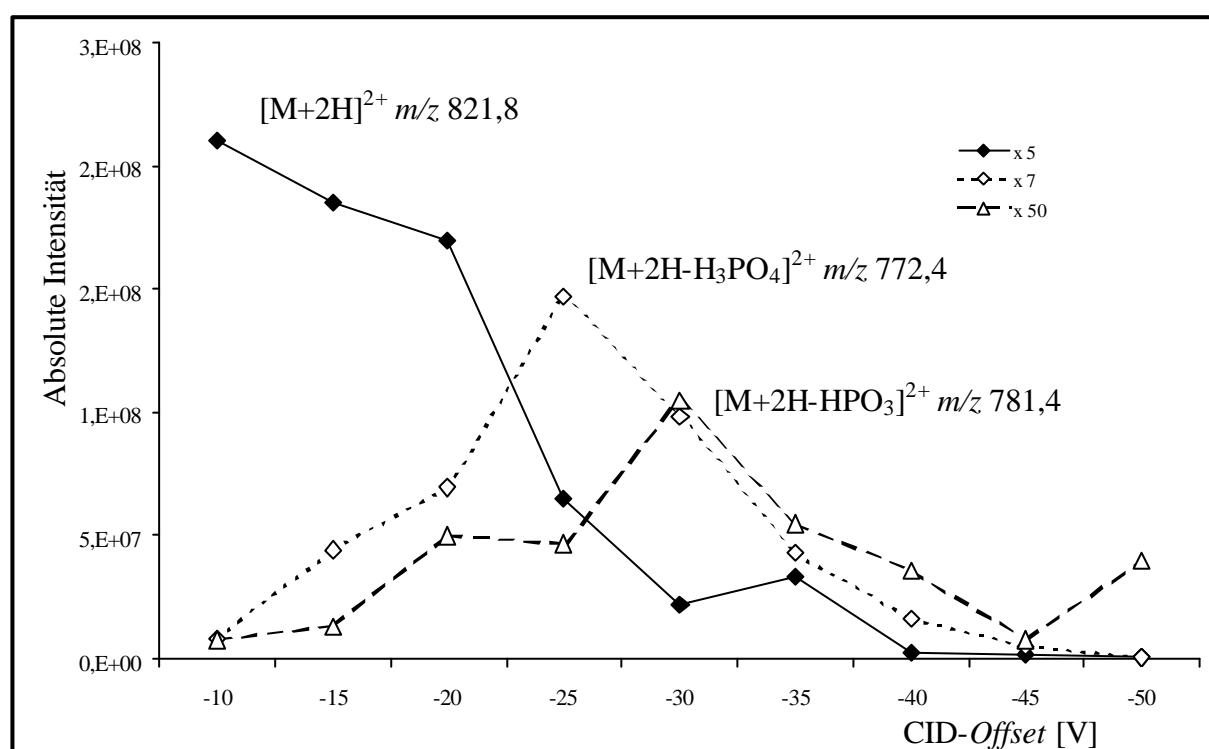


Abb. 5.21. Kollisions-Offset-Diagramm, welches für das $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Quasimolekülion ($C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$) und die phosphorylierungsspezifischen $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ - und $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen ermittelt wurde. Das $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Quasimolekülion bei m/z 821,8 wurde in Q1 selektiert und bei den unterschiedlich eingestellten Offset-Werten unter CID-Bedingungen fragmentiert. Bedingungen siehe Abb. 5.20. CID-Offset: -10 bis -50 V (Schritte von jeweils -5 V).

5.4.2. H_3PO_4 -Neutralverlust-Scantechnik

Die CID-Bedingungen, welche mit Hilfe der Tandem-MS/MS-Experimente (Kap. 5.4.1) optimiert wurden, wurden auf die Neutralverlust-Scantechnik übertragen und zur Detektion des Serin-phosphorylierten HSP angewendet.

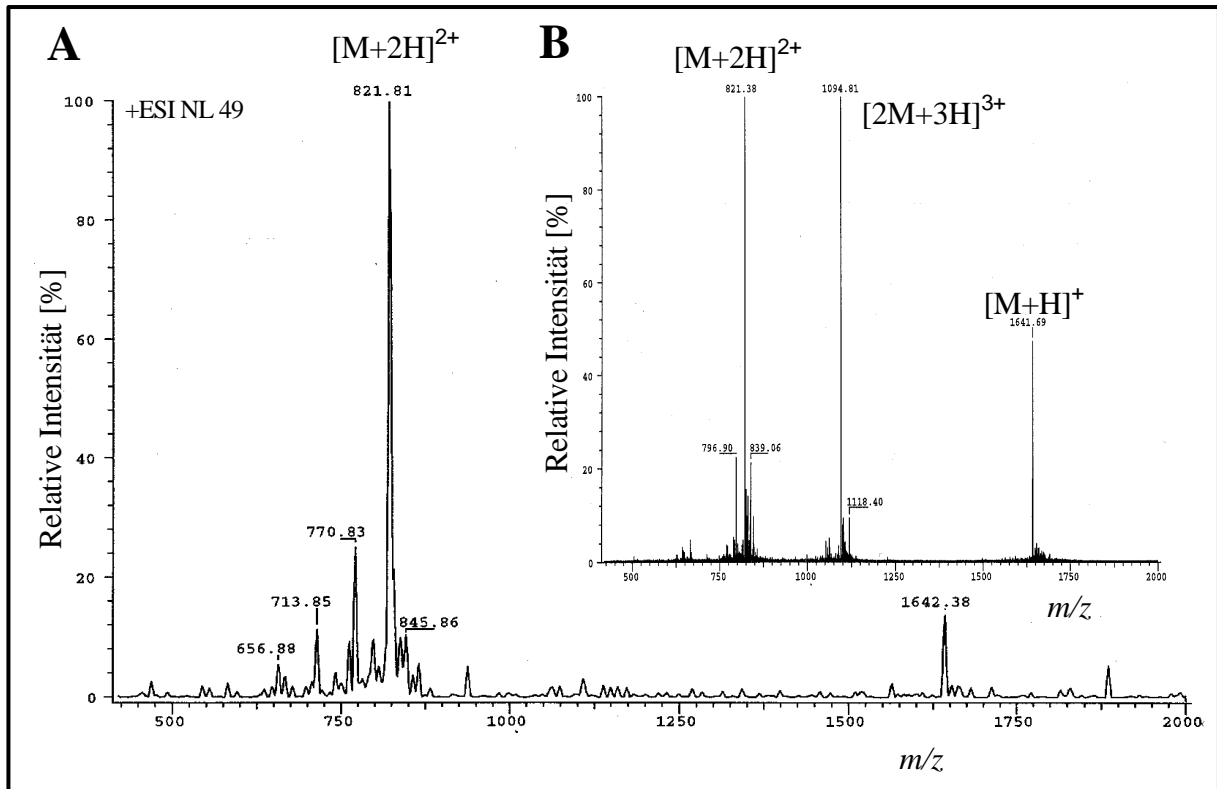


Abb. 5.22. *Positiv-Ionen-ESI-Massenspektren (TSQ 700) des Serin-phosphorylierten HSP ($C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$). Bedingungen: $0,2 \mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ HSP in wässriger 50 % ACN, 0,1 % Ameisensäure (v/v); $5 \mu\text{l}\text{min}^{-1}$ Spritzenpumpeninfusion. (A) Neutralverlust-Scan auf 49 Da (Neutralverlust von H_3PO_4) zur Detektion von $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptidionen: -20 V Kollisions-Offset; Profil-Modus; Q1 Scan im Bereich von 450-2050 m/z; MS/MS in q2; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Neutralverlust-Scan um 49 m/z gegenüber Q1 versetzt im Bereich 400-2000 m/z in 3,5 sec; 12 Scans. (B) Übersichts-Massenspektrum: Centroid-Modus; Q3 Scan im Bereich von 400-2000 m/z in 3 sec; 11 Scans.*

Abbildung 5.22.A zeigt das positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum des Serin-phosphorylierten HSP $C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$ ($0,2 \mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ HSP in wässriger 50 % ACN, 0,1 % Ameisensäure (v/v)), welches mit Hilfe der Neutralverlust-Scantechnik (auf 49 Da) aufgenommen wurde. Beim Neutralverlust-Scan auf 49 Da können nur zweifach positiv geladene $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Quasimolekülonen detektiert werden. Im Vergleich zum Übersichtsspektrum (Abb. 5.22.B) erscheint im Neutralverlustspektrum deshalb nur noch das Signal des $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Quasimolekülonen bei m/z 821,8. Bei den eingestellten CID-Bedingungen können alle im Übersichtsspektrum (Abb. 5.22.B) auftretenden Phosphopeptidionen einen Neutralverlust von Phosphorsäure (98 Da) erfahren, jedoch können nur zweifach positiv geladene Phosphopeptid-Quasimolekülonen detektiert werden, da bei einer Neutralverlust-Einstellung von 49 Da gescannt wurde. Ausschließlich $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Quasimolekülonen erzeugen im Abstand von 49 Th $[M-H_3PO_4+2H]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentionen.

5.4.3. *Negativ-Ionen-NanoES-MS/MS phosphorylierter Peptide*

Zur Ermittlung der Kollisions-Offset-abhängigen Bildung der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Markerionen (m/z 79 und m/z 97) wurden phosphorylierte Peptide im negativen Ionenmodus

unter sauren und alkalischen Bedingungen mittels NanoES-MS/MS fragmentiert. Zur Erstellung der Kollisions-*Offset*-Diagramme wurde das Tyrosin-phosphorylierte pp60 c-src-Peptidfragment ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$, $6,5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % ACN, 5 % Ameisensäure (v/v) bzw. wässriger 50 % ACN, 1 % NH_3 (v/v)) mit Hilfe der *off-line*-NanoES-Quelle ins MS-Gerät infundiert. Dabei wurde die Intensität des Molekülions sowie der phosphorylierungsspezifischen Fragmentationen in Abhängigkeit der unterschiedlich eingestellten CID-*Offset*-Werte ermittelt.

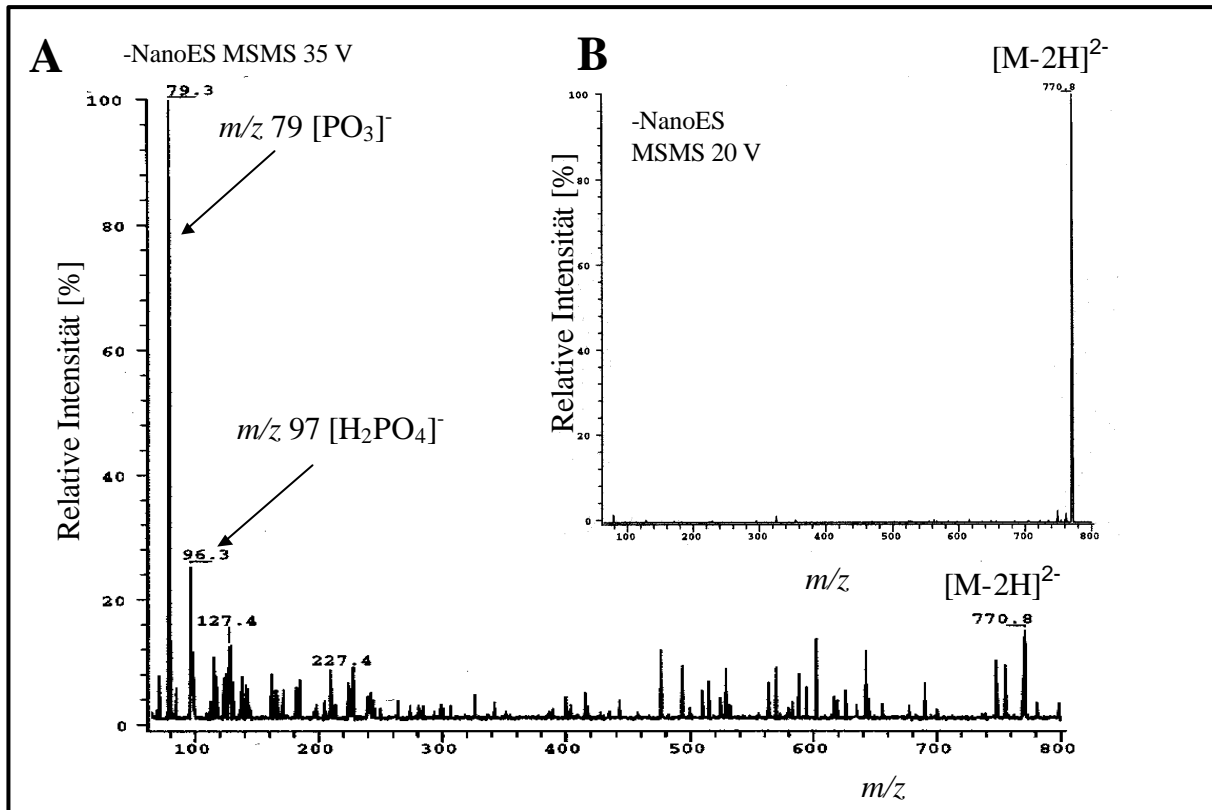


Abb. 5.23. *Negativ-Ionen-NanoES-Tandem-Massenspektren (TSQ 700) des Tyrosin-phosphorylierten $[M-2H]^{2-}$ -pp60c-src-Quasimolekülions ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$) bei m/z 770,8. (A) 20 V CID-Offset und (B) 35 V CID-Offset. Bedingungen: $6,5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pp60c-src in wässriger 50 % ACN, 5 % Ameisensäure (v/v); +700 V NanoES-Spannung; $[M-2H]^{2-}$ bei m/z 770,8 selektiert in Q1; MS/MS in q2: (A) 20 V und (B) 35 V CID-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Scan im Bereich von 65-800 m/z in 2 sec; 30 Scans.*

In Abbildung 5.23 sind die negativ-Ionen-NanoES-Tandem-Massenspektren zu sehen, welche bei der Fragmentierung (20 bzw. 35 V CID-*Offset*) des $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions (m/z 770,8) des Tyrosin-phosphorylierten pp60c-src ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$) aufgenommen wurden. Bei den Experimenten konnten trotz der stark sauren Bedingungen intensive Signale beobachtet werden (*Wrong-Way-Round*-Effekt, Kap. 2.1.4.3). Der CID-*Offset* von 35 V führte zu einer starken Fragmentierung des $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions (Abb. 5.23.A). Die Signale der phosphorylierungsspezifischen $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) sind deutlich zu erkennen (unterer m/z -Bereich). Bei 20 V CID-*Offset* erfolgte hingegen kaum eine Fragmentierung des selektierten Elternions (Abb. 5.23.B). Im Tandem-Massenspektrum ist hauptsächlich das unfragmentierte $[M-2H]^{2-}$ -Phosphopeptidion (m/z 770,8) zu sehen, phosphorylierungsspezifische $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen treten hingegen kaum auf.

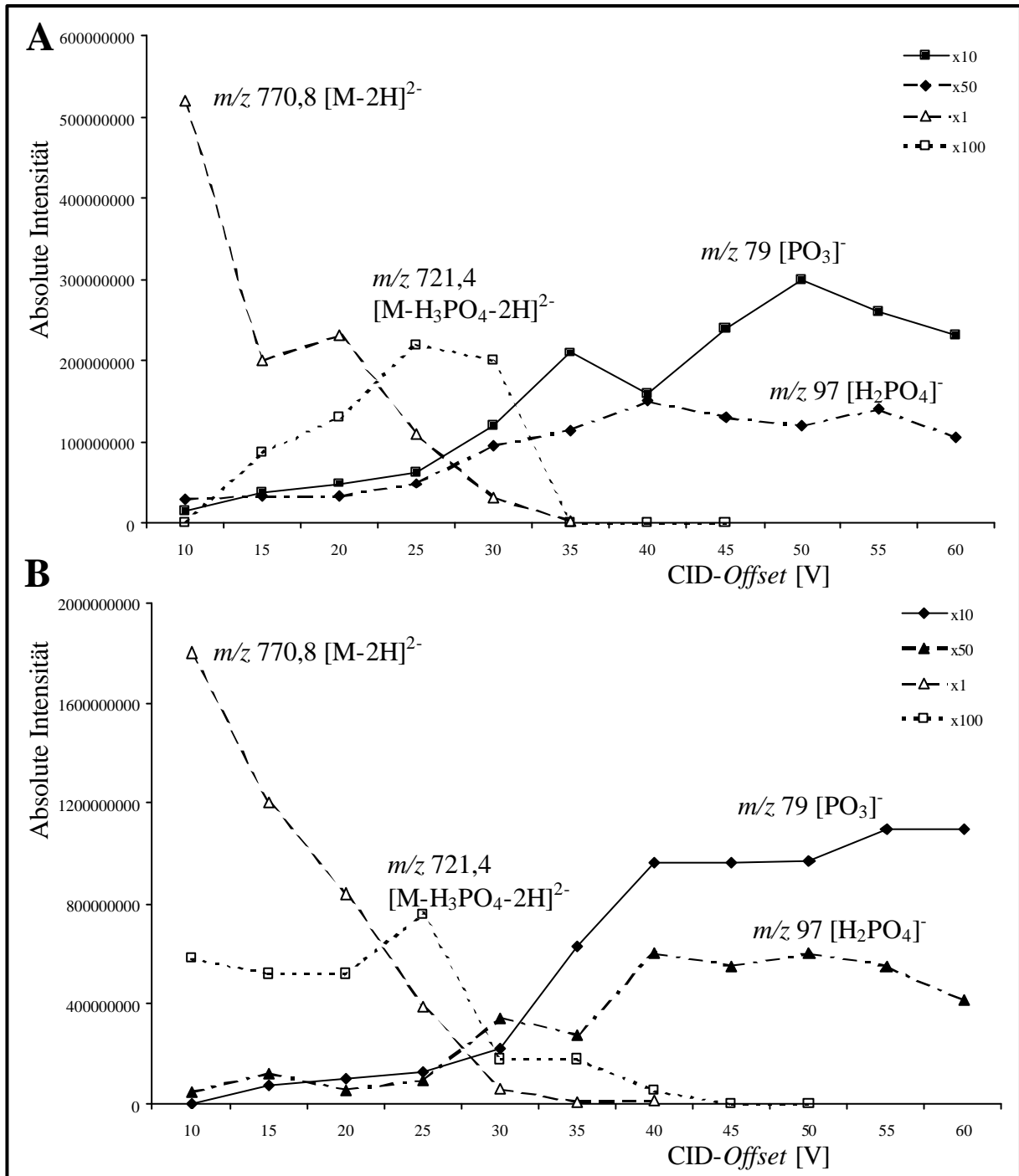


Abb. 5.24. Kollisions-Offset-Diagramme, welche für das $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülion (m/z 770,8), das $[M-H_3PO_4-2H]^{2-}$ -Neutralverlust-Fragmentation (m/z 721,4) sowie die phosphorylierungsspezifischen $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 und m/z 97) im negativen Ionenmodus ermittelt wurden. Das $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülion (m/z 770,8) des Tyrosin-phosphorylierten pp60-c-src ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$) wurde in Q1 selektiert und unter CID-Bedingungen fragmentiert. (A) Saure Bedingungen ($6,5 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$ pp60c-src in wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v)). (B) Alkalische Bedingungen ($6,5 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$ pp60c-src in wässriger 50 % MeOH, 1 % NH_3 , (v/v)). Bedingungen: +700 V NanoES-Spannung; $[M-2H]^{2-}$ bei m/z 770,8 selektiert in Q1; MS/MS in q2: 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Scan im Bereich von 65-800 m/z in 2 sec; 30 Scans; 10-60 V CID-Offset (Schritte von jeweils 5 V).

Bei den negativ-Ionen-NanoES-MS/MS-Experimenten zeigten die Intensitäten der ermittelten Quasimolekül- und Fragmentionen trotz unterschiedlicher pH-Bedingungen nahezu identische Verläufe in den Kollisions-*Offset*-Diagrammen (Abb. 5.24.A und B). Sowohl unter sauren als auch unter alkalischen Bedingungen nahm die Intensität des $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions (m/z 770,8) schon bei relativ niedrigen *CID-Offset*-Werten stark ab. Bei 25 V *CID-Offset* verringerte sich die Intensität dieser Ionen auf etwa 20 % des Ausgangswertes. Eine Bildung von $[M-H_3PO_4-2H]^{2-}$ -Neutralverlust-Fragmentionen (m/z 721,4) konnte lediglich unter sauren Bedingungen, bei relativ niedrigen *Offset*-Werten (25-30 V) beobachtet werden. Die Intensität dieser Ionen war äußerst gering und nahm bei mittleren *Offset*-Werten (30-35 V) deutlich ab. Der Verlauf der Intensitäten erfolgte nahezu symmetrisch (Abb. 5.24.A). Die Bildung der phosphorylierungsspezifischen $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentionen (m/z 79 bzw. m/z 97) setzte erst bei *Offset*-Werten > 25 V ein und stieg mit zunehmendem *CID-Offset* kontinuierlich an. Unter alkalischen Bedingungen erreichte die Intensität des $[PO_3]^-$ -Fragmentions (m/z 79) bei 40 V *CID-Offset* schließlich ein Plateau, wogegen für die Intensität des $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentions (m/z 97) kein Verlauf ins Plateau festgestellt werden konnte (Abb. 5.24.B). Die Intensität des $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentions nahm bei *Offset*-Werten > 55 V wieder ab. Unter sauren Bedingungen konnte ein Anstieg der Intensitäten der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentionen (m/z 79 bzw. m/z 97) bis zu einem *Offset*-Wert von 55 V beobachtet werden; mit zunehmenden *Offset* nahm die Intensität der beiden Fragmentionen jedoch wieder ab. Bei 10 V *CID-Offset* (keine Beschleunigungsspannung, jedoch Stoßgas in der Kammer) konnte unter alkalischen Bedingungen für das $[M-2H]^{2-}$ -pp60-Ion (m/z 770,8) eine etwa 3,5fach höhere Intensität im Vergleich zu den sauren Bedingungen beobachtet werden (Abb. 5.25). Das $[M-2H]^{2-}$ -pp60-Ion (m/z 770,8) ionisierte somit unter alkalischen Bedingungen erheblich besser als unter sauren Bedingungen (*Wrong-Way-Round*, Kap. 2.1.4.3). Unter den alkalischen Bedingungen standen damit deutlich mehr $[M-2H]^{2-}$ -Phosphopeptidionen für die Fragmentierung zur Verfügung.

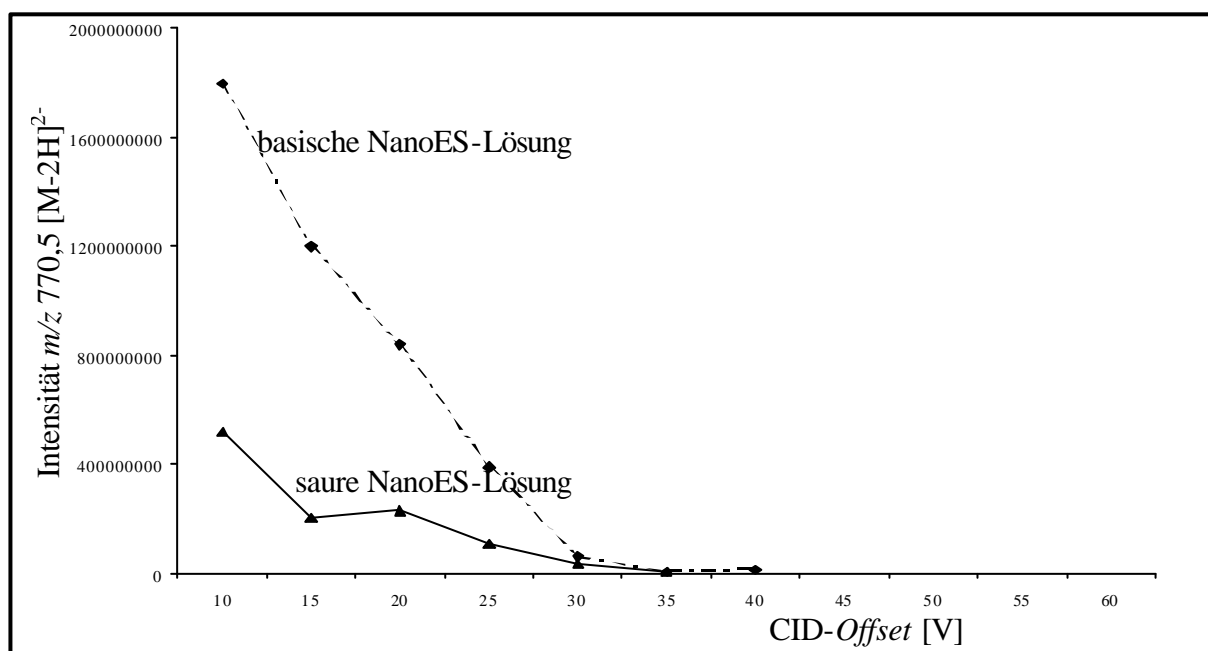


Abb. 5.25. Direkter Vergleich der Intensitäten der $[M-2H]^{2-}$ -Molekülionen (m/z 770,5) des Tyrosin-phosphorylierten pp60-c-src ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$) unter TFA-sauren (pH 2,5) und alkalischen Bedingungen (pH 10,5) in Abhängigkeit vom *CID-Offset* (Abb. 5.24.A und B).

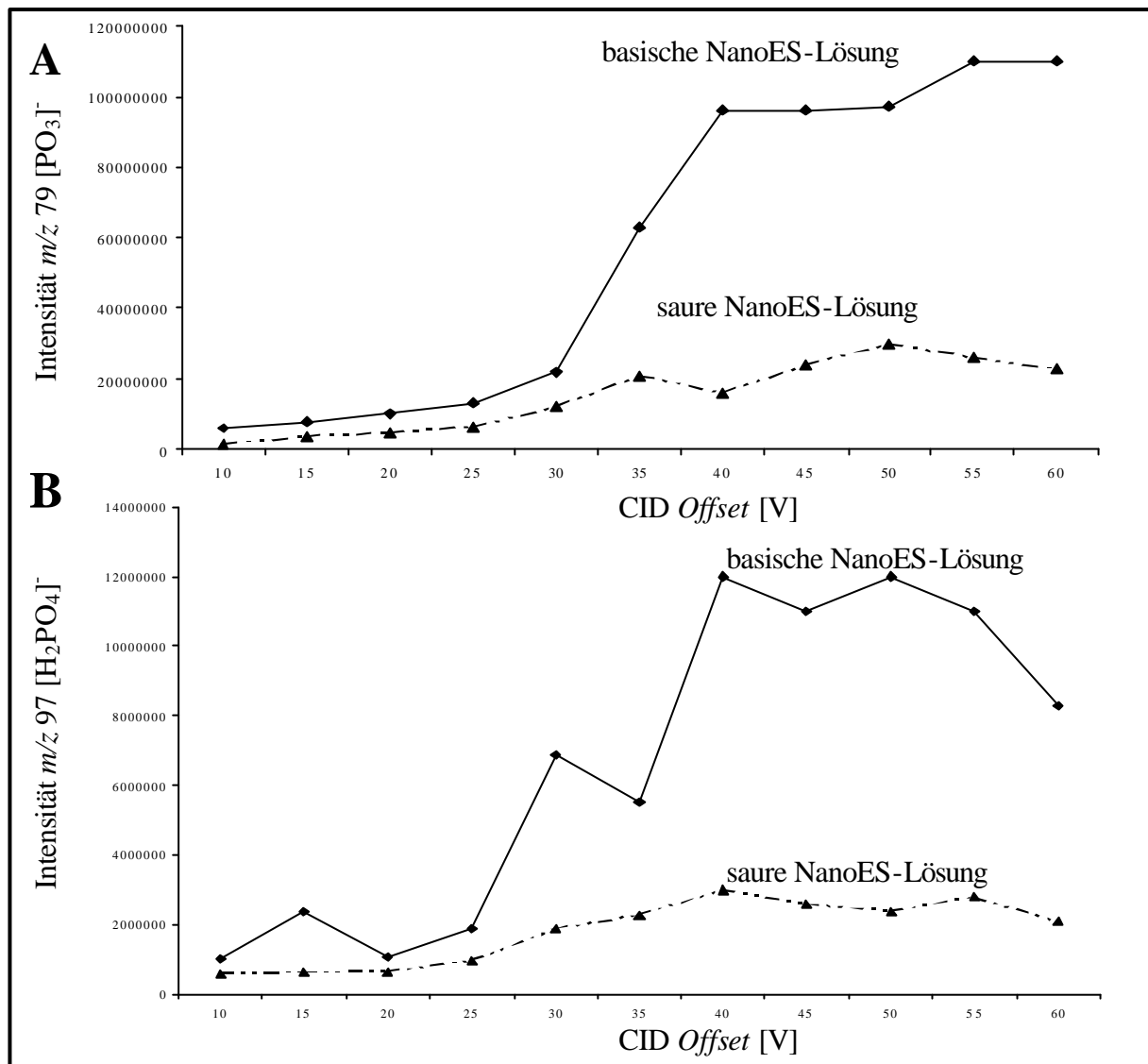


Abb. 5.26. *Negativ-Ionen-NanoES-MS/MS des $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Molekülions (m/z 770,5) des Tyrosin-phosphorylierten pp60-c-src ($\text{T}^{521}\text{STEPQpYQPGENL}^{533}$). Direkter Vergleich der Intensitäten der $[\text{PO}_3]^-$ - (A) und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen (B) in Abhängigkeit vom CID-Offset unter TFA-sauren (pH 2,5) und alkalischen Bedingungen (pH 10,5). Bedingungen siehe Abb. 5.24.*

Abbildung 5.26 zeigt den CID-abhängigen Verlauf der Intensitäten der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen (m/z 79 bzw. m/z 97), die unter sauren und alkalischen Bedingungen ermittelt wurden. Die Intensität der $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmention (m/z 79) war bei hohen Offset-Werten (55-60 V) unter alkalischen Bedingungen etwa 5-fach höher im Vergleich zu den sauren Bedingungen (Abb. 5.26.A). Die Erhöhung des pH-Wertes führte beim $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmention (m/z 97) sogar zu einer 6-fachen Erhöhung von dessen Intensität (Maximum bei 40-50 V CID-Offset) (Abb. 5.26.B).

5.4.4. Die m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik

Die CID-Bedingungen, welche mit Hilfe der Tandem-MS/MS-Experimente (Kap. 5.4.3) optimiert wurden, wurden auf die Vorläuferionen-Scantechnik übertragen und zur Detektion des Tyrosin-phosphorylierten pp60 c-src-Peptidfragmentes ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$) angewendet.

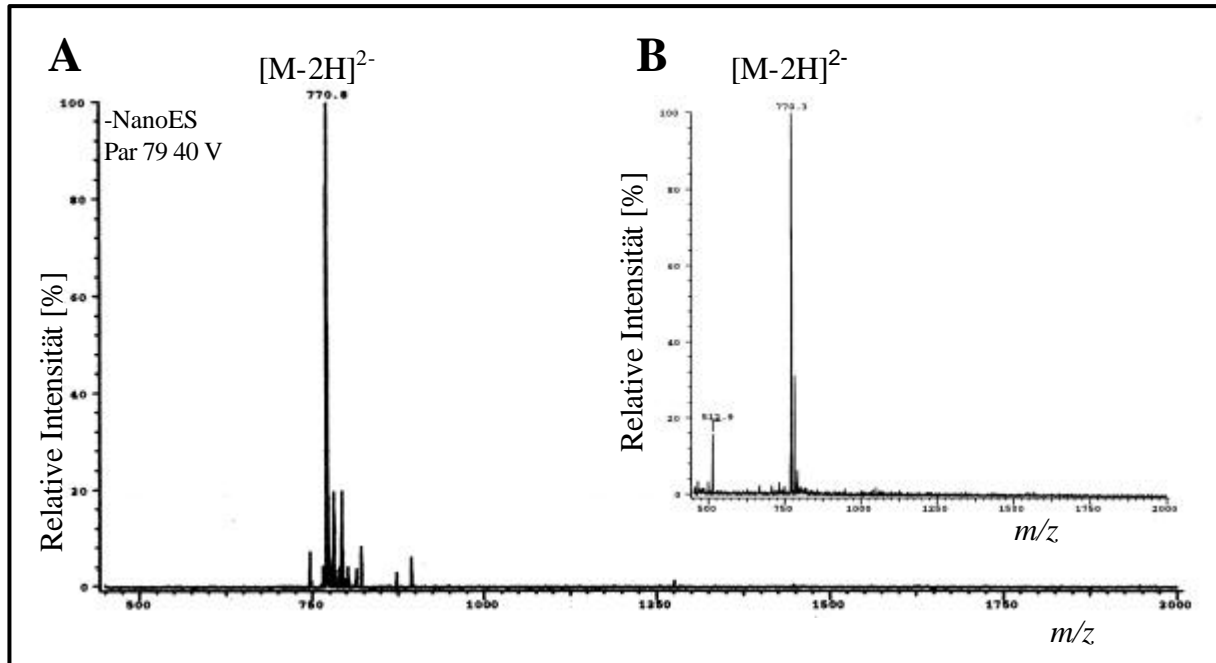


Abb. 5.27. Negativ-Ionen-NanoES-MS-Analyse (TSQ 700) des Tyrosin-phosphorylierten pp60 c-src-Peptidfragmentes $T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$ ($600 \text{ fmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 1 % NH_3 (v/v)). (A) $[\text{PO}_3]^-$ -Vorläuferionen-Scan (m/z 79) zur spezifischen Detektion von Phosphopeptidionen. Bedingungen: +700 V NanoES-Spannung; Profil-Modus; Q1 Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; MS/MS in q2: 40 V CID-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Scan SIM auf 79 m/z ; 30 Scans (B) Übersichts-Massenspektrum. Bedingungen: Profil-Modus; +700 V NanoES-Spannung; Q3 Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; 30 Scans.

Das Tyrosin-phosphorylierte pp60 c-src-Peptidfragment $T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$ ($600 \text{ fmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 1 % NH_3 (v/v)) konnte mittels negativ-Ionen-NanoES-MS-Vorläuferionen-Scantechnik auf m/z 79 ($[\text{PO}_3]^-$) ermittelt werden (Abb. 5.27.A). Bei 40 V CID-Offset erfolgte eine Fragmentierung des zweifach negativ geladenen $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Phosphopeptid-Moleküliions (m/z 770,8), wobei sich unter anderem das phosphorylierungsspezifische $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentation bei m/z 79 bildete, anhand dessen das Phosphopeptid indirekt detektiert werden konnte. Im Übersichts-Massenspektrum (negativ-Ionen-NanoES-MS ohne Fragmentierung, Abb. 5.26.B) ist das $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Phosphopeptid-Moleküliion (m/z 770,3) ebenfalls deutlich zu erkennen. Bei beiden Analysen konnte das $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Quasimoleküliion des Phosphopeptids noch bei einer Konzentration von $60 \text{ fmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ detektiert werden. Die auf der Erzeugung der phosphorylierungsspezifischen $[\text{PO}_3]^-$ -Markerionen (m/z 79) basierende negativ-Ionen-NanoES-MS-Vorläuferionen-Scantechnik ermöglicht somit eine höchst empfindliche Detektion phosphorylierter Peptide.

5.5. Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS und SEQUEST-Analyse phosphorylierter Peptide

Zur Gewinnung sequenzspezifischer Strukturinformationen können Peptide unter CID-Bedingungen fragmentiert werden (Kap. 2.2.5.3 und Kap. 2.4.4). Dabei erhält man ein individuelles Fragmentationmuster, welches von der Aminosäuresequenz der Peptide abhängig ist. Die ermittelten Tandem-MS/MS-Spektren können basierend auf den ermittelten Fragmentationen mit Hilfe datenbankunterstützter Computeralgorithmen interpretiert werden (z.B. SEQUEST, Kap. 4.3.10.9). Somit kann auch die exakte Position einer Phosphorylierungsstelle innerhalb eines Phosphopeptids mit Hilfe eines CID-Spektrums bestimmt werden.

5.5.1. Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS-Analyse und SEQUEST-Interpretation des Tyrosin-phosphorylierten und nicht-phosphorylierten pp60 c-src-(521-533) Peptidfragmentes

Bei den folgenden Experimenten wurde Tyrosin-phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes pp60 c-src-Peptidfragment mit Hilfe der Tandem-MS/MS fragmentiert und die Fragmentationenspektren anschließend mit SEQUEST ausgewertet.

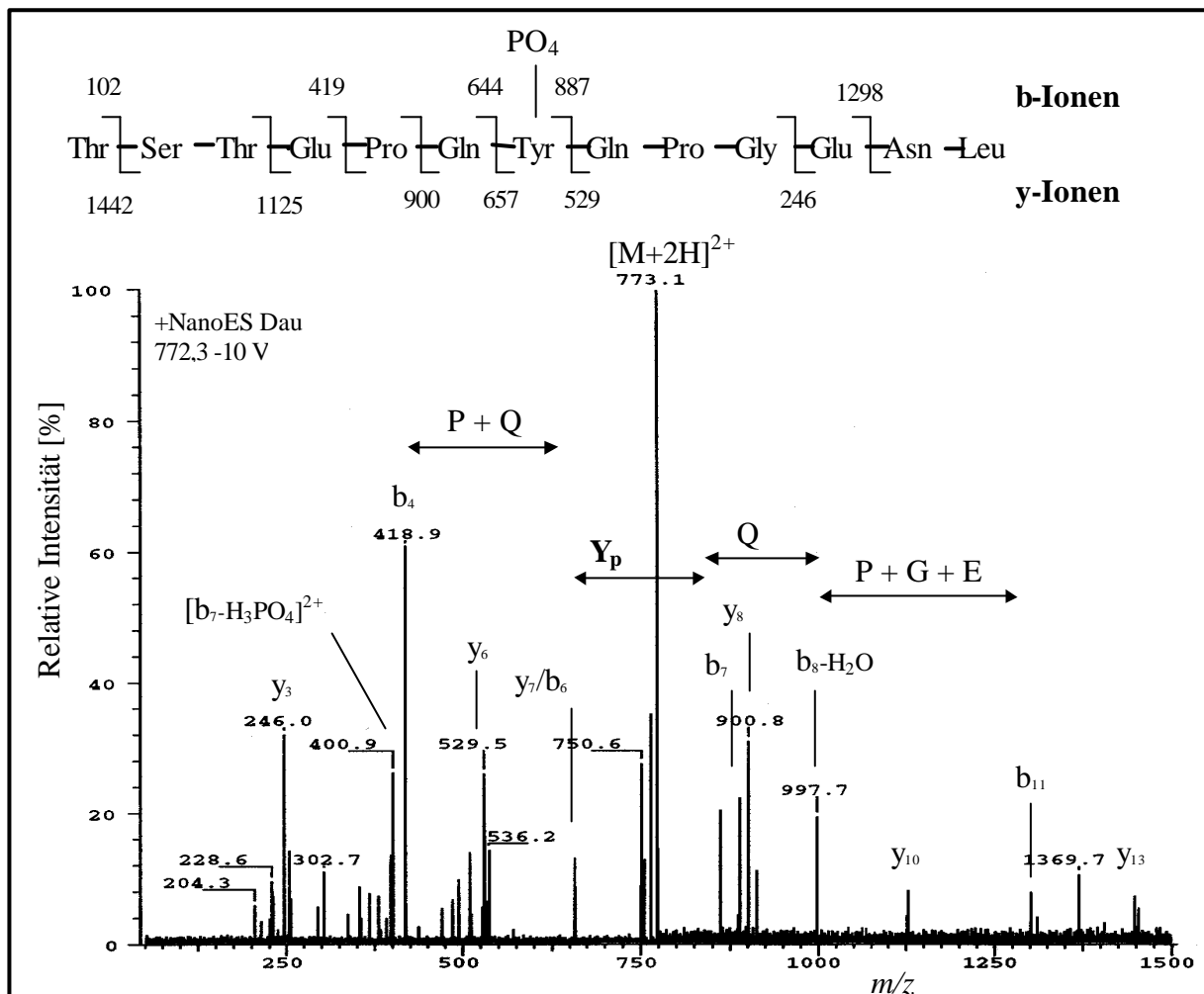


Abb. 5.28. Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS-Analyse (TSQ 700) des Tyrosin-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -pp60 c-src-Quasimoleküls bei m/z 772,3. Beide Ionenserien wurden

gleichzeitig erhalten. Die *b*- und *y*-Typ-Ionenserien repräsentieren die Sequenz ausgehend vom *N*- bzw. *C*-Terminus (Kap. 2.4.4). Das Tandem-Massenspektrum wurde mit Hilfe von SEQUEST ausgewertet (siehe Abb. 5.29). Die Phosphorylierung befindet sich an Tyrosinrest 527 ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$). Bedingungen: 6,5 pmol μl^{-1} pp60 *c*-src in wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v); -800 V NanoES-Spannung; $[M+2H]^{2+}$ bei *m/z* 772,3 selektiert in Q1; MS/MS in q2: -10 V CID-Offset (20 eV); 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Scan im Bereich von 50-1500 *m/z* in 3 sec; 30 Scans.

```
01023_06.0001.0029.2.out
SEQUEST v.C1, Copyright 1993-97
Molecular Biotechnology, Univ. of Washington, J.Eng/J.Yates
Licensed to Finnigan Corp., A Division of ThermoQuest Corp.
10/26/00, 04:29 PM, 0 sec. on icis2.medukl.medizin.uni-tuebingen.de
mass=1543.6(+2), fragment_tol=2.00, mass_tol=0.50, MONO
# amino acids = 13, # proteins = 1, # matched peptides = 4
immonium (HFYWM) = (00000), total_inten=6417.6, lowest_Sp=0.0
ion series nA nB nY ABCDVWXYZ: 0 1 1 0.0 1.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 0.0
rho=0.200, beta=0.075, top 10, /usr/users/finnigan/database/pp60.fasta
(STY* +79.90)
```

#	Rank/Sp	(M+H) ⁺	Cn	deltCn	C*10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1 / 1	1543.6	1.0000	0.0000	1.8493	162.7	10/24	pp60	(-)TSTEPQY*QPGENL
2.	2 / 2	1543.6	0.5245	0.4755	0.9701	70.8	7/24	pp60	(-)TST*EPQYQPGENL
3.	3 / 2	1543.6	0.5206	0.4794	0.9627	70.8	7/24	pp60	(-)TS*TEPQYQPGENL
4.	4 / 3	1543.6	0.3150	0.6850	0.5826	59.4	6/24	pp60	(-)T*STEPQYQPGENL

1. pp60 *c*-src (521-533).

Abb. 5.29. Resultat der SEQUEST-Analyse des CID-Spektrums, welches von dem $[M+2H]^{2+}$ -pp60-*c*-src-Quasimolekülion bei *m/z* 772,3 ermittelt wurde (Abb. 5.28). Die Phosphorylierung konnte mit Hilfe der automatischen Fragmentationeninterpretation am Tyrosinrest 527 lokalisiert werden. Die Sequenz des an Y527 phosphorylierten pp60 *c*-src wurde sowohl bei der vorläufigen als auch bei der endgültigen Auswertung an erster Stelle aufgelistet. Für den ersten Kandidaten wurden folgende Werte berechnet: S_p 162,7; DC_n -Wert 0,4755 (Unterschied der Korrelationswerte zwischen 1. und 2. Kandidaten). Von den ermittelten Fragmentationen konnten 10 den 24 theoretisch berechneten, einfach positiv geladenen *b*- und *y*-Typ-Fragmentationen zugeordnet werden: b_1 , b_4 , b_5 , b_6 , b_{11} , y_3 , y_6 , y_7 , y_8 , y_{10} (siehe Abb. 5.28). Bedingungen: kein Enzym; monoisotopische Massen; unbegrenzte Proteinmasse; $\pm 0,5$ Da Peptidmassentoleranz; ± 2 Da Fragmentationentoleranz; Variable Modifikation: S, T, Y können phosphoryliert sein; Datenbank: Sequenz des pp60 *c*-src ($T^{521}STEPQYQPGENL^{533}$).

Zur Lokalisierung des phosphorylierten Aminosäurerestes des pp60 *c*-src-Peptidfragmentes wurde das $[M+2H]^{2+}$ -pp60-*c*-src-Quasimolekülion bei *m/z* 773,1 in einem positiv-Ionen-Tandem-MS/MS-Experiment (-10 V CID-Offset) sequenziert (Abb. 5.28). Bei dem kollisionsaktivierten Zerfall wurden weder $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ - noch $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen (Neutralverlust von H_3PO_4 bzw. HPO_3) beobachtet. Das Tochterionenspektrum wurde anschließend mit Hilfe von SEQUEST ausgewertet. Das Rohdaten-File (*.dat) wurde dazu zunächst vorprozessiert und in ein ASCII-File (*.dta, Massen- und Intensitätsliste) umgewandelt (siehe Kap. 4.3.10.9). Für die SEQUEST-Analyse wurde nur die Aminosäuresequenz des pp60 *c*-src-Peptids ($T^{521}STEPQYQPGENL^{533}$) unter der Berücksichtigung, dass sämtliche Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste phosphoryliert sein könnten, verwendet. Die Analyse ergab, dass sich die Phosphorylierung am Tyrosinrest 527 ($T^{521}STEPQpY^{527}QPGENL^{533}$) befindet. Die Sequenz wurde sowohl bei der vorläufigen (S_p -

Wert von 162,7) als auch bei der endgültigen Suche jeweils auf Range 1 aufgeführt (Abb. 5.29).

Die Differenz der Korrelationswerte (ΔC_n) der ersten beiden Kandidaten betrug 0,4755. Von den Signalen des Tandem-Massenspektrums konnten 10 den 24 theoretisch berechneten, einfach geladenen *b*- und *y*-Fragmentationen des Peptids zugeordnet werden: *b*₁, *b*₄, *b*₅, *b*₆, *b*₁₁, *y*₃, *y*₆, *y*₇, *y*₈, *y*₁₀ (siehe Abb. 5.28). Die *b*- und *y*-Fragmentationen wurden beim CID gleichzeitig gebildet. Die Position der Phosphorylierung konnte anhand des Abstandes zwischen den *y*₇- (*m/z* 657,3) und *y*₈-Fragmentationen (*m/z* 900,3) ermittelt werden. Der Massenabstand von 243 Da entspricht dabei genau einem Phosphotyrosinrest. Dies wurde ebenfalls durch den 242,9 Da großen Abstand zwischen den *b*₆- (*m/z* 644,3) und *b*₇-Fragmentationen (*m/z* 887,2) bestätigt.

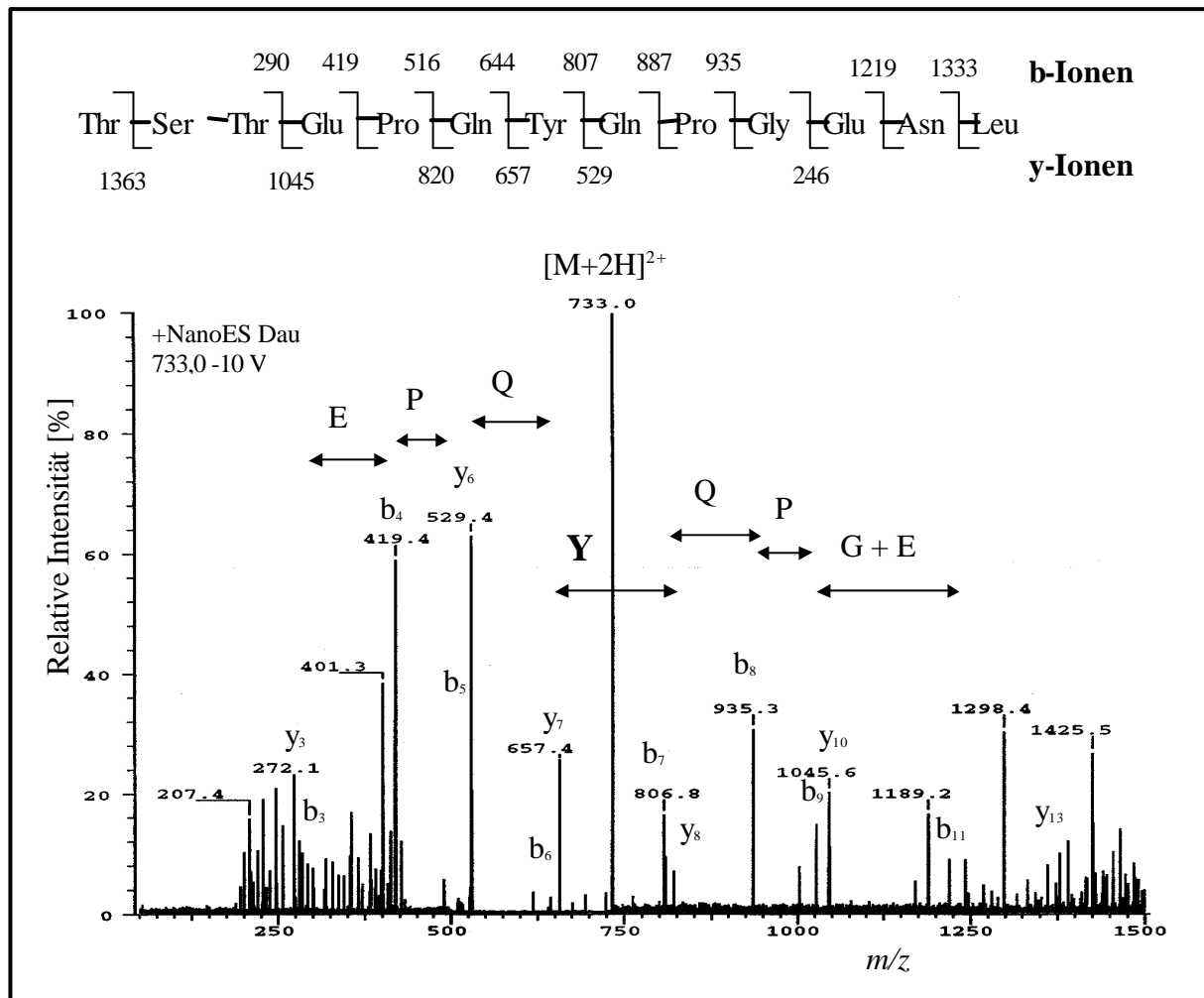


Abb. 5.30. Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS-Analyse (TSQ 700) des nicht-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -pp60-c-src-Quasimoleküls bei *m/z* 733,1 ($T^{521}STEPQYQPGENL^{533}$). Beide Ionenserien wurden gleichzeitig erhalten. Die *b*- und *y*-Typ Ionenserien repräsentieren die Sequenz ausgehend vom N- bzw. C-Terminus (Kap. 2.4.4). Das Tandem-Massenspektrum wurde mit Hilfe von SEQUEST ausgewertet (siehe Abb. 5.29). Tyrosinrest 527 war nicht phosphoryliert (Vgl. Abb. 5.28). Bedingungen: 6,5 pmol· μ l⁻¹ nicht-phosphoryliertes pp60 c-src in wässriger 50 % ACN, 5 % Ameisensäure, (v/v); -800 V NanoES-Spannung;; $[M+2H]^{2+}$ bei *m/z* 733,1 selektiert in Q1; MS/MS in q2: -10 V CID-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Scan im Bereich von 50-1500 *m/z* in 3 sec; 30 Scans.

#	Rank/Sp (M+H) ⁺	Cn	deltCn	C*10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1 / 1	1463.7	1.0000	0.0000	2.3331	520.1	19/36 pp60	(-)TSTEPQYQPGENL
1.	pp60 c-src (521-533).							

Abb. 5.31. *Resultat der SEQUEST-Analyse des CID-Spektrums, welches von dem nicht-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -pp60-c-src-Quasimolekülion bei m/z 733,1 ermittelt wurde (Abb. 5.30). Das pp60 c-src-Peptid ($T^{521}STEPQYQPGENL^{533}$) lag nicht phosphoryliert vor. Von den ermittelten Fragmentionen konnten 14 den 24 theoretisch berechneten, einfach positiv geladenen b- und y-Fragmentionen zugeordnet werden: b_3 - b_8 , b_{11} , b_{12} , y_3 , y_6 - y_8 , y_{10} , y_{13} (siehe Abb. 5.30). Für die Identifizierung wurden unter zusätzlicher Berücksichtigung der α -Ionen (Gewichtungsfaktor von 0,5) die Parameter entsprechend Abb. 5.29 verwendet.*

Bei der kollisionsaktivierten Fragmentierung des nicht-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -pp60 c-src-Quasimolekülions wurden intensive b- und y-Fragmentionenserien erhalten (Abb. 5.30). Im Vergleich zum phosphorylierten pp60 c-src-Peptidfragment konnten deutlich mehr und intensivere Fragmentionen beobachtet werden (vgl. Abb. 5.29). Der bei der SEQUEST-Analyse ermittelte Sp-Wert hängt hauptsächlich von der Intensität sowie der Anzahl der ermittelten Fragmentionen ab. Bei dem nicht-phosphorylierten Peptid wurde deshalb ein dreifach höherer Sp-Wert (520,1 gegenüber 162,7) erhalten (Abb. 5.31). Von den 24 theoretisch berechneten einfach positiv geladenen b- und y-Fragmentionen konnten insgesamt 14 den entsprechenden Fragmentionensignalen im CID-Spektrum zugeordnet werden: b_3 - b_8 , b_{11} , b_{12} , y_3 , y_6 - y_8 , y_{10} , y_{13} (Abb. 5.30). Der 163,1 Da große Abstand zwischen den y_6 - (m/z 657,3) und y_7 - (m/z 820,4) bzw. b_6 - (m/z 644,3) und b_7 -Fragmentionen (m/z 807,2) entspricht einem nicht-phosphorylierten Tyrosinrest.

5.5.2. Positiv-Ionen-NanoES-MS³ und SEQUEST-Analyse des HSP(81-94)-Peptids

Beim CID nicht-phosphorylierter Peptidionen erhält man im Vergleich zu den entsprechenden phosphorylierten Peptidionen deutlich bessere Fragmentionenspektren (Kap. 5.5.1, zahlreichere und intensivere b- und y-Fragmentionen). Qualitativ bessere Tochterionenspektren ermöglichen automatisch eine ebenfalls bessere SEQUEST-Analyse (höhere Sp-Werte). Bei phosphorylierten Peptiden kann die Qualität der Tochterionenspektren durch vorherige Eliminierung des Phosphatrestes (API-CID) und anschließende Fragmentierung (q2-CID) des dephosphorylierten Neutralverlust-Fragmentions verbessert werden (MS³-Experiment). Mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Kap. 2.2.3) können aufgrund der linearen Quadrupol-Anordnung solche MS³-Experimente durchgeführt werden (Kap. 2.5.3.14). Bei der ersten Fragmentierung werden die Peptidionen bei einem hohen *Offset*-Potential in der Skimmer-Region, dem Bereich zwischen ESI-Quelle und dem ersten fokussierenden Quadrupol (Q0), kollisionsaktiviert fragmentiert (API-CID, Abb. 5.32.A). Im positiven Ionenmodus verlieren die Phosphopeptidionen dabei unter relativ moderaten Kollisionsbedingungen in einer Neutralverlustreaktion ihren Phosphatrest (H_3PO_4 , 98 Da, Gasphasendephosphorylierung, Kap. 5.4.1). Bei zweifach geladenen Phosphopeptidionen bilden sich somit in einem Abstand von 49 Th zu den $[M+2H]^{2+}$ -Ionen sehr intensive $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentionen. Bei der zweiten Fragmentierung können diese Gasphasen-dephosphorylierten Fragmentionen nun in Q1 selektiert und mit Hilfe eines Kollisionszellen-CID (q2) fragmentiert werden (MS/MS/MS bzw. MS³).

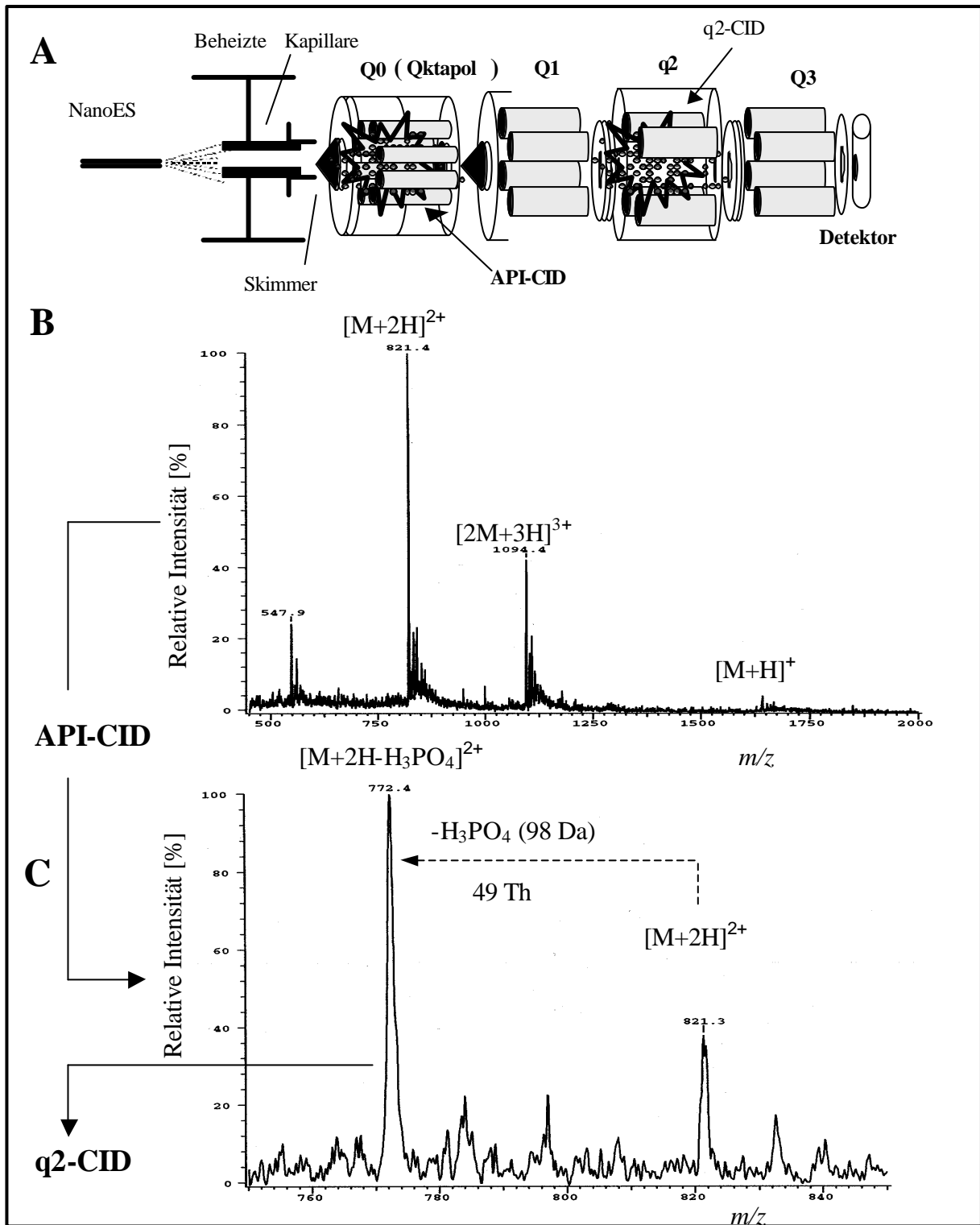


Abb. 5.32. Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS/MS-Analyse (TSQ 700) des Serin-phosphorylierten HSP ($C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$). (A) Triple-Quadrupol-MS-Gerät mit den beiden Kollisionsbereichen: Skimmer (API-CID) und Kollisionszelle (q2-CID). (B) Positiv-Ionen-Übersichts-Massenspektrum des Phosphopeptids. Bei der ersten Fragmentierung im Skimmer-Bereich (API-CID) wurden $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen bei m/z 772,4 (49 Th Abstand zum $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Molekülion (m/z 821,4)) gebildet. (C) Bei der zweiten Fragmentierung wurden diese 'primär' gebildeten Fragmentationen in Q1 selektiert und in der Kollisionszelle (q2-CID) fragmentiert (Abb. 5.33).

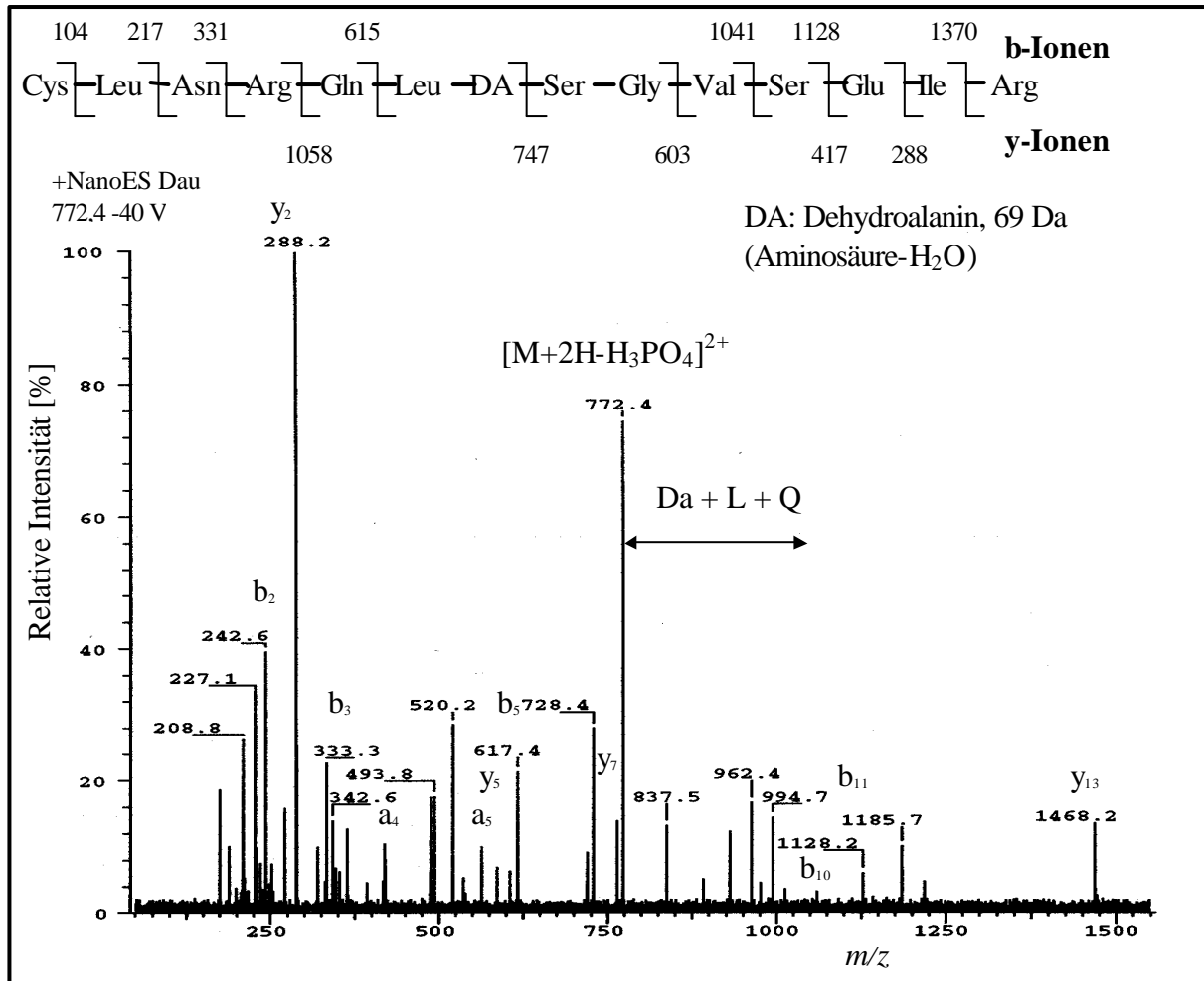


Abb. 5.33. Tochterionen-Massenspektrum (q_2 -CID), des API-CID-erzeugten $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -HSP(81-94)-Neutralverlust-Fragmentations bei m/z 772,4 (Abb. 5.32.C). Die b - und y -Typ-Ionenserien repräsentieren die Sequenz ausgehend vom N- bzw. C-Terminus (Kap. 2.4.4). Die Phosphorylierung befindet sich an Serinrest 87 ($C^{81}LNRQLpS^{87}SGVSEIR^{94}$). Bedingungen: $120 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$ HSP(81-94) in wässriger 50 % ACN, 1 % Ameisensäure (v/v); positiver Ionenmodus; -800 V NanoES-Spannung; -30 V API-CID-Offset; $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ bei m/z 772,4 selektiert in Q_1 ; MS/MS in q_2 : -40 V CID-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q_3 Scan im Bereich 50-1550 m/z in 3 sec; 100 Scans.

#	Rank/Sp	(M+H) ⁺	Cn	deltCn	C*10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1 / 2	1543.8	1.0000	0.0000	0.5628	326.4	16/39	Dehydro-Ala-Cys	(-)CLNRQLS*SGVSEIR
1.									Dehydro-Ala-Cys-hsp-27 (81-94) human: Ser (87)

Abb. 5.34. SEQUEST-Analyse des CID-Spektrums welches von dem API-CID-generierten $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentation des Serin-phosphorylierten HSP (81-94) ermittelt wurde (Abb. 5.33). Die Phosphorylierung konnte mit Hilfe der automatischen Fragmentationen-Interpretation an Serinrest 87 lokalisiert werden. Von den ermittelten Fragmentationen konnten 9 den 28 theoretisch berechneten einfach positiv geladenen b - und y -Fragmentationen zugeordnet werden: b_2 , b_3 , b_5 , b_{10} , b_{11} , y_2 , y_5 , y_7 , y_{13} (Abb. 5.33). Die Bildung von Dehydroalanin (69 Da) infolge der Gasphasendephosphorylierung (-98 Da) des Phosphoserins (166,9 Da) wurde bei der Analyse berücksichtigt (Kap. 2.5.3.1.4).

Abbildung 5.32.B zeigt die positiv-Ionen-NanoES-MS-Analyse des Serin-phosphorylierten HSP C⁸¹LNRQLpS⁸⁷SGVSEIR⁹⁴ (120 pmol·μl⁻¹ in wässriger 50 % ACN, 1 % Ameisensäure (v/v)). Sowohl das [M+2H]²⁺-Quasimolekülion (*m/z* 821,4) als auch das dimere, dreifach geladene [2M+3H]³⁺-Quasimolekülion (*m/z* 1094,4) des Phosphopeptids konnten detektiert werden. Die Erhöhung des Q0-Offset-Potentials (-30 V) bewirkte die kollisionsaktivierte Fragmentierung der Phosphopeptidionen (API-CID). Durch die Gasphasen-Dephosphorylierung (-H₃PO₄, 98 Da) kam es zur Bildung von [M+2H-H₃PO₄]²⁺-Neutralverlust-Fragmentionen bei *m/z* 772,4 (Abb. 5.32.C). Aus dem Phosphoserin bildete sich infolge der β-Eliminierung von Phosphorsäure Dehydroalanin. Die [M+2H-H₃PO₄]²⁺-Neutralverlust-Fragmentionen (*m/z* 772,4) wurden im nächsten Schritt in Q1 selektiert und mit Hilfe eines q2-CID (-40 V *Offset*) fragmentiert (Abb. 5.33). Mit Hilfe von SEQUEST konnte, unter Berücksichtigung des gebildeten Dehydroalaninrestes (Da), die Position der Phosphorylierung an Serinrest 87 lokalisiert werden (Abb. 5.33 und 5.34). Von den 28 theoretisch berechneten einfach positiv geladenen b- und y-Fragmentionen konnten insgesamt 9 den Signalen im Tandem-Massenspektrum zugeordnet werden: b₂, b₃, b₅, b₁₀, b₁₁, y₂, y₅, y₇, y₁₃. Das Tandem-Massenspektrum des Gasphasen-dephosphorylierten Fragmentions enthielt im Vergleich zum [M+2H]²⁺-Phosphopeptid-Molekülion deutlich mehr sowie intensivere Fragmentionen (Daten werden nicht gezeigt).

5.6. NanoES-MS-Analyse der Phosphopeptide eines tryptischen *b*-Caseinverdaus

Bei den folgenden Experimenten wurden die zuvor etablierten NanoES-MS-Scantechniken (Kap. 5.4 und 5.5) zur Identifizierung der Phosphorylierungsstellen von β -Casein eingesetzt. Vor der Analyse wurde das β -Casein mit Hilfe von Trypsin enzymatisch in Lösung gespalten (50 pmol· μ l⁻¹ β -Casein in 50 mM NH₄HCO₃). Zur Aufnahme der Massenspektren wurde die Stammlösung mit der jeweils angegebenen Nanospraylösung 1:10 (v/v) verdünnt. Die tatsächliche Konzentration der Peptide betrug aufgrund unvollständiger sowie nicht exakter Spaltung jedoch weniger als 5 pmol· μ l⁻¹. Als saure Nanospraylösung wurde wässrige 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v), als alkalische Nanospraylösung wässrige 50 % MeOH, 1 % NH₃ (v/v) verwendet.

5.6.1. Die Phosphopeptide des tryptischen *b*-Caseinverdaus

Das bovine β -Casein (SWISS-PROT Eintragsnummer: P02666) enthält neben den 5 Serin-Phosphorylierungsstellen (Ser30/32/33/34/50, jeweils 100 % phosphoryliert) zahlreiche Kohlenhydrat-Modifikationen. Die Reinheit des Proteins war mit > 80 % (Elektrophorese) angegeben. Bei der theoretischen Spaltung mit Trypsin resultierten zwei phosphorylierte, kohlenhydratfreie Peptide (Tab. 5.4).

1	11	21	31	41
MKVLILACLV	ALALARELEE	LNVPGEIVES	LSSSEESITR	INKKIEKFQS
51	61	71	81	91
EEQQQTEDEL	QDKIHPFAQT	QSLVYFPFGP	IPNSLPQNIP	PLTQTPVVVP
101	111	121	131	141
PFLQPEVMGV	SKVKEAMAPK	HKEMPFKYP	VEPFTESQSL	TLTDVENLHL
151	161	171	181	191
PLPLLQSWMH	QPHQPLPPTV	MFPPQSVLSL	SQSKVLPVPQ	KAVPYPQRDM
201	211	221		
PIQAFLLYQE	PVLGPVRGPF	PIIV		

Abb. 5.35. Darstellung der Aminosäuresequenz des 5-fach-Serin-phosphorylierten (Ser30/32/33/34/50) bovinen *b*-Caseins. Die phosphorylierten Aminosäurereste sind grau unterlegt. Quelle: MS-Digest 3.1.1, ProteinProspector 3.2.1© Copyright (1995-1999) The Regents of the University of California. <http://www.prospector.ucsf>; pI 5,26; M_w 25.107,5 Da.

Tab. 5.4. Theoretisch berechnete Phosphopeptide des tryptisch verdauten *b*-Caseins.

Position Start	Ende	[M+H] ⁺ (mi) ⁽¹⁾	Mod. ⁽²⁾	MC ⁽³⁾	Sequenz
48	63	2061,8	1PO4	0	FQpSEEQQQTEDELQDK ⁽⁴⁾
45	63	2432,1	1PO4	1	IEKFQpSEEQQQTEDELQDK
17	40	2966,2	4PO4	0	ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR
16	40	3122,3	4PO4	1	RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR

(1) monoisotopische Molekulargewichte der einfach protonierten Peptide

(2) nur Phosphorylierungen berücksichtigt

(3) Missed Cleavage (Protease verpasst eine Schnittstelle)

(4) Phosphoserin pS

5.6.2. Positiv-Ionen-NanoES-MS unter sauren Bedingungen

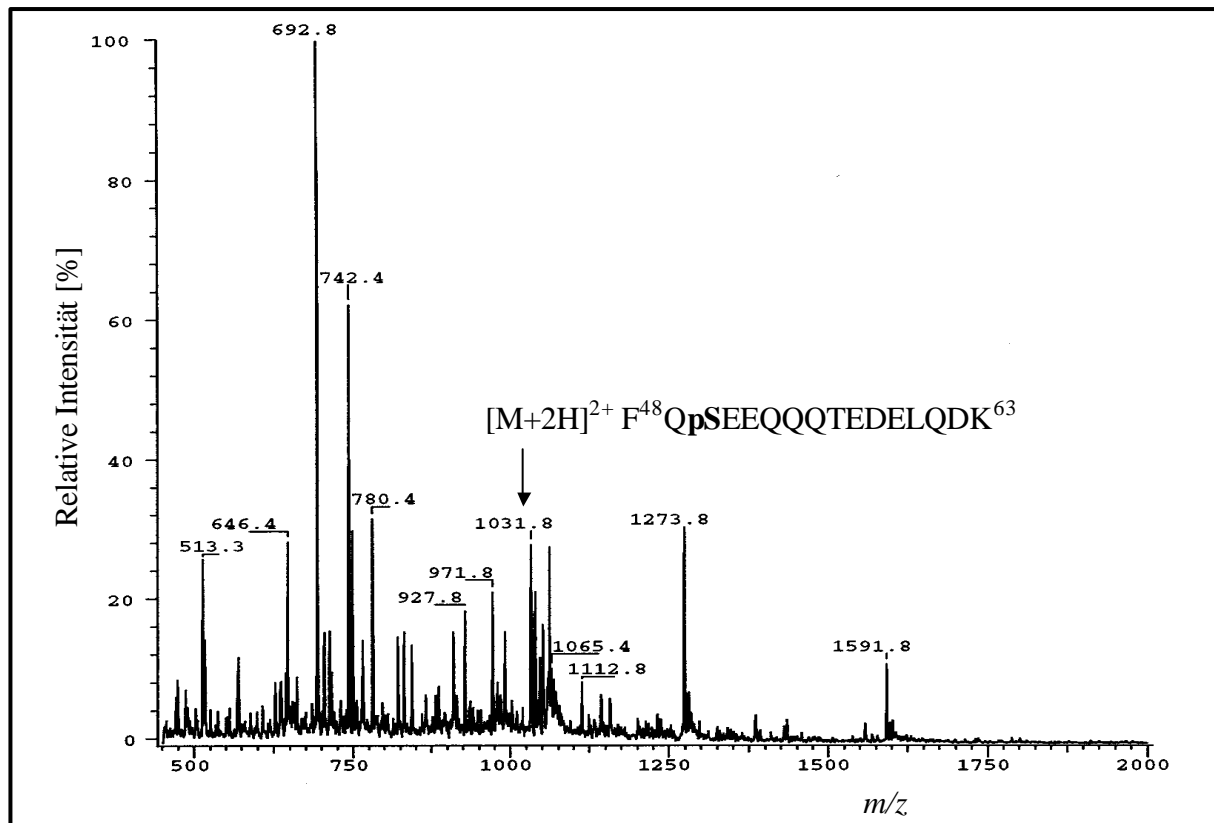


Abb. 5.36. Positiv-Ionen-NanoES-Massenspektrum (TSQ 700), welches von dem tryptisch verdauten β -Casein aufgenommen wurde ($5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v)). Bedingungen: -800 V NanoES-Spannung; Q1 Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; Profil-Modus; 12 Scans.

Abbildung 5.36 zeigt das positiv-Ionen-NanoES-MS-Übersichtsspektrum eines tryptischen β -Caseinverdaus ($5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v)). Eine Entsalzung der Probe vor der NanoES-MS-Bestimmung war nicht notwendig. Trotz der relativ kurzen Aufnahmezeit (36 sec, 12 Scans) konnten intensive Peptidionensignale ermittelt werden. Das β -Casein ist zwar ein relativ kleines Protein (ca. 25 kDa), bei seiner enzymatischen Spaltung mit Trypsin erhält man jedoch eine komplexe Mischung unterschiedlicher Peptide (Abb. 5.36). Der Großteil, der im NanoES-Massenspektrum ermittelten Signale konnte den entsprechenden $[M+H]^+$ - und $[M+2H]^{2+}$ -Peptidionen, unter anderem auch den entsprechenden Phosphopeptiden, zugeordnet werden (Tab. 5.5). Das einfach-Serin-phosphorylierte Peptid $F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$ konnte anhand des $[M+2H]^{2+}$ -Molekülions bei m/z 1031,8 identifiziert werden. Das vierfach-Serin-phosphorylierte Peptid $R^{16}ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR^{40}$ konnte anhand des $[M+3H]^{3+}$ -Molekülions bei m/z 1041,8 identifiziert werden. Aufgrund der zahlreich vorhandenen, stark heterogenen Kohlenhydratmodifikationen konnten nicht alle im Massenspektrum ermittelten Ionensignale den entsprechenden theoretisch berechneten Peptidmassen zugeordnet werden.

Tab. 5.5. Übersicht der mit Hilfe des NanoES-MS-Experimentes (Abb. 5.36) ermittelten tryptischen Peptide des tryptischen **b**-Caseinverdaus.

Position		best.	theoret.	Dm	Mod ⁽²⁾	MC ⁽³⁾	Sequenz
Start	Ende	[M+H] ⁺ (mi) ⁽¹⁾	[M+H] ⁺ (mi) ⁽¹⁾				
44	47	517,3	517,3	0,0		1	KIEK
115	120	646,4	646,3	0,1		0	EAMAPK
218	224	742,4	742,5	0,1		0	GPFPIIV
123	128	748,4	748,4	0,0		0	EMPFPK
185	191	780,4	780,5	0,1		0	VLPVPQK
192	19	830,6	830,5	0,1		0	AVPYPQR
48	63	2062,6 1031,8 [M+2H] ²⁺	2061,8	0,8	1PO4	0	FQ ^p SEEQQQTEDELQ DK ⁽⁴⁾
16	40	3123,4 1041,8 [M+3H] ³⁺	3122,3	0,9	4PO4	1	RELEELNVPGEIVE ^p S L ^p S ^p S ^p SEESITR
129	184	6364,2 1591,8 [M+4H] ⁴⁺	6359,3	4,9		0	YPVEPFTESQSLTLTD VENLHLPLPLLQSW MHQPHQPLPPTVMFP PQSVLSLSQSK

(1)-(4) siehe Tab. 5.4.

5.6.3. Detektion der Phosphopeptide mit Hilfe der Neutralverlust-Scantechnik (49 Da)

Phosphorylierte Peptide können mit Hilfe der positiv-Ionen-Neutralverlust-Scantechnik selektiv in komplexen Peptidmischung detektiert werden. Mit einem 49 Da Neutralverlust-Scan können jedoch nur zweifach geladene [M+2H]²⁺-Phosphopeptidionen detektiert werden (Bildung von [M-H₃PO₄+2H]²⁺-Neutralverlust-Fragmentationen im Abstand von 49 Th).

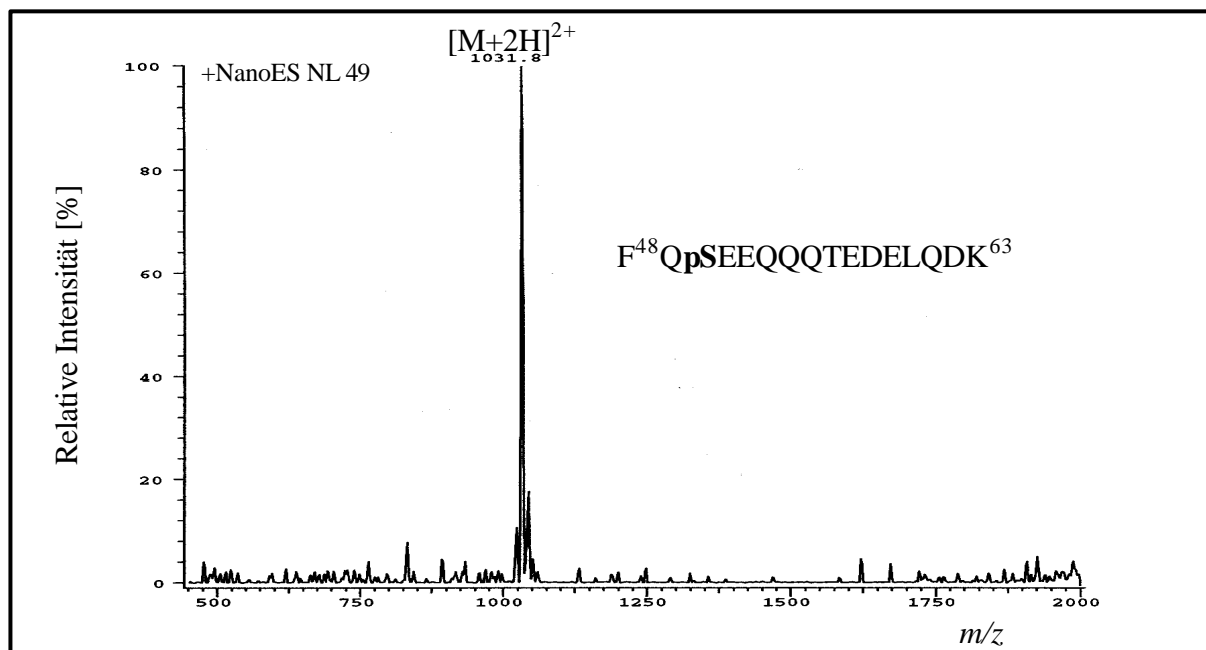


Abb. 5.37. Positiv-Ionen-NanoES-MS-Neutralverlust-Massenspektrum, welches von dem tryptisch verdauten **b**-Casein (5 pmol μ l⁻¹ in wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v))

ermittelt wurde. Zur Detektion zweifach positiv geladener Phosphopeptidionen wurde auf einen Neutralverlust von 49 Da gescannt. Bedingungen: -800 V NanoES-Spannung; Neutralverlust-Scan: Q1 Scan im Bereich von 450-2050 m/z; MS/MS in q2: -49 V Kollisions-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 Scan um 49 m/z gegenüber Q1 versetzt im Bereich von 400-2000 m/z in 3,5 sec; 100 Scans.

Phosphopeptidionen verlieren beim positiv-Ionen-q2-CID infolge einer β -Eliminierung Phosphorsäure (98 Da). Bei zweifach geladenen Phosphopeptidionen kommt es dadurch zur Bildung von $[M-H_3PO_4+2H]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentationen in einem Abstand von 49 Th zu den Elternionen (Kap. 2.5.3.3.3). In dem vorliegenden Experiment konnte mit Hilfe der Neutralverlust-Scantechnik auf 49 Da das einfach-Serin-phosphorylierte Peptid $F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$ anhand seines $[M+2H]^{2+}$ -Quasimoleküliions bei m/z 1031,8 detektiert werden. Im Vergleich zum NanoES-MS-Übersichtsspektrum (Abb. 5.36) erscheint im Neutralverlust-Spektrum lediglich das $[M+2H]^{2+}$ -Quasimoleküliion (m/z 1031,8) des Phosphopeptids. Somit konnte bei dem eingestellten CID-Offset (-49 V) lediglich das mono-phosphorylierte Peptid, nicht aber das vierfach-phosphorylierte Peptid detektiert werden.

5.6.4. Negativ-Ionen NanoES-MS unter sauren Bedingungen

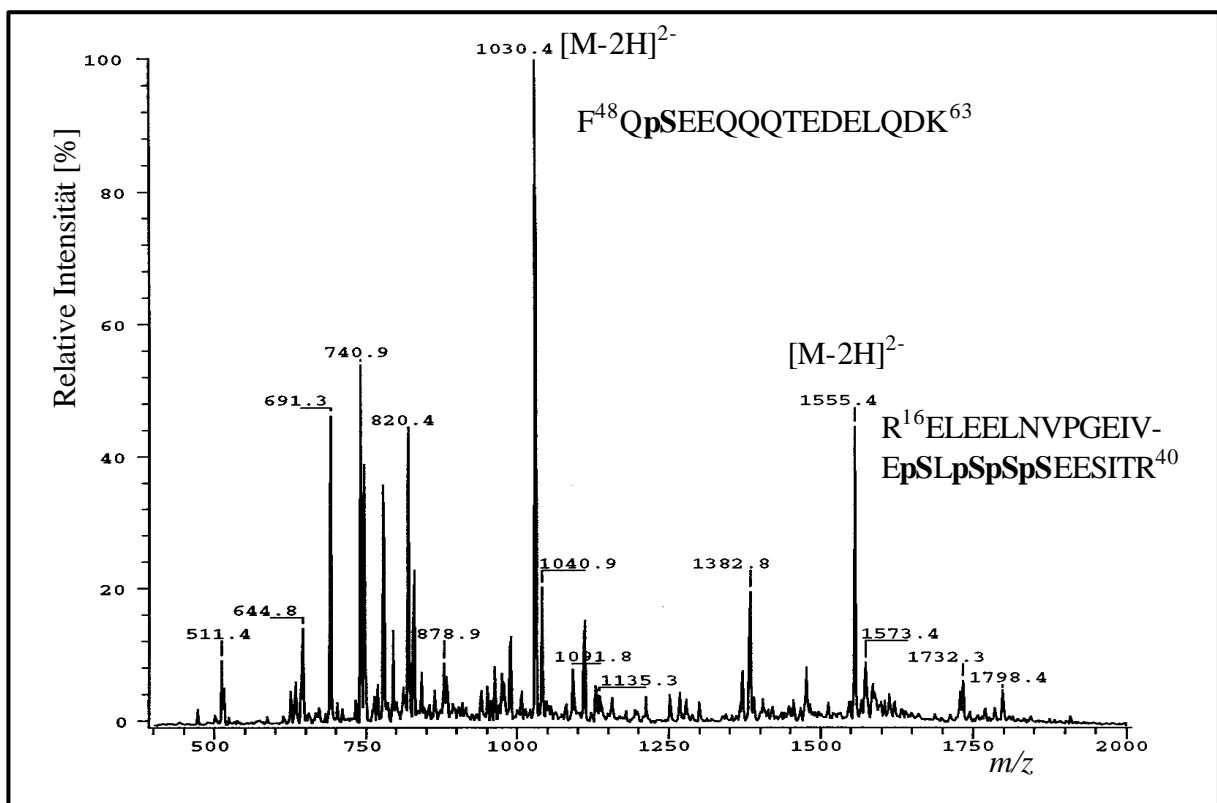


Abb. 5.38. Negativ-Ionen-NanoES-Massenspektrum (TSQ 700), welches von dem tryptisch verdauten **b**-Casein ($5 \text{ pmol} \mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v)) ermittelt wurde. Bedingungen: +700 V NanoES-Spannung; Q1 Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; 20 Scans.

Die Peptidionen konnten trotz saurer Bedingungen (5 % Ameisensäure) im negativen Ionenmodus detektiert werden (Abb. 5.38, *Wrong-Way-Round*-Effekt). Durch den Wechsel der Ionisierungspolarität (positiv nach negativ) erfolgte eine deutliche Änderung der Intensität

der ermittelten Peptidionensignale (Abb. 5.38). Im positiven Ionenmodus erzeugten die Phosphopeptide im Vergleich zu den nicht-phosphorylierten Peptiden nur sehr wenig intensive $[M+2H]^{2+}$ -Molekülionensignale (Abb. 5.36). Nach dem Wechsel in den negativen Ionisierungsmodus erhöhte sich die Intensität der $[M-2H]^{2-}$ -Phosphopeptidionen im Vergleich zu den übrigen Peptidionensignalen erheblich (Abb. 5.38). Für die $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülionen der einfach und vierfach-phosphorylierten Peptide (m/z 1030,4 bzw. 1555,4) konnte ein S/N-Verhältnis von 100 bzw. 50 ermittelt werden. Aufgrund der Phosphatgruppen ionisierten die Phosphopeptide im negativen Ionenmodus somit deutlich besser (vgl. die Intensitäten der $[M-2H]^{2-}$ -Phosphopeptidionen). Die Phosphopeptide konnten durch den Vergleich zwischen den ermittelten und den theoretisch berechneten Massen der Peptidionen identifiziert werden. Das einfach-Serin-phosphorylierte Peptid $F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$ konnte anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions bei m/z 1030,4, das vierfach-Serin-phosphorylierte Peptid $R^{16}ELEELNVPGEIVpSLpSpSpSpSE-ESITR^{40}$ anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions bei m/z 1555,4 identifiziert werden.

5.6.5. Detektion der Phosphopeptide mittels m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik unter sauren Bedingungen

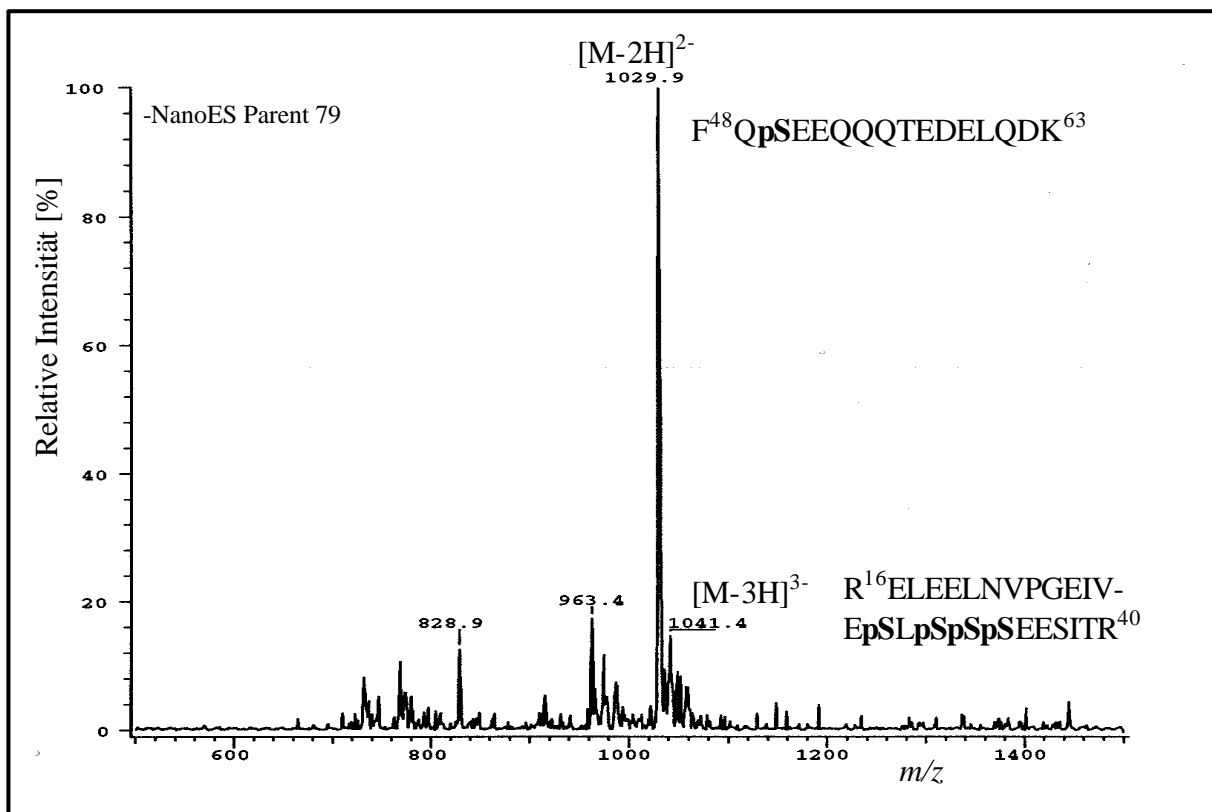


Abb. 5.39. Negativ-Ionen-NanoES-MS-Vorläuferionen-Scan-Massenspektrum (TSQ 700), welches von dem tryptisch verdauten **b**-Casein ($5 \text{ pmol} \mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v)) ermittelt wurde. Zur Detektion phosphorylierter Peptide wurde mit Hilfe der Vorläuferionen-Analyse auf $[PO_3]^-$ (m/z 79) gescannt. Bedingungen: + 700 V NanoES-Spannung; Vorläuferionen-Scan: Q1 Scan im Bereich von 500-1500 m/z in 3 sec; MS/MS in q2: +80 V Kollisions-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 SIM auf m/z 79; 200 Scans.

Mit Hilfe der negativ-Ionen-NanoES-MS m/z 79-Vorläufer-Ionen-Scantechnik ($[\text{PO}_3^-]$) konnten die beiden tryptischen Phosphopeptide des verdauten β -Caseins detektiert werden (Abb. 5.39). Das einfach-Serin-phosphorylierte Peptid $\text{F}^{48}\text{QpSEEQQQTEDELQDK}^{63}$ konnte anhand seines $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Quasimoleküliens bei m/z 1029,9 identifiziert werden. Das vierfach-Serin-phosphorylierte Peptid $\text{R}^{16}\text{ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR}^{40}$ konnte anhand seines $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ -Quasimoleküliens bei m/z 1041,4 identifiziert werden. Das $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Ion (m/z 1029,9) des mono-phosphorylierten Peptids erzeugte bei dem eingestellten CID-Offset von 80 V ein siebenfach intensiveres Signal im Vergleich zum $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ -Ion (m/z 1041,1) des vierfach-phosphorylierten Peptids. Die Kollisionsaktivierung führte neben der Spaltung der O-P-Phosphoesterbindung (Bildung des $[\text{PO}_3^-]$ -Fragmentions) auch zur Fragmentierung der Peptidbindungen entlang des Peptidrückgrates. Somit konnten bei der Vorläuferionen-Analyse auch phosphatgruppenhaltige Fragmentionen detektiert werden (z.B. m/z 963,4).

5.6.6. Negativ-Ionen-NanoES-MS unter alkalischen Bedingungen

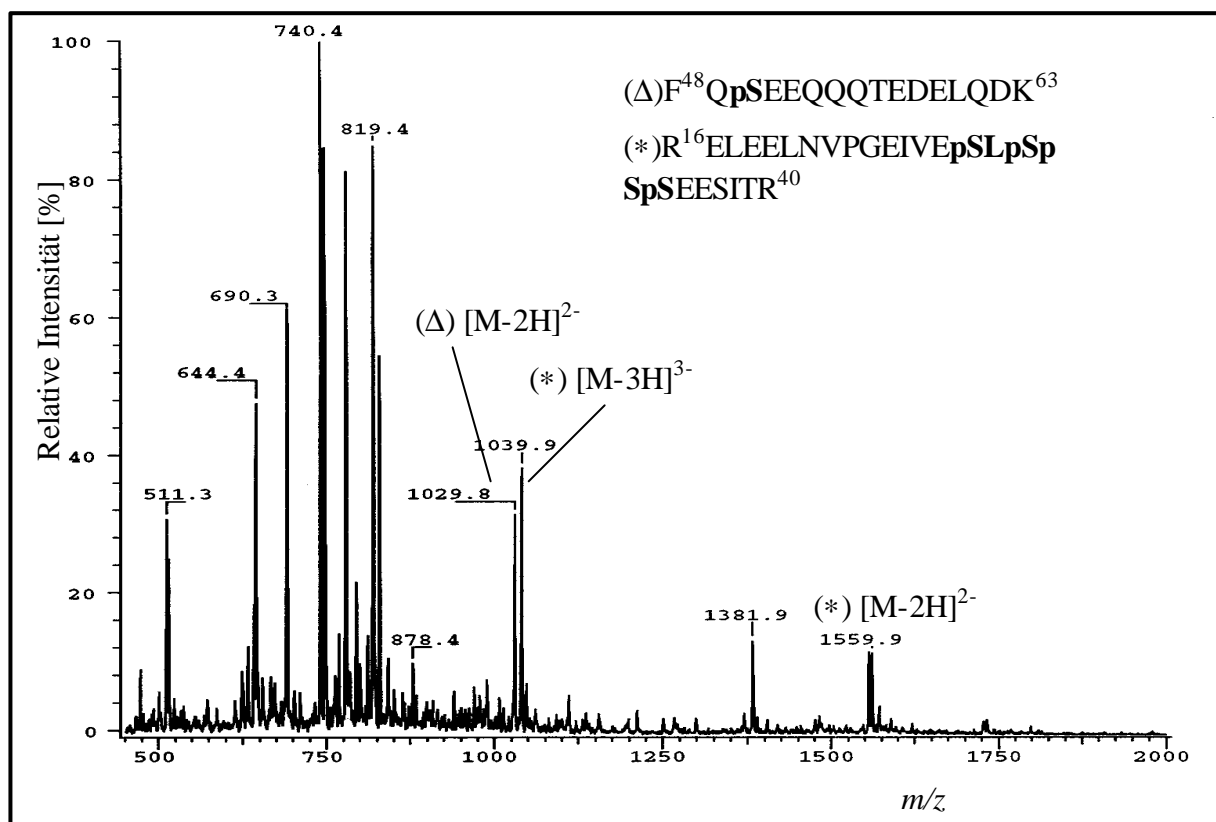


Abb. 5.40. Negativ-Ionen-NanoES-Massenspektrum (TSQ 700), welches von dem tryptisch verdauten β -Casein ($5 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 1 % NH_3 (v/v)) ermittelt wurde. Bedingungen: +600 V NanoES-Spannung; Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; 20 Scans. Quasimolekülionen der einfach- (Δ) bzw. vierfach- ($*$) Serin-phosphorylierten tryptischen Peptide.

Bei der negativ-Ionen-NanoES-MS-Analyse unter alkalischen Bedingungen (Abb. 5.40) konnten zahlreiche ein- und mehrfach negativ geladene Peptidionen detektiert werden. Entsprechend Kap. 5.6.2 konnten die negativ geladenen Ionen den theoretisch berechneten tryptischen Peptiden zugeordnet werden. Im Vergleich zum positiv-Ionen-NanoES-MS-Experiment (Abb. 5.36) ionisierten insbesondere die phosphorylierten Peptide unter den

alkalischen negativ-Ionen-Bedingungen deutlich besser. Das einfach-phosphorylierte Peptid $F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$ konnte anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimoleküliions bei m/z 1029,9 und das vierfach-phosphorylierte Peptid $R^{16}ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR^{40}$ anhand seiner zweifach bzw. dreifach negativ geladenen $[M-2H]^{2-}$ - bzw. $[M-3H]^{3-}$ -Quasimoleküliionen bei m/z 1039,9 bzw. m/z 1559,9 identifiziert werden (Abb. 5.40). Durch die Änderung des pH-Wertes und der Ionisierungspolarität konnte die im positiven Ionenmodus (Abb. 5.36) beobachtete Unterdrückung (*Quenching*) der Phosphopeptidionen umgekehrt werden. Im Vergleich zu dem positiv-Ionen-NanoES-MS-Experiment erzeugten die Phosphopeptide bei der negativ-Ionen-Analyse, sowohl unter sauren (Abb. 5.38) als auch unter alkalischen (Abb. 5.40) Bedingungen, deutlich intensivere Signale. Für die $[M-2H]^{2-}$ -Phosphopeptidionen konnten unter alkalischen Bedingungen 3-4fach höhere absolute Intensitäten im Vergleich zu den sauren Bedingungen beobachtet werden. Aufgrund der besseren Ionisierung der Phosphopeptide erhöhte sich automatisch auch die Detektionsempfindlichkeit der Phosphopeptide bei der Vorläuferionen-Analyse (Abb. 5.41).

5.6.7. Detektion der Phosphopeptide mittels m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik unter alkalischen Bedingungen

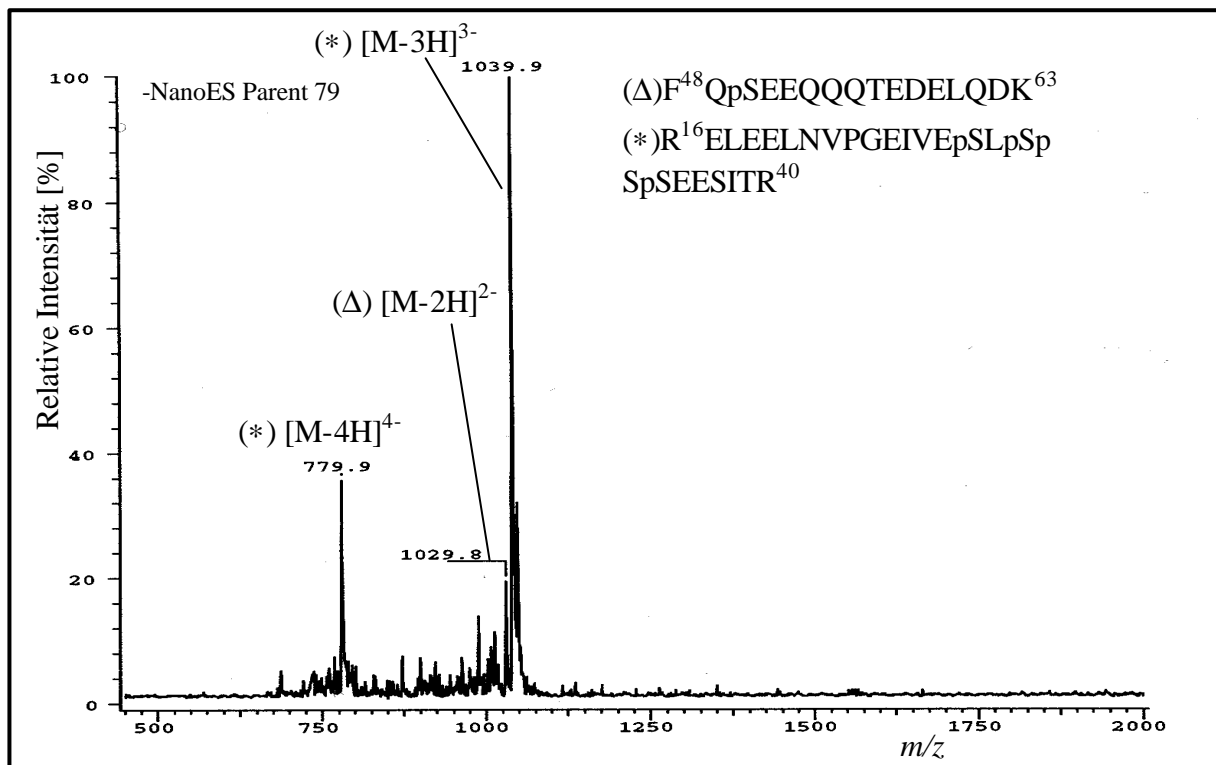


Abb. 5.41. Negativ-Ionen-NanoES-Vorläuferionen-Massenspektrum (TSQ 700), welches von dem tryptisch verdauten β -Casein ($5 \text{ pmol} \mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, 1 % NH_3 (v/v)) aufgenommen wurde. Zur Detektion phosphorylierter Peptide wurde mit Hilfe der Vorläuferionen-Analyse auf $[PO_3]^-$ (m/z 79) gescannt. Bedingungen: +700 V NanoES-Spannung; Vorläuferionen-Scan: Q1 Scan im Bereich von 500-2000 m/z in 3 sec; MS/MS in q2: 80 V Kollisions-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 SIM auf m/z 79; 100 Scans.

Mit Hilfe der alkalischen negativ-Ionen-NanoES-MS m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik ($[PO_3]^-$, 80 V CID-Offset) konnten die tryptischen β -Casein-Phosphopeptide spezifisch in der komplexen Verdauungsmischung detektiert werden (Abb. 5.41). Das einfach-Serin-

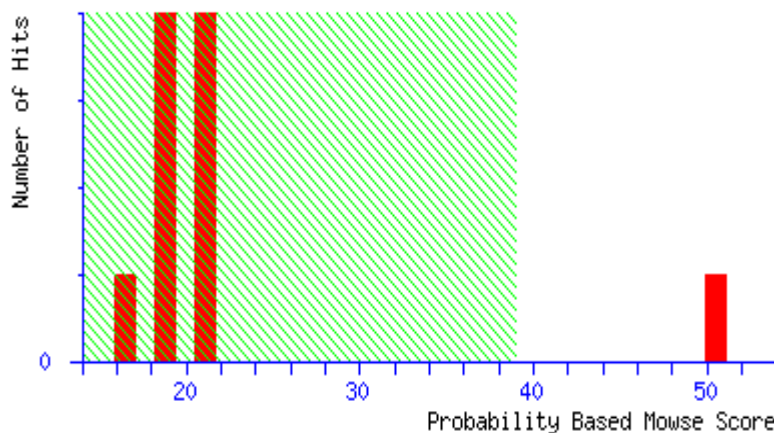
phosphorylierte Peptid $F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$ konnte anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimoleküls, bei m/z 1029,8 und das vierfach-Serin-phosphorylierte Peptid $R^{16}ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR^{40}$ anhand seiner $[M-3H]^{3-}$ - und $[M-4H]^{4-}$ -Quasimolekülen, bei m/z 1039,9 bzw. m/z 779,9 identifiziert werden. Im Vergleich zu der unter sauren Bedingungen durchgeführten Vorläuferionen-Analyse (Abb. 5.39) dominierte im Massenspektrum nicht das $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülion des einfach-phosphorylierten Peptids, sondern das $[M-3H]^{3-}$ -Ion des vierfach-phosphorylierten Peptids (5. 41).

5.6.8. Lokalisierung einer Phosphorylierungsstelle des *b*-Caseins

Zur Ermittlung einer Phosphorylierungsstelle des β -Caseins (tryptischer Verdau) wurde das $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion (m/z 1031,9) des tryptischen einfach-phosphorylierten Peptids $F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$ im positiven Ionenmodus sequenziert. Das Tandem-Massenspektrum wurde mit Hilfe von SEQUEST und Matrix Science ausgewertet (<http://www.matrixscience.com/>).

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 39 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

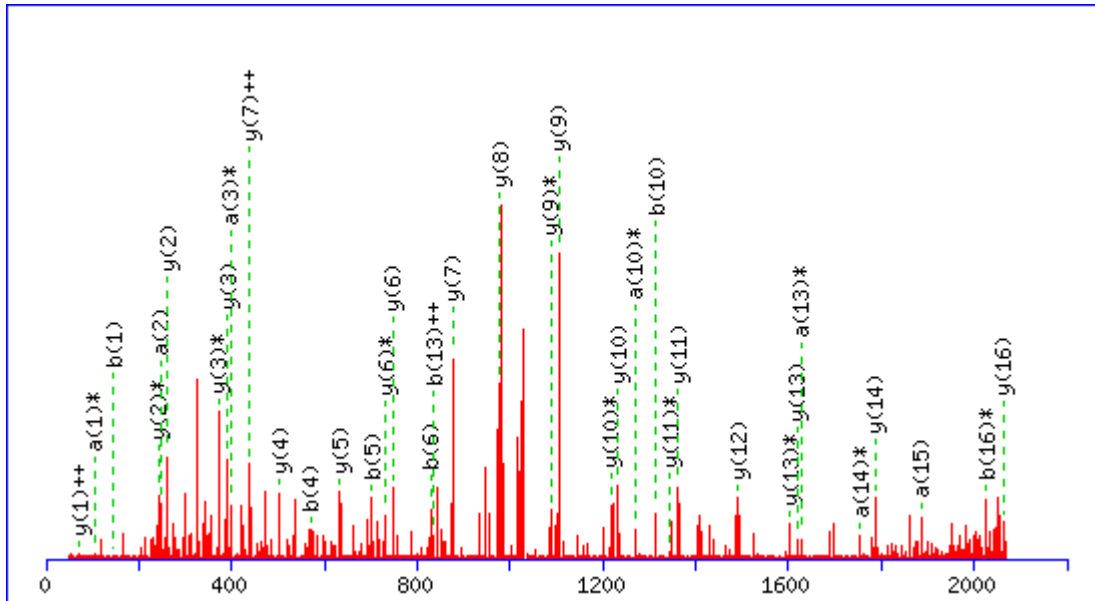


Peptide Summary Report

1. gi|7441526 Mass: 23515 Total score: 50 Peptides matched: 1
beta-casein variant CnH - bovine

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<u>1</u>	1031.90	2061.79	2060.82	0.97	0	50	1	FQSEEQQQTEDELQDK + 1 Phospho (STY)

Abb. 5.42. Tandem-MS/MS-basierende Identifizierung (TSQ 700) der Phosphorylierung an Ser50 des *b*-Caseins. Mascot-Auswertung der Tochterionen-Analyse des $[M+2H]^{2+}$ -Quasimoleküls bei m/z 1031,9 eines tryptischen *b*-Caseinverdaus. Der obere Teil der Abbildung gibt die ermittelten Scores der einzelnen Kandidaten graphisch wieder. Für den ersten Kandidaten (gi|7441526 beta-casein variant CnH-bovine) wurde ein signifikanter Score von 50 ermittelt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Identität des ersten Kandidaten sowie die ermittelte Peptidsequenz ($F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$). Bedingungen: MS/MS Ion Search; Trypsin als Enzym; Variable Modifikationen: Y, S, T können phosphoryliert sein; monoisotopische Massen; unbegrenzte Proteinmasse; ± 2 Da Peptidmassentoleranz; ± 2 Da Fragmentionentoleranz; keine verpasste Schnittstellen; Datenbank: NCBIInr; Gattung: Säugetiere (127031 Proteinsequenzen).



Monoisotopic mass of neutral peptide (Mr): 2060.82

Variable modifications:

S3:

Ions Score: 50 **Matches (Bold Red):** 41/135 fragment ions using 113 most intense peaks

Abb. 5.43. Graphische Darstellung des Tandem-MS/MS-Spektrums (TSQ 700), welches bei der Untersuchung des tryptischen **b**-Caseinverdaus von dem $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion bei m/z 1031,9 (F^{48} OpSEEQQQTEDELQDK 63) aufgezeichnet wurde. Das *.dta-File (ASCII-Format) wurde über das Internet auf dem Macot-Server ausgewertet. Die identifizierten Fragmentationen des ersten Proteinkandidaten (gi7441526 beta-casein variant CnH-bovine) sind gekennzeichnet. Von den 135 theoretisch berechneten Fragmentationen des MS/MS-Spektrums stimmten 41 mit denen des ermittelten Spektrums überein. Es traten hauptsächlich Fragmentationen des a-, b- und y-Typs auf.

#	Rank/Sp	(M+H) ⁺	Cn	deltCn	C*10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1 / 1	2061.8	1.0000	0.0000	3.9911	1090.9	18/30	CASB_BOVIN	(K)FQS*EEQQQTEDELQDK
2.	2 / 2	2061.8	0.7316	0.2684	2.9201	401.6	13/30	CASB_BOVIN	(E)KFQS*EEQQQTEDELQD
3.	3 / 3	2061.8	0.4329	0.5671	1.7276	203.4	10/30	CASB_BOVIN	(K)FQSEEQQQT*EDELQDK

1. CASB_BOVIN BETA CASEIN PRECURSOR. - BOS TAURUS (BOVINE).

Abb. 5.44. Resultat der SEQUEST-Analyse des Tochterionenspektrums, welches von dem $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion (m/z 1031,9) des einfach-Serin-phosphorylierten Peptids eines tryptischen **b**-Caseinverdaus aufgenommen wurde (Abb. 5.43). Die Phosphorylierung befindet sich am Serinrest 50 (F^{48} OpSEEQQQTEDELQDK 63). Für den ersten Kandidaten wurden folgende Werte berechnet: Sp 1090,9; C*10⁴ 3,9911; deltCn zwischen 1. und 2. Kandidaten 0,2684. Von den ermittelten Fragmentationen konnten 18 den 30 theoretisch berechneten einfach geladenen b- und y-Typ Ionen zugeordnet werden. Bedingungen: kein Enzym; monoisotopische Massen; unbegrenzte Proteinmasse; ± 2 Da Peptidmassentoleranz; ± 2 Da Fragmentionentoleranz; Variable Modifikation: S, T, Y können phosphoryliert sein; Datenbank: **b**-Casein-Proteinsequenz.

Mit Hilfe der phosphorylierungsspezifischen NanoES-MS-Scantechniken konnte das einfach-phosphorylierte tryptische β -Casein-Peptid ($F^{48}\text{QpSEEQQTEDELQDK}^{63}$) eindeutig identifiziert werden (Kap. 5.6.4-5.6.8). Zur Lokalisierung der Phosphorylierung wurde das $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Quasimolekülion des Phosphopeptids (m/z 1031,9) in einem positiv-Ionen-NanoES-Tandem-MS/MS-Experiment fragmentiert (Abb. 5.43). Mit Hilfe der Mascot-Analyse konnte das Peptid als das einfach-Serin-phosphoryliertes Peptid $F^{48}\text{QpSEEQQTEDELQDK}^{63}$ innerhalb der Sequenz des bovinen β -Caseins identifiziert werden. Die Position der Phosphorylierung (Serinrest 50) konnte aus den Abständen der nahezu vollständigen γ -Fragmentationenserie ermittelt werden (Abb. 5.42). Das Ergebnis konnte durch die SEQUEST-Analyse bestätigt werden (Abb. 5.44).

5.7 *On-line- μ IMAC/ESI-MS- und off-line- μ IMAC/NanoES-MS-Analyse von Phosphopeptiden*

Phosphorylierte Peptide binden im Vergleich zu nicht phosphorylierten Peptiden unter essigsäuren Bedingungen selektiv an Iminodiacetat-Agarose-Gel gebundene Eisen(III)-Ionen. Durch Erhöhung des pH-Wertes können die Phosphopeptide dann wieder von den immobilisierten Metallionen eluiert werden [350,351]. Die Bindung der Phosphopeptide erfolgt aufgrund der Wechselwirkung der Phosphatreste mit den immobilisierten (chelatierte) Eisen(III)-Ionen. Neben den Phosphopeptiden binden im allgemeinen auch saure [352] sowie Lysin-haltige [353] Peptide affin an immobilisierte Fe^{3+} -Ionen. Neville und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Phosphopeptide noch selektiver an Nitrilotriacetat (NTA) immobilisierte Fe^{3+} -Ionen binden können [336]. Phosphopeptide können mit Hilfe der IMAC-Technik (immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie) somit hoch spezifisch aus tryptischen Proteinverdau aufgereinigt werden (Kap. 2.5.3.2). Bei den folgenden Experimenten wurden die Phosphopeptide komplex zusammengesetzter Peptidmischungen mit Hilfe einer Metallchelate gefüllten μ IMAC-Kapillarsäule (neue Säulenfrittentechnik, Erdmann Rapp, Universität Magdeburg) aufkonzentriert. Zunächst wurden die μ IMAC-Bedingungen bezüglich Anbindung, -Reinigung und -Elution der Phosphopeptide optimiert. Anschließend wurde die Effizienz der μ IMAC-Technik in Kombination mit der *off-line*-NanoES-MS bzw. *on-line*-ESI-MS überprüft und verglichen.

5.7.1. *Versuchsanordnung der off-line- μ IMAC/NanoES-MS und on-line- μ IMAC/ESI-MS*

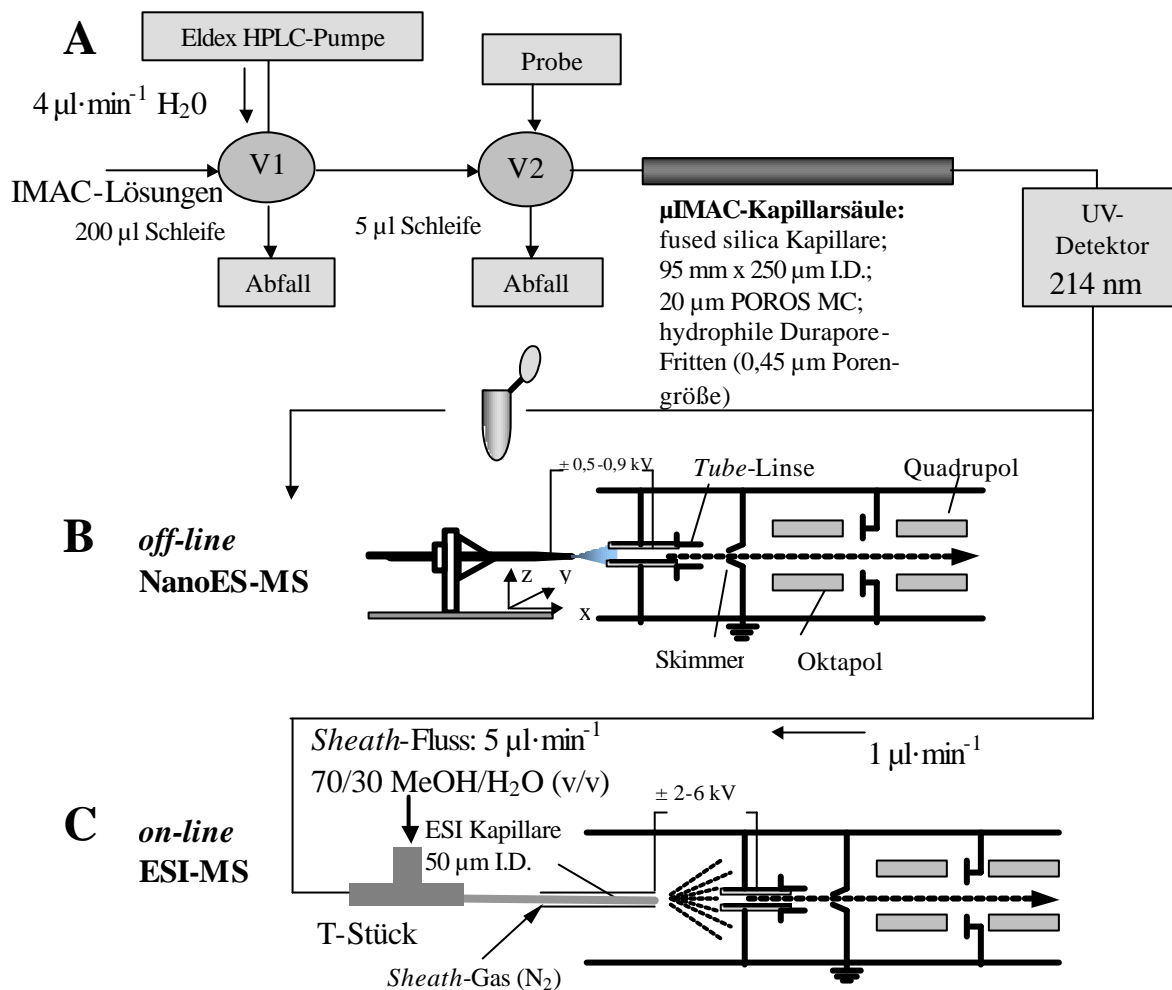


Abb. 5.45. (vorherige Seite) Instrumenteller Aufbau der off-line- μ IMAC/NanoES-MS und on-line- μ IMAC/ESI-MS. (A) Für die μ IMAC wurde eine Quarzkapillare (95 mm x 250 μ m I.D., hydrophile Durapore-Fritten, 0,45 μ m Porengröße) mit Metallchelat (POROS MC, 20 μ m Partikelgröße) gefüllt. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 4 μ l \cdot min⁻¹ (Eldex-HPLC-Pumpe) mit Hilfe zweier Rheodyne-Injektionsventile (Modell 8125) betrieben: V1 mit 200 μ l Probenschleife, V2 mit 5 μ l Probenschleife. Das Elutionsprofil wurde bei 214 nm UV-Absorption aufgezeichnet. (B) Off-line-Methode: Das Säuleneluat wurde manuell fraktioniert, im Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend mit Hilfe der positiv-Ionen-NanoES-MS analysiert (TSQ 700). (C) On-line-Methode: Das Säuleneluat wurde mit Hilfe eines T-Stücks bei einer Flussrate von 1 μ l \cdot min⁻¹ zusammen mit Sheath-Flüssigkeit direkt über das Standard ESI-Interface ins MS (TSQ 700) infundiert.

5.7.2. Identifizierung der Phosphopeptide eines tryptischen b-Caseinverdaus mittels off-line- μ IMAC/NanoES-MS

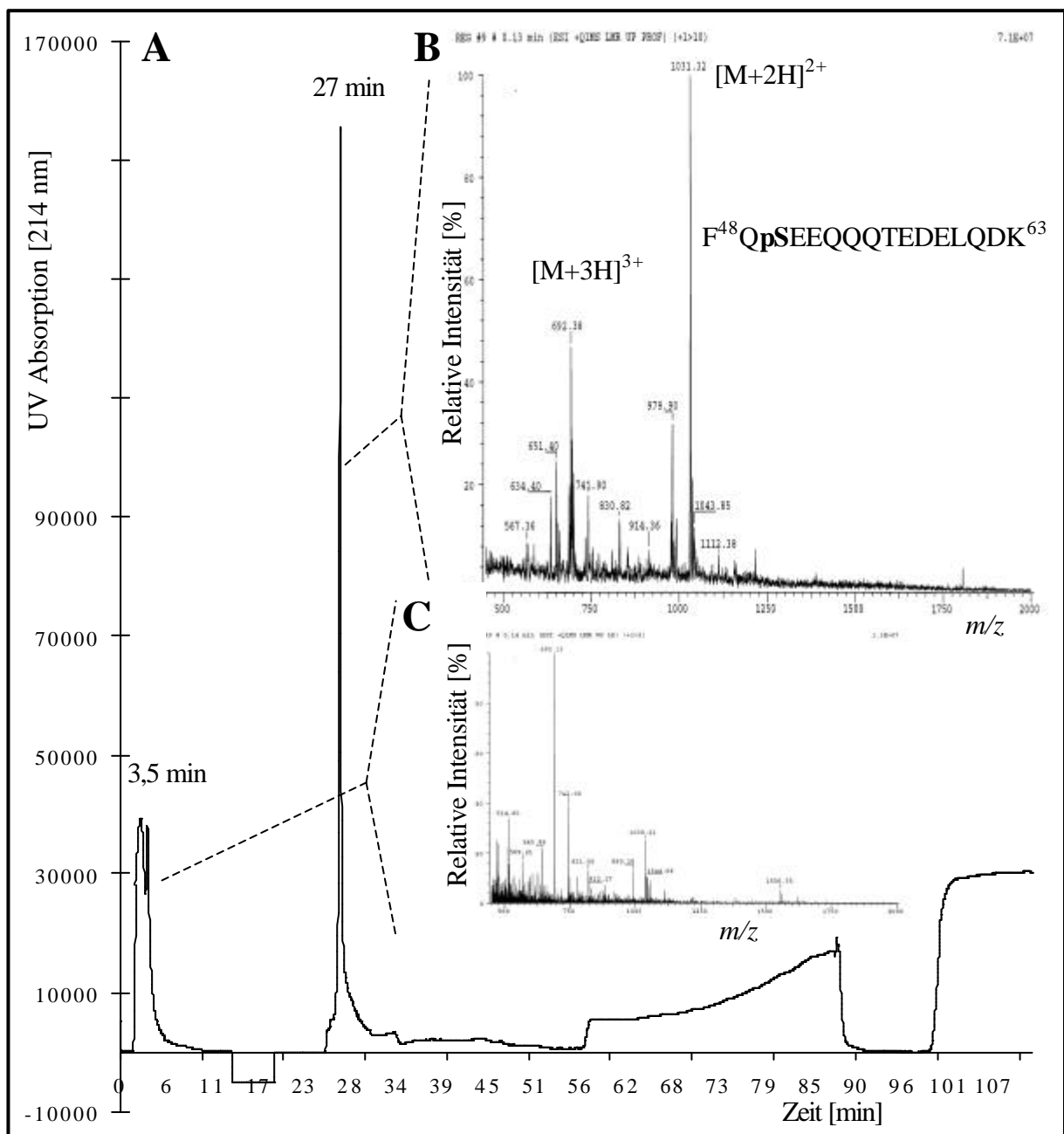


Abb. 5.46. (vorherige Seite) *Off-line- μ IMAC-Konzentration und NanoES-MS-Identifizierung der phosphorylierten Peptide eines tryptischen β -Caseinverdaus (62,5 pmol). Für die μ IMAC wurde eine Quarzkapillare (95 mm x 250 μ m I.D., hydrophile Durapore-Fritten, 0,45 μ m Porengröße) mit Metallchelat (POROS MC, 20 μ m Partikelgröße) gefüllt. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 4 μ l \cdot min⁻¹ betrieben (Abb. 5.45). Aktivierung der μ IMAC-Säule: 20 min spülen mit 0,1 M Essigsäure, 7 min spülen mit 0,1 M FeCl₃ in Wasser, 20 min spülen mit 0,1 M Essigsäure. Beladung der μ IMAC-Säule: 5 μ l tryptischer β -Caseinverdaus (12,5 pmol \cdot μ l⁻¹ in 0,1 M Essigsäure). (A) Elutionsprofil der μ IMAC-Säule (214 nm UV-Absorption): 0-12 min 0,1 M Essigsäure, 12-22 min H₂O, 22-32 min wässrige NH₄OH (pH 11), 32-52 min H₂O, 52-82 min 0,1 M EDTA, 82-92 min H₂O. (C) und (B) Positiv-Ionen-NanoES-Massenspektren (TSQ 700) der Peptide, welche bei den Elutionszeiten von 3,5 bzw. 27 min manuell fraktioniert wurden. Die gesammelten Fraktionen wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet, der Rückstand in jeweils 3 μ l wässriger 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v) aufgenommen und die Lösung in eine Nanospraynadel gefüllt. NanoES-MS-Bedingungen: positiver Ionenmodus; -700 V NanoES-Spannung; Q1 Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; 10 Scans bei (B), 21 Scans bei (C).*

Abbildung 5.46.A zeigt die UV-Spur (214 nm), welche bei der μ IMAC-Konzentration eines tryptischen β -Caseinverdaus aufgezeichnet wurde. Die Probeninjektion erfolgte bei Zeitpunkt 0 min im dargestellten Chromatogramm. Die Aktivierung der μ IMAC-Säule wurde nicht dargestellt. Das positiv-Ionen-NanoES-Massenspektrum des nach 3 min eluierenden UV-Peaks ist in Abb. 5.46.C zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt eluierten die tryptischen β -Caseinfragmente, welche nicht von der μ IMAC-Säule gebundenen wurden. Das Massenspektrum enthielt keine Signale phosphorylierter Peptidionen. Der UV-Peak, welcher nach 27 min eluierte (alkalische Bedingungen), wurde ebenfalls mit Hilfe der positiv-Ionen-NanoES-MS analysiert (Abb. 5.46.B). Im Massenspektrum sind deutlich die zweifach und dreifach positiv geladenen $[M+2H]^{2+}$ - bzw. $[M+3H]^{3+}$ -Quasimolekülonen (m/z 1031,3 bzw. m/z 692,4) des Serin-phosphorylierten Peptids F⁴⁸QpSEEQQQTEDELQDK⁶³ (2060,8 Da) zu sehen. Mit Hilfe der μ IMAC konnte das Phosphopeptid somit selektiv von den nicht phosphorylierten tryptischen Peptiden des β -Caseinverdaus isoliert werden. Unter den essigsäuren Bedingungen konnten lediglich die phosphorylierten Peptide an die μ IMAC-Säule binden, wogegen die nicht phosphorylierten Peptide bei diesem Schritt eluiert wurden (3,5 min Elutionszeit). Durch die Änderung des pH-Wertes (wässrige NH₄OH, pH 11) konnten die Phosphopeptide wieder von der μ IMAC-Säule eluiert werden (27 min Elutionszeit). Das vierfach Serin-phosphorylierte tryptische Peptid des β -Caseinverdaus (siehe Tab. 5.4) konnte bei diesem Experiment nicht detektiert werden.

5.7.3. *On-line- μ IMAC/ESI-MS-Phosphopeptid-Analyse*

Abbildung 5.47.A zeigt die UV-Spur (214 nm), welche während des *on-line- μ IMAC/ESI-MS-Experimentes*, einschließlich aller Spül-, Aktivierungs- und Elutionsschritte, aufgezeichnet wurde. Die molaren Extinktionskoeffizienten der verwendeten Lösungen waren bei der untersuchten Wellenlänge stark unterschiedlich. Demzufolge waren die Absorptionsunterschiede im ermittelten UV-Chromatogramm sehr groß (Abb. 5.47.A). Die μ IMAC-Säule wurde erst bei der Injektion der Probe (Zeitpunkt 44 min in der UV-Spur) an das ESI-MS angekoppelt. Durch die direkte Kopplung der μ IMAC-Säule mit dem ESI-MS konnte ein *Base-Peak*-Chromatogramm aufgenommen werden (BPC, Abb. 5.47.B und Abb. 5.48.A). Die Probe (5 μ l) enthielt 50 pmol eines tryptischen β -Caseinverdaus, 60 pmol Serin-phosphoryliertes HSP und 65 pmol Tyrosin-phosphoryliertes pp60 c-src (521-533) Peptidfragment, gelöst in 0,1 M Essigsäure. Die nicht von der μ IMAC-Säule gebundenen

Peptide wurden wie folgt eluiert: 0,1 M Essigsäure (12 min), H₂O (15 min), 30 % MeOH in H₂O (v/v) (9 min) und 30 % MeOH in wässriger NH₄OH (pH 10,76) (6 min). Nach etwa 3,5 min eluierten Peptide von der Säule und erzeugten das intensive Signal im *Base-Peak*-Chromatogramm. Zu diesem Zeitpunkt eluierten alle Peptide, welche nicht von der μ IMAC-Säule zurückgehalten wurden. Im aufsummierten ESI-Massenspektrum des BPC-Peaks sind deutlich die [MH]⁺-Molekülonen der tryptischen Verdaufragmente GPFPIIV (m/z 742,1), VLPVPQK (m/z 780,2) und AVPYPQR (m/z 830,2) zu sehen (Abb. 5.48.B und Tab. 5.6).

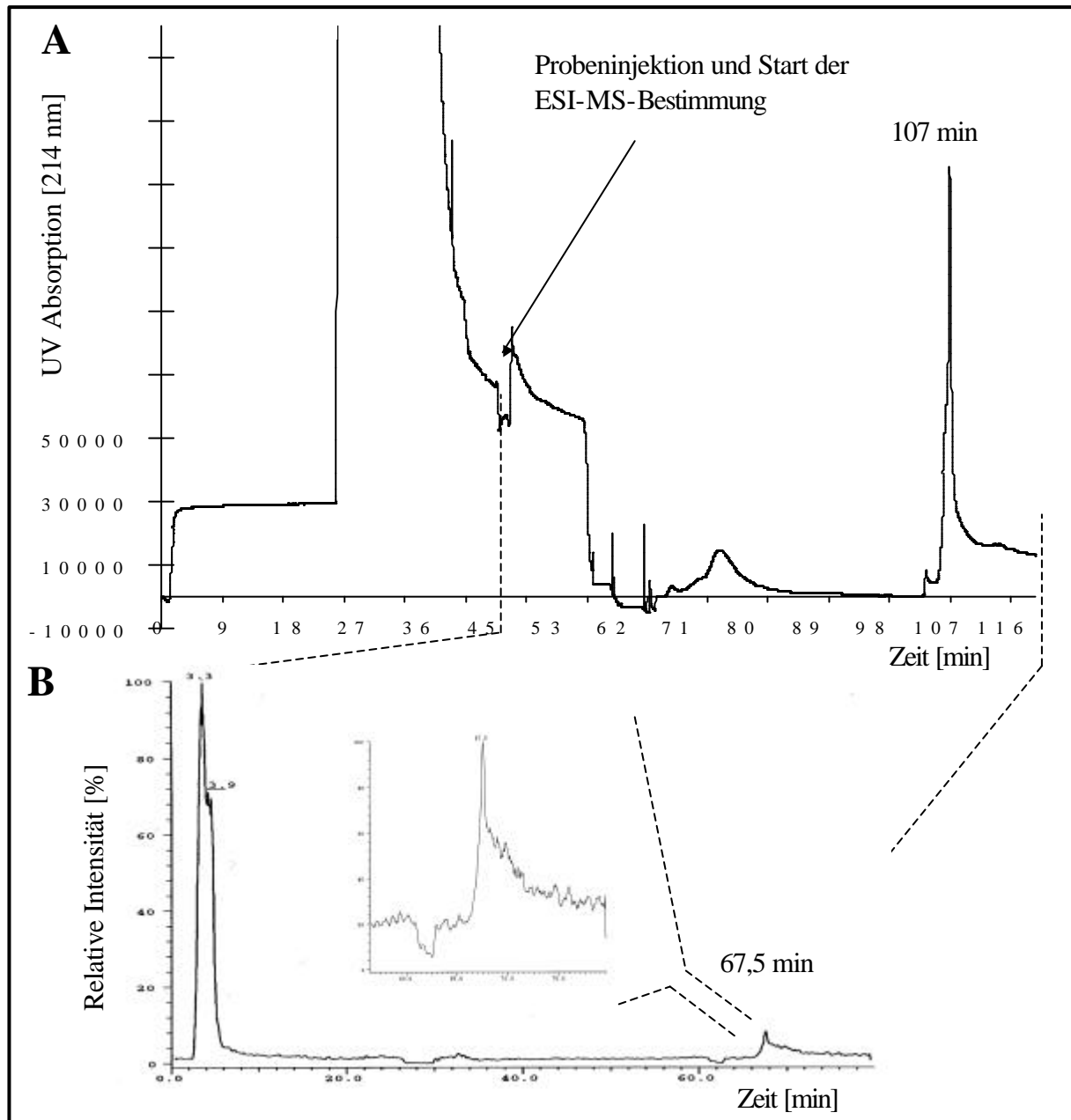


Abb. 5.47. On-line- μ IMAC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) einer Peptidmischung bestehend aus 50 pmol tryptisch verdaulichem **b**-Casein, 60 pmol Serin-phosphoryliertem HSP ($C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$, M_w 1640,8 Da) und 65 pmol Tyrosin-phosphoryliertem pp60 c-src-Peptidfragment ($T^{521}STEPpYQPGENL^{533}$, M_w 1542,3 Da) in 0,1 M Essigsäure. Für die μ IMAC wurde eine Quarzkapillare (95 mm x 250 μ m I.D., hydrophile Durapore-Fritten, 0,45 μ m Porengröße) mit Metallchelate (POROS MC, 20 μ m Partikelgröße) gefüllt. Die Säule

wurde bei einer Flussrate von $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ betrieben (Abb. 5.45). Aktivierung der μIMAC -Säule: 0-19 min spülen mit 0,1 M Essigsäure, 19-31 min spülen mit 0,1 M FeCl_3 in 0,1 M Essigsäure, 31-44 min spülen mit 0,1 M Essigsäure. Start der ESI-Messung und die Injektion der Probe erfolgte nach 44 min. Spülen der Säule: 42-54 min spülen mit 0,1 M Essigsäure, 53-68 min spülen mit H_2O , 68-77 min spülen mit 30 % MeOH in H_2O (v/v), 77-93 min spülen mit 30 % MeOH in wässriger NH_4OH (pH 10,76). Elution der Phosphopeptide: 93-119 min spülen mit wässriger NH_4OH (pH 11,0) bei einer Flussrate von $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. (A) Elutionsprofil der μIMAC -Säule (214 nm UV-Absorption). (B) Positiv-Ionen-Base-Peak-Chromatogramm des on-line- $\mu\text{IMAC/ESI-MS}$ -Experimentes. ESI-Bedingungen: positiver Ionenmodus; 4,5 kV ESI-Spannung; Q1 Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; beheizte Kapillare 200°C .

Durch Erhöhung des pH-Werts der Elutionslösung konnten die affin an die immobilisierten Metallionen gebundenen Phosphopeptide wieder von der μIMAC -Säule eluiert werden. Bei ihrer Elution erzeugten die Phosphopeptide ein weniger intensives Signal (67,5 min) im Base-Peak-Chromatogramm (Abb. 5.47.B entspricht einer Elutionszeit von 107 min in Abb. 5.47.A). Alle Phosphopeptide konnten anhand ihrer einfach oder mehrfach geladenen Molekülonen im ESI-Massenspektrum, welches über den BPC-Peak aufsummiert wurde identifiziert werden (Abb. 5.47.C bzw. Tab. 5.6). Das einfach Serin-phosphorylierte tryptische β -Caseinfragment $\text{F}^{48}\text{QpSEEQQQTEDELQDK}^{63}$ konnte anhand des $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Quasimolekülon bei m/z 1031,2, das vierfach Serin-phosphorylierte Peptid $\text{R}^{16}\text{ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR}^{40}$ durch das $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ -Quasimolekülon bei m/z 1042,3 identifiziert werden und beiden synthetischen Phosphopeptide ($\text{T}^{521}\text{STEPQpYQPGENL}^{533}$ und $\text{C}^{81}\text{LNRQLpSSGVSEIR}^{94}$) durch ihre $[\text{MH}]^+$ -Molekülonen bei m/z 1543,3 bzw. m/z 1639,7 identifiziert werden (Abb. 5.47.C bzw. Tab. 5.6).

Tab. 5.6. Auflistung der beim on-line- $\mu\text{IMAC/ESI-MS}$ -Experiment (Abb. 5.47 und 5.48) identifizierten tryptischen **b**-Caseinfragmente und synthetischen Peptide.

tryptische b -Caseinfragmente								
Position		best. $[\text{M}+\text{H}]^+$ (mi) ⁽¹⁾	theoret. $[\text{M}+\text{H}]^+$ (mi) ⁽¹⁾	Dm	R_t ⁽⁵⁾ [min]	Mod. ⁽²⁾	MC ⁽³⁾	Sequenz
Start	Ende							
218	224	742,1	742,5	0,4	3,0		0	GPFPIIV
185	191	780,2	780,5	0,3	3,0		0	VLPVPQK
192	19	830,6	830,5	0,1	3,0		0	AVPYPQR
48	63	2061,4	2061,8	0,4	67,5	1PO4	0	FQpSEEQQQTEDELQDK ⁽⁴⁾
16	40	3124,9	3122,3	1,6	67,5	4PO4	1	RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR
synthetische Phosphopeptide								
best. $[\text{M}+\text{H}]^+$ (mi) ⁽¹⁾		theoret. $[\text{M}+\text{H}]^+$ (mi) ⁽¹⁾	Dm	R_t ⁽⁵⁾ [min]	Mod. ⁽²⁾	Sequenz		
1543,8		1543,3	0,5	67,5	1PO4	TSTEPQpYQPGENL		
1640,8		1641,8	1,0	67,5	1PO4	CLNRQLpSSGVSEIR		

(1) (4) siehe Tab. 5.4

(2) Retentionszeit im ESI-Base-Peak-Chromatogramm

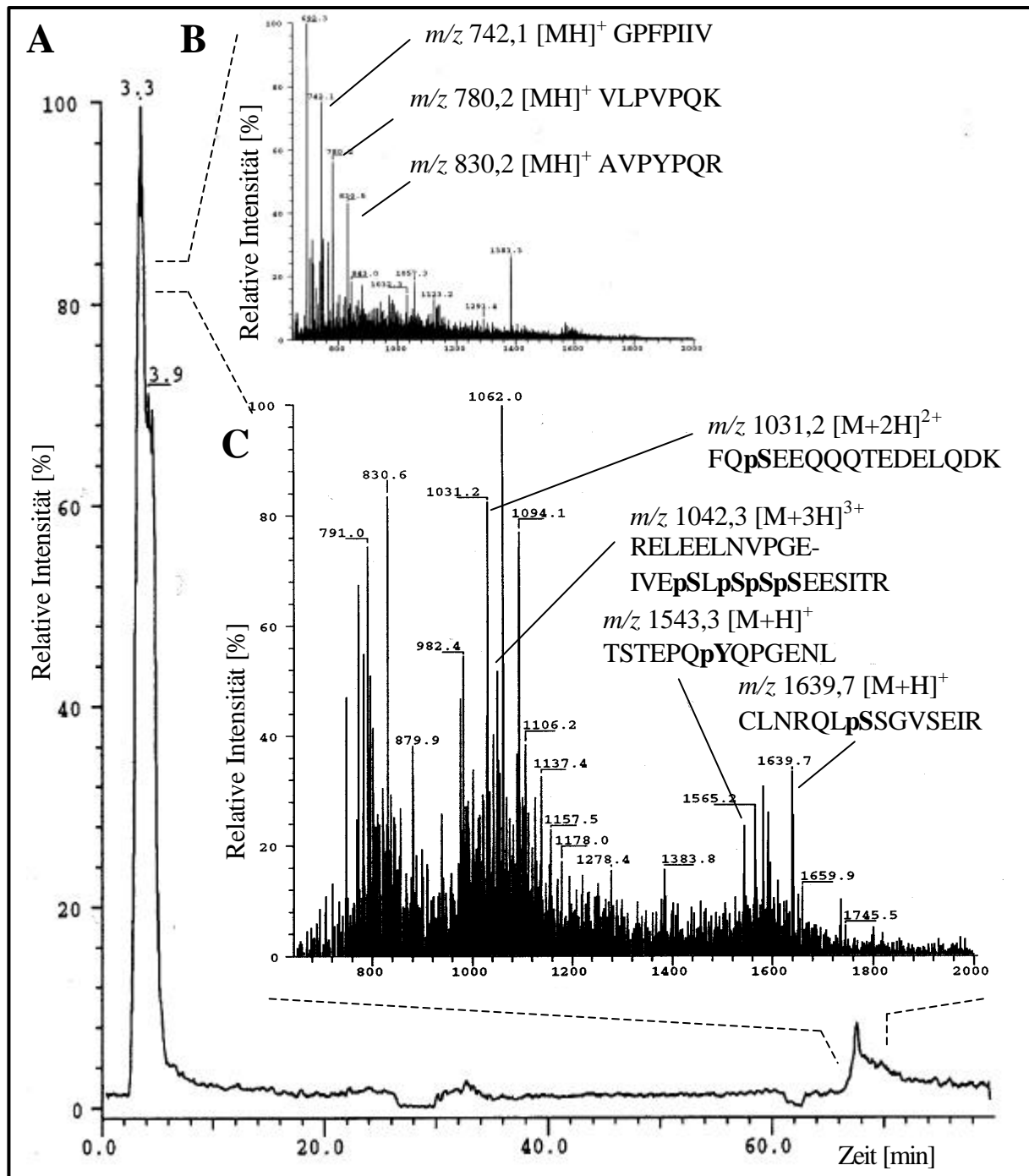


Abb. 5.48. On-line- μ IMAC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) einer Peptidmischung bestehend aus 50 pmol tryptisch verdautem **b**-Casein, 60 pmol Serin-phosphoryliertem HSP (C^{81} LNRQLpSSGVSEIR⁹⁴, M_w 1640,8 Da) und 65 pmol Tyrosin-phosphoryliertem pp60 c-src-Peptidfragment (T^{521} STEPpYQPGENL⁵³³, M_w 1542,3 Da) in 0,1 M Essigsäure (siehe Abb. 5.47). (A) Positiv-Ionen-Base-Peak-Chromatogramm. (B und C) Aufsummierte positiv-Ionen-ESI-Massenspektren der BPC-Signale bei 3,5 min bzw. 67,5 min. Bedingungen siehe Abb. 5.47.

Sowohl die synthetischen Phosphopeptide als auch die Phosphopeptide des β -Caseinverdaus konnten unter den essigsauren Bedingungen selektiv von der μ IMAC-Säule zurückgehalten werden (Abb. 5.47 und Abb. 5.48). Nicht phosphorylierte Peptide eluierten dabei schon zu Beginn der essigsauren Waschschriffe von der IMAC-Säule. Die affin an die immobilisierten Fe^{3+} -Ionen gebundenen Phosphopeptide konnten schließlich unter alkalischen Bedingungen (pH 11) wieder von der μ IMAC-Säule eluiert werden. Die nicht phosphorylierten Peptide erzeugten im *Base-Peak*-Chromatogramm das intensive Signal bei einer Elutionszeit von 3,5 min. Die Phosphopeptide erzeugten das weniger intensive BPC-Signal bei 67,5 min (Abb. 5.47.B). Beim Vergleich der aufsummierten positiv-Ionen-ESI-Massenspektren (Abb. 5.48.B und C) konnte der Intensitätsunterschied ebenso deutlich beobachtet werden. Das S/N-Verhältnis des Massenspektrums, welches bei der Elution der phosphorylierten Peptide aufgenommen wurde (Abb. 5.48.C), war deutlich niedriger im Vergleich zu den nicht-phosphorylierten Peptiden (Abb. 5.48.B). Die absoluten Intensitäten der detektierten Phosphopeptidionen war ebenso deutlich schlechter. Sowohl die phosphorylierten als auch die nicht-phosphorylierten Peptide wurden im positiven Ionisierungsmodus bestimmt. Da die Elution der Phosphopeptide unter alkalischen Bedingungen erfolgte, trat somit ein typischer *Wrong-Way-Round*-Effekt mit Unterdrückung der Ionensignale auf (Kap. 2.1.4.3).

Bei dem *on-line*-Experiment konnte nicht nur, wie bei dem *off-line*-Experiment das einfach-Serin-phosphorylierte tryptische β -Caseinfragment, sondern auch das vierfach-phosphorylierte Fragment detektiert werden (Tab. 5.6). Zudem konnte zum einen die Versuchsdauer aufgrund des entfallenen Trocknungsschrittes erheblich verkürzt und zum anderen die Analyse vollautomatisch durchgeführt werden. Mit Hilfe der *off-line*-NanoES-Technik (Abb. 5.46) konnte eine große Anzahl von MS-Scans (ohne *Wrong-Way-Round*-Effekt) akkumuliert werden, weshalb im Vergleich zu dem *on-line*- μ IMAC/ESI-MS-Verfahren (Abb. 5.48.C) deutlich bessere Spektren mit einem höherem S/N-Verhältnis beobachtet werden konnten.

5.8. Detektion von Phosphopeptiden mittels API-CID

Im Laufe der letzten Jahre entwickelte sich die Massenspektrometrie im Bereich der Mikro-Charakterisierung posttranslationaler Protein-Modifikationen, insbesondere der Proteinphosphorylierung, zu einem wichtigen analytischen Werkzeug. Klassische Phosphopeptid-Analyseverfahren wie die 2-D Dünnschichtchromatographie oder der Edman-Abbau radioaktiv $^{32/33}\text{P}$ -markierter Phosphoproteine werden deshalb vermehrt von MS-basierenden Methoden verdrängt. Insbesondere die *on-line*-LC/ESI-MS ermöglicht aufgrund ihrer Selektivität, Spezifität und Sensitivität neue analytische Strategien für ein radioaktivitätsfreies Phosphopeptid-*Screening*. Bei einem Triple-Quad-MS können Phosphopeptide mit Hilfe der unter CID-Bedingungen erzeugten phosphorylierungsspezifischen Markerionen selektiv in komplexen Peptidmischungen detektiert werden (Kap. 2.5.3.3). Durch Kollisionsaktivierung können bei Phosphopeptidionen die C-O-P-Phosphoesterbindungen gespalten werden. Im negativen Ionenmodus bilden sich dabei phosphorylierungsspezifische $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen bei m/z 79 bzw. m/z 97 (Kap. 2.5.3.3.1). Aufgrund der erforderlichen hohen Beschleunigungsspannung nimmt man an, dass es sich dabei um direkte Bindungsspaltungen handelt. Die $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen können sowohl durch Skimmer- als auch durch q2-CID (Vorläuferionen-Analyse) erzeugt werden [360-367,235,370,371]. Die negativ-Ionen-NanoES-MS-Vorläuferionen-Analyse auf m/z 79 [103,104] stellt mittlerweile eine etablierte Methode zur Identifizierung phosphorylierter Peptiden in nicht-aufgetrennten Proteinverdau dar [235,366,367,370,371]. Carr *et al.* konnten zeigen, dass sich die Detektionsempfindlichkeit durch Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung deutlich verbessern lässt [235,366,367,370,371]. Die Proteinverdau müssen vor ihrer NanoES-MS-Analyse jedoch entsalzt werden (RP-Mikro-Tips oder RP-HPLC). Die Mikro-Tip-Entsalzung hat zwar den Vorteil, dass sie nur sehr wenig Zeit in Anspruch nimmt, jedoch entstehen nicht aufgetrennte Peptidmischungen. Bei der MS-Analyse kommt es dadurch zur Unterdrückung von Peptidionensignalen (*Quenching*). Der Skimmer-CID (API-CID) hat gegenüber der Vorläuferionen-Analyse den Vorteil, dass eine *on-line*-LC/ESI-MS-Kopplung möglich ist. Komplexe Peptidmischungen können somit vor ihrer MS-Analyse aufgetrennt und Unterdrückungseffekte coeluierender Peptide somit vermieden werden. Die LC/ES-API-CID-MS-Phosphopeptid-Analyse erfolgt in der Regel unter sauren Bedingungen (TFA als Ionenpaarreagenz) [360-367]. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels sollten deshalb die MS-Bedingungen für die Bildung der phosphorylierungsspezifischen Markerionen unter TFA-sauren Bedingungen untersucht und optimiert werden. Mit Hilfe eines Hybrid-Scan-Verfahrens sollte die Methode schließlich zur Analyse von tryptisch gespaltenem phosphorylierten und dephosphorylierten β -Casein eingesetzt werden. Schließlich sollte die Empfindlichkeit der $\mu\text{LC/ESI-sCID}$ -Phosphopeptid-Analyse durch die Verwendung alkalischer LC-Bedingungen verbessert werden. Insbesondere die für die Markerionenbildung notwendigen, experimentellen Bedingungen sollten dabei optimiert und zur Detektion der phosphorylierten Peptide eines tryptischen β -Caseinverdau angewendet werden.

5.8.1. $\mu\text{LC/ESI-API-CID-MS}$ unter TFA-sauren Bedingungen

Die $\mu\text{LC/ESI-API-CID}$ -Hybrid-Scan-MS-Analyse phosphorylierter Peptide erfolgt aufgrund der RP-HPLC/MS-Kopplung unter TFA-sauren Bedingungen. Als phosphorylierungsspezifisches Markerion wird das $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmention (m/z 79), welches durch negativ-Ionen-API-CID erzeugt wird, herangezogen. Für die effiziente Bildung der m/z 79-Markerionen wurde deshalb zunächst das erforderliche Kollisions-*Offset*-Potential im Skimmer-Bereich (API-CID) ermittelt. Anschließend wurde ein vollautomatisches Hybrid-Scan-

Aufnahmeverfahren (ICL) erstellt und zur Analyse eines tryptischen β -Caseinverdaus eingesetzt.

5.8.1.1. Abhängigkeit der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Signalintensitäten vom Oktapol-Offset (API-CID) unter TFA-sauren Bedingungen

Die Intensitäten der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 und m/z 97), welche beim negativ-Ionen-ESI-API-CID phosphorylierter Peptide gebildet werden, sind zum einen vom pH-Wert der Spraylösung sowie vom Oktapol-Offset (API-CID) abhängig. Die effektivsten MS-Bedingungen (maximale Fragmentationausbeute) wurden mit Hilfe synthetischer Phosphopeptide unter TFA-sauren Bedingungen ermittelt. Die Intensitäten der Markerionen wurden dabei in Abhängigkeit des Oktapol-Offsets (API-CID) bestimmt.

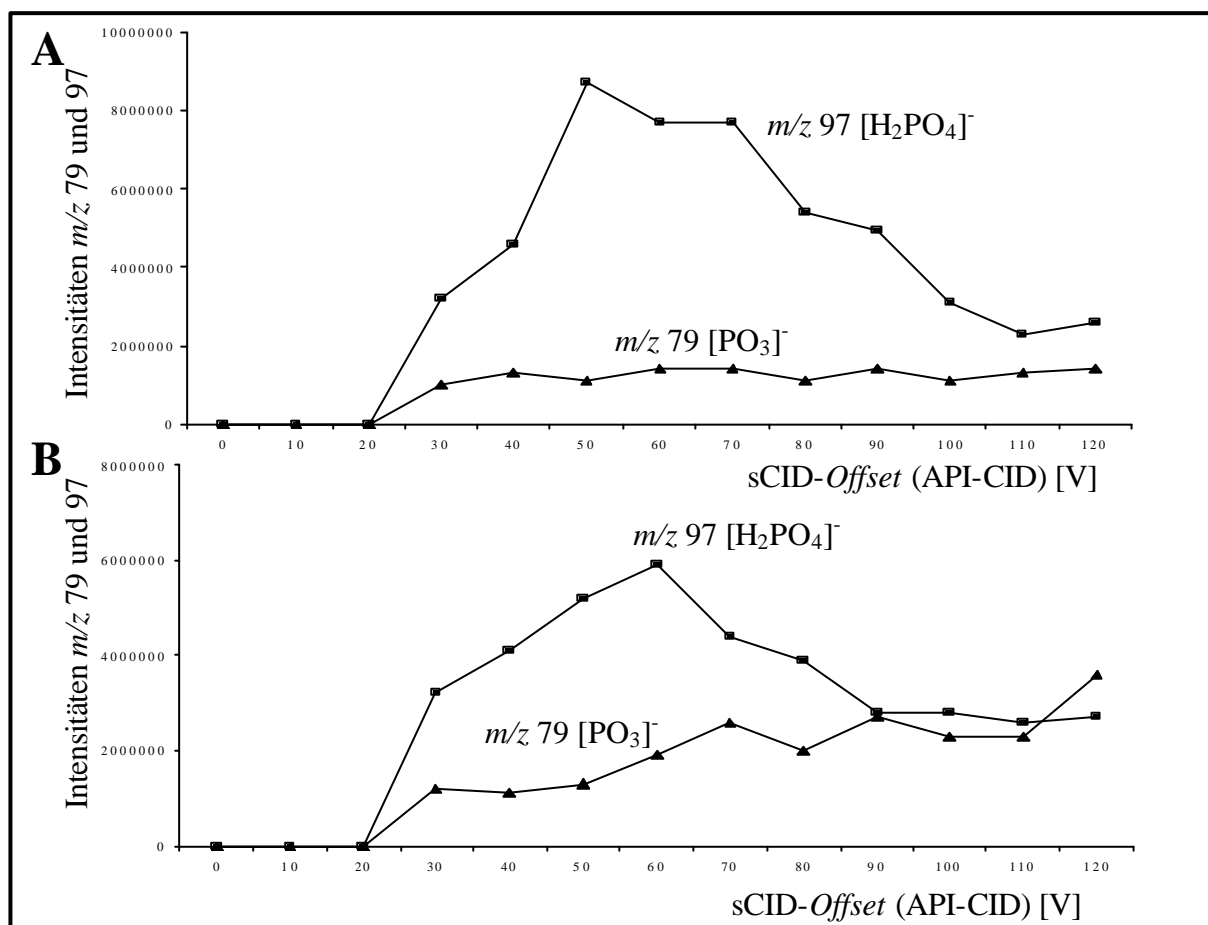


Abb. 5.49. Negativ-Ionen-API-CID synthetischer Phosphopeptide. Abhängigkeit der Intensitäten der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) vom Oktapol-Offset (API-CID). (A) Synthetisches Serin-phosphoryliertes HSP ($C^{81}LNRQLpSSGVSEIR^{94}$, $6 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % ACN, 0,075 % TFA (v/v)). (B) Synthetisches Tyr-phosphoryliertes pp60 c-src ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$, $6,5 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % ACN, 0,075 % TFA (v/v)). Die Peptidlösungen wurden mittels Spritzenpumpe ($5 \mu\text{l}\text{min}^{-1}$) infundiert. Die Datenaufnahme erfolgte im Hybrid-Scan-Verfahren (Abb. 5.50). Bedingungen: $\pm 4,5 \text{ kV}$ ESI-Spannung; Hybrid-Scan: negativ-Ionen-Q1-Scan im Bereich von 75-110 m/z in 1,5 sec, hohes Potential (API-CID, Oktapol-Offset-Werte siehe Diagramm), positiv-Ionen-Q1-Scan im Bereich von 300-2000 m/z in 3 sec; 60 psi Sheath-Gas.

Im negativen Ionenmodus kommt es bei Phosphopeptiden bei einem hohen Q_0 -Offset-Potential (API-CID) zur Spaltung der Phosphoesterbindungen. Infolge der Kollisionaktivierung bilden sich dabei phosphorylierungsspezifische $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen bei m/z 79 bzw. m/z 97. Sowohl Serin- als auch Tyrosin-phosphorylierte Peptide zeigten eine Q_0 -Offset-Potential-abhängige Bildung der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen (Abb. 5.49). Die Bildung der beiden Fragmentionen setzte erst bei Offset-Werten > 25 V ein. Bei mittleren Offset-Werten (20–80 V) nahm die Intensität des m/z 79-Fragmentions zu und blieb dann bei höheren Offset-Werten (> 80 V) relativ konstant (Plateaubildung, Abb. 5.49.A und B). Das m/z 97-Fragmention zeigte im Vergleich dazu einen unterschiedlichen Intensitätsverlauf. Sowohl bei dem Serin- als auch bei dem Tyrosin-phosphorylierten Peptid setzte die Bildung des m/z 97-Fragmentions ebenfalls erst bei Offset-Werten > 25 V ein. Bis zu einem Offset von etwa 50 V stieg die Intensität sehr stark an, erreichte ein Maximum und fiel dann bei höheren Offset-Werten wieder stark ab (Abb. 5.49). Insgesamt zeigte die Intensität des beobachteten m/z 97-Fragmentions einen relativ symmetrischen Verlauf. Bei 50 V Offset war die Intensität des m/z 97-Fragmentions etwa drei- bis fünfmal höher im Vergleich zum m/z 79-Fragmention. Erst bei höheren Offset-Werten überwiegen die Intensitäten des m/z 79-Fragmentions. Somit konnten für das m/z 97-Fragmention zwar sehr hohe Intensitäten beobachtet werden, jedoch beschränkten diese sich lediglich auf einen relativ schmalen Offset-Bereich (60 ± 20 V). Im Vergleich hierzu zeigten die für das m/z 79-Fragmention ermittelten Intensitäten bezüglich des CID-Offsets (insbesondere bei hohen Offset-Werten) einen weitaus unspezifischeren Verlauf.

5.8.1.2. $\mu\text{LC}/\text{ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik}$ unter TFA-sauren Bedingungen

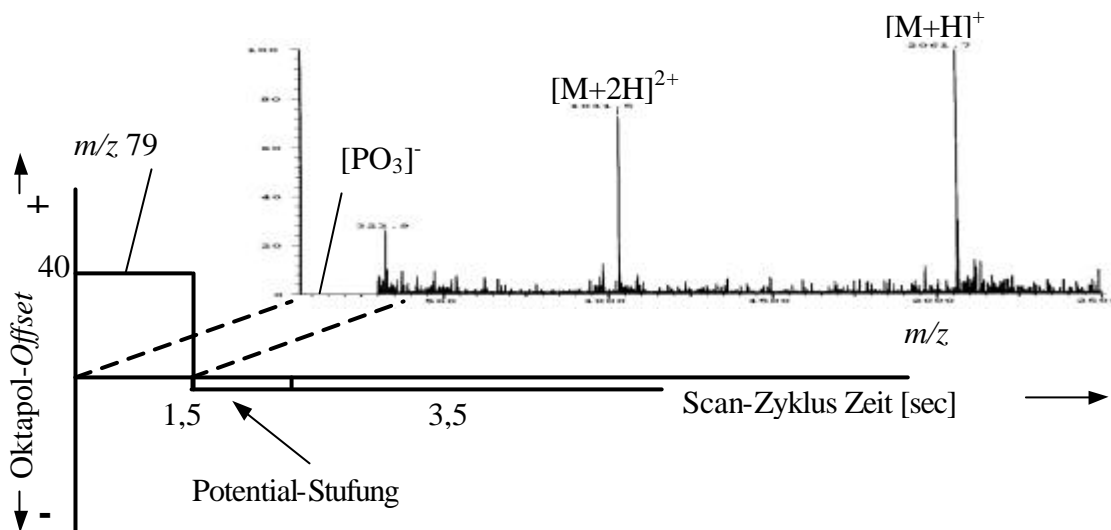


Abb. 5.50. Zeitlicher Potential- und Polaritätsverlauf während eines $\mu\text{LC}/\text{ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scans}$ (TSQ 700). Zur Erzeugung der phosphorylierungsspezifischen m/z 79-Markerionenspur wird im negativen Ionenmodus 1,5 sec lang bei einem hohen Q_0 -Offset (40 V, API-CID) im SIM-Modus auf m/z 79 gescannt. Zur Ermittlung der Peptidionen wird dann nach Wechseln der Polarität bei niedrigem Q_0 -Offset (-10 V, kein API-CID) für 3,5 sec im Bereich von m/z 300–2500 gescannt. Dieser Ablauf wird nach einem Scan beendet und wiederholt sich während des gesamten LC/ESI-MS-Experimentes. Die Anordnung des LC/ESI-MS-Aufbaus ist in Abb. 2.3 wiedergegeben.

5.8.1.3. Untersuchung eines tryptischen *b*-Caseinverdaus mittels μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik unter TFA-sauren Bedingungen

Bei diesem Experiment wurden 200 pmol phosphoryliertes β -Casein (tryptisch in-Lösung gespalten) eingesetzt.

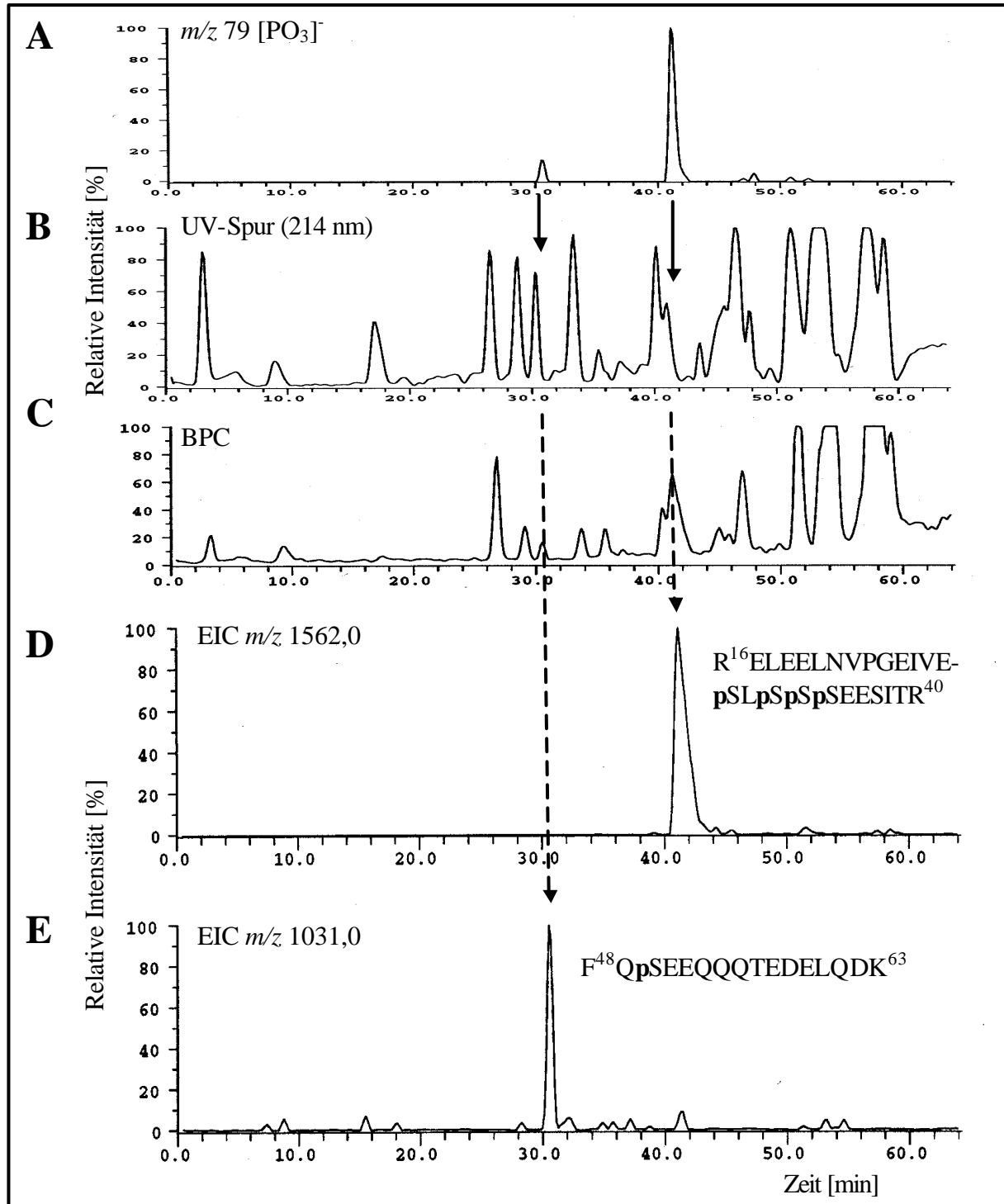


Abb. 5.51. Untersuchung eines tryptischen *b*-Caseinverdaus (200 pmol absolut) mittels μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experiment (TSQ 700) unter TFA-sauren Bedingungen zur Detektion der phosphorylierten Peptide. (A) Negativ-Ionen-API-CID m/z 79-

Markerionenspur, zur Ermittlung der phosphorylierten Peptide, (B) on-line-UV-Chromatogramm ($\lambda = 214$ nm), (C) Positiv/negativ-Ionen-Base-Peak-Chromatogramm (BPC) der eluierten Peptide, (D und E) EIC's der detektierten $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptidionen $F^{48}\text{QpSEEQQQTEDELQDK}^{63}$ bei m/z 1031,0 und $R^{16}\text{ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR}^{40}$ bei m/z 1562,0. Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μm I.D. (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ Flussrate; Elutionsmittel: Puffer A: wässrige 0,05 % TFA (v/v); Puffer B: wässrige 80 % ACN, 0,075 % TFA (v/v); Gradient: 0-5 min 5 % B; 5-45 min 48 % B; 45-90 min 95 % B; Injektion: 10 μL (2 μL Verdaulösung in 8 μL Puffer A); UV-Detektion: $\lambda = 214$ nm (Bubble-Zelle, ca. 150 μm I.D.); MS: Sheath-Flüssigkeit: 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ wässrige 70 % MeOH (v/v); 60 psi Sheath-Gas; $\pm 4,5$ kV ESI-Spannung; Hybrid-Scantechnik: API-CID: negativer Ionenmodus; +40 V Oktapol-Offset (Q0), Q3 SIM m/z 79 für 1,5 sec; Polaritäts- und Offset-Wechsel: positiver Ionenmodus, -10 V Oktapol-Offset (Q0), Q3 Scan im Bereich von 300-2500 m/z in 3,5 sec.

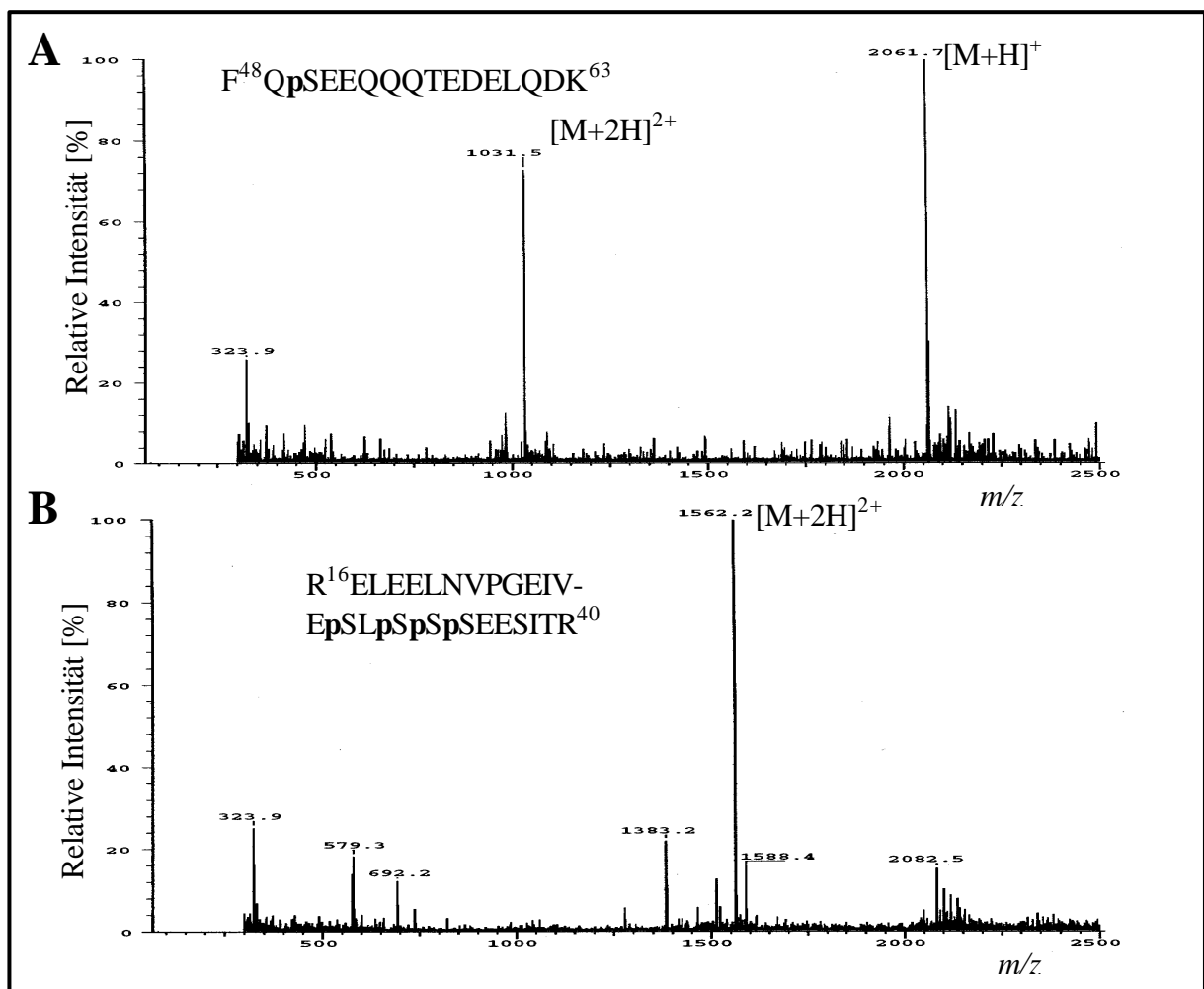


Abb. 5.52. Hybrid-Scan-Massenspektren, die bei der Untersuchung des tryptischen b-Caseinverdaus (200 pmol absolut) während der Elution der Phosphopeptide beim $\mu\text{LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experiment}$ (TSQ 700) unter TFA-sauren Bedingungen aufgezeichnet wurden (Abb. 5.51). (A) Aufsummiertes Massenspektrum (Scans 208-214) des einfach Serin-phosphorylierten Peptids $F^{48}\text{QpSEEQQQTEDELQDK}^{63}$, welches nach 30,5 min eluierte. (B) Aufsummiertes Massenspektrum (Scans 279-297) des vierfach-Serin-phosphorylierten Peptids $R^{16}\text{ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR}^{40}$, welches nach 41 min eluierte. Bedingungen siehe Abb. 5.51.

Tab. 5.7. Tabellarische Auflistung der identifizierten Peptide, welche bei der Untersuchung des tryptischen **b**-Caseinverdaus (200 pmol absolut) mit Hilfe des μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experimentes (TSQ 700) unter TFA-sauren Bedingungen detektiert wurden (Abb. 5.51).

Position		[M+H] ⁺ _{m.i.} best. ⁽¹⁾	[M+H] ⁺ _{m.i.} theor. ⁽¹⁾	Dm	R _t ⁽²⁾ [min]	Mod.	MC ⁽³⁾	Sequenz
41	43	374,1	374,2	0,1	4,9		0	INK
44	47	517,4	517,3	0,1	8,3		1	KIEK
115	120	646,1	646,3	0,2	16,6		0	EAMPK
192	198	830,6	830,5	0,1	26,0	CARB	0	AVPYPQR
185	191	780,1	780,5	0,4	28,2	CARB	0	VLPVPQK
48	63	2062,0	2061,8	0,2	30,5	1PO ₄	0	FQpSEEQQQTED ELQDK ⁽⁴⁾
123	128	748,2	748,4	0,2	33,1		0	EMPFPK
113	122	1137,6	1138,6	1,0	35,3		2	VKEAMAPK
115	128	1641,6	1640,8	1,2	37,2		2	EAMAPKHKEMP FPK
16	40	3123,4	3122,3	0,9	41,0	4PO ₄	1	RELEELNVPGEIV EpSLpSpSpSEESI TR
129	184	6359,5	6359,3	0,2	56,0		0	YPVEPFTESQSLT LTDVENLHLPLP LLQSWMHQPHQ PLPPTVMFPPQSV LSLSQSK

(3) monoisotopische Molekulargewichte der einfach protonierten Peptide

(4) Retentionszeit im ESI-Base-Peak-Chromatogramm

(5) Missed Cleavage (Protease verpasst eine Schnittstelle)

(6) Phosphoserin pS

1	11	21	31	41
MKVLILACLV	ALALARELEE	<u>LNVPGEIVES</u>	<u>LSSSEESITR</u>	<u>NKKIEKFQS</u>
51	61	71	81	91
<u>EEQQQTEDEL</u>	<u>QDKIHPFAQT</u>	QSLVYFPFGP	IPNS LPQNI	PLTQTPVVVP
101	111	121	131	141
PFLQPEVMGV	<u>SKVKEAMAPK</u>	<u>HKEMPFKYP</u>	<u>VEPFTESQSL</u>	<u>TLTDVENLHL</u>
151	161	171	181	191
<u>PLPLLQSWMH</u>	<u>QPHQPLPPTV</u>	<u>MFPPQSVLSL</u>	<u>SQSKVLPVPQ</u>	<u>KAVPYPQDM</u>
201	211	221		
PIQAFLLYQE	PVLGPVRGPF	PIIV		

Abb. 5.53. Abdeckung der Aminosäuresequenz des **b**-Caseins, welche durch die identifizierten Peptide, die bei der Untersuchung des tryptischen **b**-Caseinverdaus (200 pmol absolut) mit Hilfe des μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experimentes (TSQ 700) unter TFA-sauren Bedingungen detektiert wurden, abgedeckt wird (Abb. 5.51 und Tab. 5.7). Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code dargestellt. Die ermittelten Sequenzabschnitte wurden unterstrichen, die phosphorylierten Serinreste wurden fett hervorgehoben.

5.8.1.4. Untersuchung eines tryptischen Verdaus von dephosphoryliertem b-Casein mittels μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik unter TFA-sauren Bedingungen

Mit Hilfe des folgenden Experimentes sollte die Spezifität der μ LC/ESI-API-CID-MS-Methode überprüft werden. Es wurden 200 pmol eines tryptischen Verdaus von nicht-phosphoryliertem β -Casein eingesetzt.

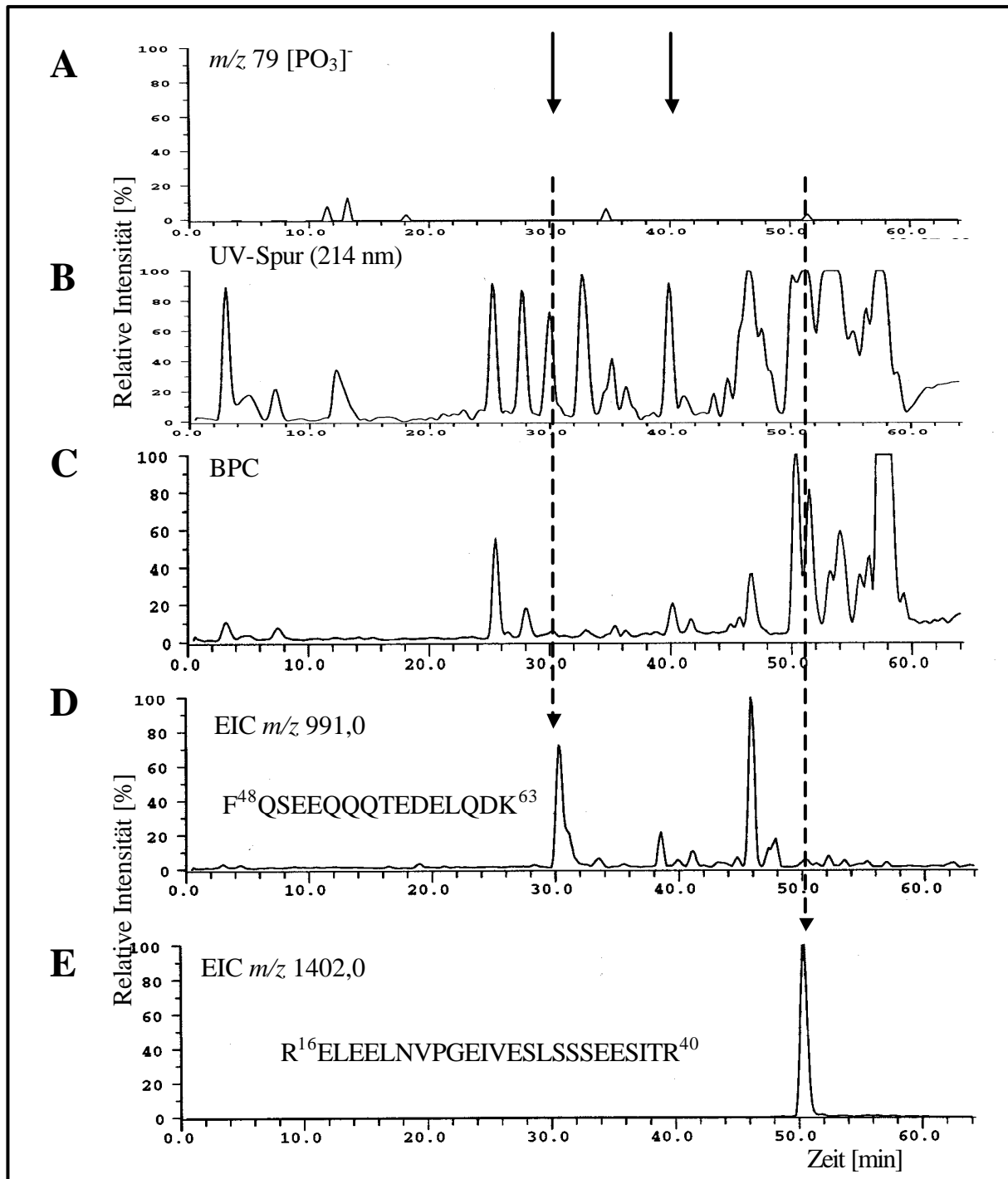


Abb. 5.54. Untersuchung eines tryptischen Verdaus von nicht-phosphoryliertem **b**-Casein (200 pmol absolut) mit Hilfe eines μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experiment (TSQ 700) unter TFA-sauren Bedingungen. (A) Negativ-Ionen-API-CID m/z 79-Markierionenspur,

zur Ermittlung der phosphorylierten Peptide, **(B)** on-line-UV-Chromatogramm ($\lambda=214$ nm), **(C)** Positiv/negativ-Ionen-Base-Peak-Chromatogramm (BPC) der eluierten Peptide, **(D und E)** EIC's der detektierten $[M+2H]^{2+}$ -Peptidionen $F^{48}QSEEQQQTEDELQDK^{63}$ bei m/z 991,0 und $R^{16}ELEELNVPGEIVEpSLSSSEESITR^{40}$ bei m/z 1402,0 (Vgl. Abb. 5.51 u. 5.52). Bedingungen siehe Abb. 5.51.

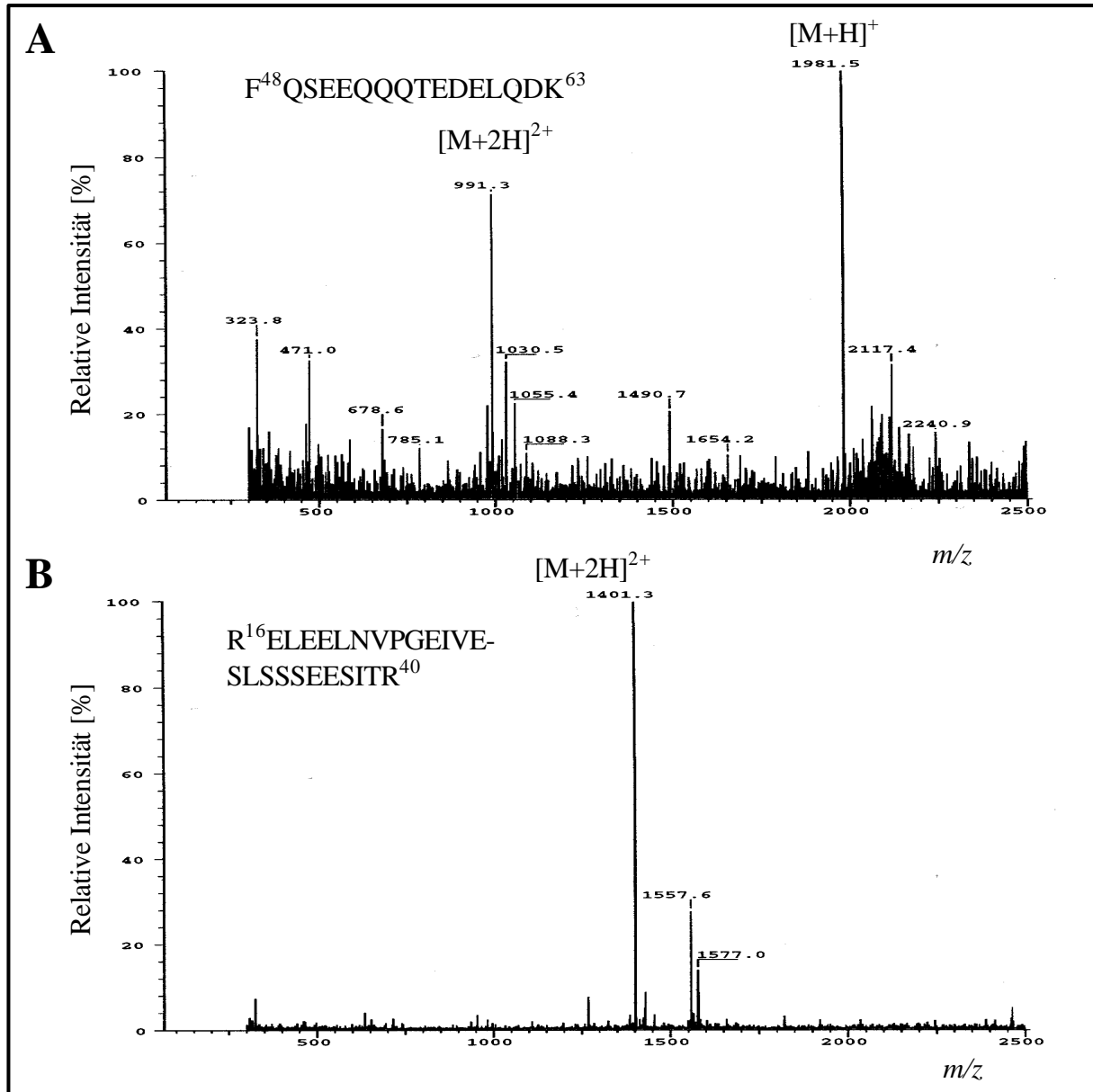


Abb. 5.55. Hybrid-Scan-Massenspektren, die bei der Untersuchung des tryptisch verdauten nicht-phosphorylierten **b**-Caseins (200 pmol absolut) während der Elution der Phosphopeptid-analogen Peptide beim μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experiment (TSQ 700) unter TFA-sauren Bedingungen aufgezeichnet wurden (Abb. 5.55). **(A)** Aufsummiertes Massenspektrum (Scans 206-212) des einfach Serin-phosphorylierten Peptids $F^{48}QSEEQQQTEDELQDK^{63}$, welches nach 31 min eluierte. **(B)** Aufsummiertes Massenspektrum (Scans 346-355) des vierfach-Serin-phosphorylierten Peptids $R^{16}ELEELNVPGEIVEpSLSSSEESITR^{40}$, welches nach 50,3 min eluierte. Bedingungen siehe Abb. 5.51.

Tab. 5.8. *Tabellarische Auflistung der identifizierten Phosphopeptid-analogen Peptide (Vgl. Tab. 5.7), welche bei der Untersuchung des tryptisch verdauten nicht-phosphorylierten b-Caseins (200 pmol absolut) mit Hilfe des μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experimentes (TSQ 700) unter TFA-sauren Bedingungen detektiert wurden (Abb. 5.54 und 5.55).*

Position		[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	Dm	R _t ⁽²⁾	Mod.	MC ⁽³⁾	Sequenz
Start	Ende	m.i. best. ⁽¹⁾	m.i. theor. ⁽¹⁾		[min]			
48	63	1981,5	1981,9	0,4	31,0		0	FQSEEQQQTEDELQDK
16	40	2801,6	2802,4	0,8	50,3		1	RELEELNVPGEIVESLS SSEESITR

(1),(2),(3) siehe Tab. 5.7.

Der instrumentelle Aufbau des μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experimentes ist in Abb. 2.3 schematisch wiedergegeben. Zur Gewährung stabiler ESI-Bedingungen wurde dem Säuleneluat während der Gradientenelution *Sheath*-Flüssigkeit ($5\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ 70 % Methanol in Wasser) zugemischt. Die Peptide wurden unter sauren Bedingungen eluiert (TFA als Ionenpaarreagenz). In Abbildung 5.50 ist der zeitliche Ablauf eines Hybrid-Scans schematisch dargestellt (zugehörige ICL-Prozedur siehe Kap. 4.3.10.5). Der Hybrid-Scan beginnt im negativen Ionenmodus mit einer Kollisionsaktivierung im Skimmerbereich (API-CID). Bei einem Q0-Offset-Potential von +40 V wird dabei 1,5 sec auf m/z 79 (SIM, *Selected Ion Monitoring*) gescannt. Nach Wechsel der Polarität wird dann im positiven Ionisierungsmodus bei einem niedrigen Q0-Offset-Potential (-10 V, keine Kollisionsaktivierung) ein Übersichtsspektrum aufgenommen (Scan im Bereich von m/z 300-2500 in 3,5, sec). Dieser Scan-Zyklus wird während der gesamten Gradientenelution ständig wiederholt.

Die μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Methode (TFA-saure Bedingungen) wurde zur Analyse eines tryptischen β -Caseinverdaus (200 pmol) eingesetzt (Abb. 5.51). Im extrahierten [PO₃]-Markerionen-Chromatogramm (EIC m/z 79, Abb. 5.51.A) sind bei den Retentionszeiten von 30,5 bzw. 41 min deutlich zwei Signale zu erkennen. Zu diesen Zeitpunkten eluierten somit phosphorylierte Peptide von der Säule. Im Vergleich zum früher eluierenden Phosphopeptid (R_t = 30,5 min) erzeugte das Phosphopeptid, welches nach 41 min eluierte dabei ein siebenfach intensiveres Signal. Die Elution der Peptide war nach etwa 60 min beendet (UV- bzw. BP-Chromatogramme, Abb. 5.51.B und C). Anhand der beiden Spuren ist klar erkennbar, dass UV-Absorption und ES-Ionisierung in Bezug auf die einzelnen Komponenten nicht miteinander korrelierten. Die relativ intensiven und unsymmetrischen Signale bei späteren Elutionszeiten (ab etwa 50 min) lassen erkennen, dass hier zahlreiche Peptide coeluierten. Die Überlagerung der m/z 79-Markerionenspur (Abb. 5.51.A) mit den UV- bzw. *Base-Peak*-Chromatogrammen (Abb. 5.51. B und C) ermöglichte die Zuordnung der dem Phosphopeptid zugehörigen Signale (Retentionszeiten und Scans). Das Phosphopeptid, welches nach 30,5 min eluierte, erzeugte sowohl im UV- als auch im BP-Chromatogramm ein einzelnes, nahezu symmetrisches Signal (Abb. 5.51.B und C). Das zweite Phosphopeptid (R_t = 41 min) coeluierte zusammen mit einem nicht-phosphorylierten Peptid (Schulter im UV-Chromatogramm). Im Vergleich zu dem früher eluierenden Phosphopeptid erzeugte dieses jedoch ein deutlich intensiveres BPC-Signal. Diese Beobachtung wurde durch die Intensitäten der [M+2H]²⁺-Phosphopeptidionen bestätigt (EIC's, Abb. 5.51.D und E). Die Identifizierung der Phosphopeptide erfolgte anhand der Ionensignale der positiv-Ionen-ESI-Massenspektren (Hybrid-Scan-Abschnitt ohne API-CID), welche während der Elution der Phosphopeptide aufgezeichnet wurden (Abb. 5.52). Das einfach-Serin-phosphorylierte Peptid F⁴⁸QpSEEQQQTEDELQDK⁶³ (M_w 2060,8 Da),

welches nach 30 min eluierte, konnte anhand seines $[M+H]^+$ -Molekülions bei m/z 2061,7 sowie seines $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülions bei m/z 1031,5 identifiziert werden (Abb. 5.52.A, aufsummiertes Massenspektrum, Scans 208-214). Das vierfach-phosphorylierte Peptid $R^{16}ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR^{40}$ (M_w 3221,3 Da), welches nach 41 min eluierte, konnte anhand seines zweifach-positiv-geladenen $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülions bei m/z 1562,2 identifiziert werden (Abb. 5.52.B, aufsummiertes Massenspektrum, Scans 279-297). Das in den UV- bzw. BP-Chromatogrammen beobachtete Verhalten der Phosphopeptide bestätigte sich bei Betrachtung der aufsummierten Massenspektren. Im aufsummierten Massenspektrum des vierfach-Serin-phosphorylierten Peptids ($R_t = 41$ min, Abb. 5.52.B) konnten neben dem intensiven $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Quasimolekülion (m/z 1562,2) noch zusätzliche Ionensignale, welche durch coeluiierende Peptide erzeugt wurden, beobachtet werden. Im Vergleich dazu eluierte das einfach-Serin-phosphorylierte Peptid ($R_t = 30$ min, Abb. 5.52.A) als einzelne Komponente. Das im BPC bzw. in den EICs (Abb. 5.51.C, D und E) beobachtete unterschiedliche Ionisierungsverhalten der Phosphopeptide konnte bei Betrachtung der aufsummierten Massenspektren ebenfalls beobachtet werden. Im Vergleich zu dem einfach-Serin-phosphorylierten Peptid (Abb. 5.52) konnte für das vierfach-phosphorylierte Peptid ein doppelt so hohes S/N-Verhältnis für das $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion ermittelt werden. Die mit Hilfe des μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experimentes identifizierten Peptide sind in Tab. 5.7 aufgelistet. Abbildung 5.53 zeigt die resultierende Sequenzabdeckung des β -Caseins. Mit Hilfe der ermittelten tryptischen Phosphopeptide konnten alle Phosphorylierungsstellen des β -Caseins detektiert werden. Bei dem Peptidmassen-*Mapping* konnte lediglich eine Sequenzabdeckung von 58 % erreicht werden. Aufgrund der zahlreichen komplexen Kohlenhydrat-Modifikationen des β -Caseins konnte eine Vielzahl der ermittelten Peptidmassen nicht den entsprechenden, theoretisch berechneten Peptidmassen zugeordnet werden.

Die Spezifität (Detektion phosphorylierter Peptide) des μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Verfahrens wurde mit Hilfe eines tryptischen Verdaus von nicht-phosphoryliertem β -Casein (200 pmol) überprüft (Abb. 5.54). Die m/z 79-Markerionen-Spur enthielt keine Signale (Abb. 5.54.A, die schwachen Signale in der Markerspuren repräsentieren das Rauschen). Der Proteinverdau enthielt somit keine Phosphopeptide. Die Phosphopeptid-analogen nicht-phosphorylierten Peptide konnten anhand der berechneten zweifach-positiv-geladenen $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülionen detektiert werden (EICs, Abb. 5.54.D und E). Die Elutionsabfolge der beiden Peptide wurde durch die fehlenden Phosphatreste nicht verändert. Nach 31 min eluierte das Peptid $F^{48}QSEEQQTEDELQDK^{63}$ (M_w 1980,9 Da), nach 50,3 min das Peptid $R^{16}ELEELNVPGEIVESLSSEESITR^{40}$ (M_w 2801,7 Da).

Das Peptid $F^{48}QSEEQQTEDELQDK^{63}$ ($R_t = 31$ min, Scans 206-212), konnte anhand seines $[M+H]^+$ -Molekülions bei m/z 1981,5 sowie seines $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülions bei m/z 911,3 identifiziert werden (Abb. 5.55.A). Das zweite Peptid (R_t 50,3 min, Scans 346-355) konnte anhand seines $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülions bei m/z 1401,3 identifiziert werden (Abb. 5.55.B). Bezüglich ihrer Ionisierung verhielten sich die beiden Peptide identisch zu den entsprechenden phosphorylierten Peptiden. Im BPC erzeugte das Peptid, welches nach 50,3 min eluierte im Vergleich zu dem Peptid, welches nach 31 min eluierte ein deutlich intensiveres Signal (Abb. 5.54.C, vgl. Abb. 5.51.C). Die S/N-Verhältnisse der ermittelten $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülionen (aufsummierte Massenspektren, Abb. 5.55) bestätigten diese Beobachtung ebenfalls. Für das später eluierende Peptid konnte ein 15fach höheres S/N-Verhältnis ermittelt werden (Abb. 5.55.A und B). Gegenüber dem einfach-Serin-phosphorylierten Peptid verlängerte sich die Retentionszeit des analogen nicht-phosphorylierten Peptids nur minimal (30,5 bzw. 31 min, Abb. 5.51 und 5.54). Bei dem vierfach-phosphorylierten Peptids verlängerte sich aufgrund der fehlenden Phosphatreste die Retentionszeit um 9 min (Abb. 5.51 und 5.54).

5.8.2. μ LC/ESI-API-CID-Hybrid-Scan-MS unter alkalischen Bedingungen

Bei ESI-MS basierenden Phosphopeptid-*Screening*-Methoden stellt die Ionisierungseffizienz der Phosphopeptide eines der Hauptprobleme dar. Bei der m/z 79-Vorläuferionen-Analyse ($[\text{PO}_3]^-$) konnte die Detektionsempfindlichkeit durch Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung deutlich gesteigert werden [235,366,367,370,371]. Bei den folgenden Experimenten sollte nun gezeigt werden, dass sich die Empfindlichkeit des auf μ LC/ESI-API-CID-MS basierenden Phosphopeptid-*Screening*-Verfahrens durch eine pH-Wert-Erhöhung der LC-Lösungen ebenfalls verbessern lässt. Die Bildung der phosphorylierungsspezifischen $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 und m/z 97) (Kap. 2.5.3.3.1) wurde dazu in Abhängigkeit des pH-Wertes und des Kollisions-*Offset*-Potentials untersucht. Zusätzlich wurde eine μ LC/ESI-sCID-MS-Methode unter alkalischen Bedingungen entwickelt, bei welcher die Peptidmassen ebenfalls im negativen Ionenmodus ermittelt werden. Das *Screening*-Verfahren wurde zur Analyse eines tryptischen β -Caseinverdaus eingesetzt. Schließlich wurde ein vollautomatisches Hybrid-Scan-Aufnahmeverfahren (ICL) erstellt und zur Analyse eines synthetischen Peptids eingesetzt.

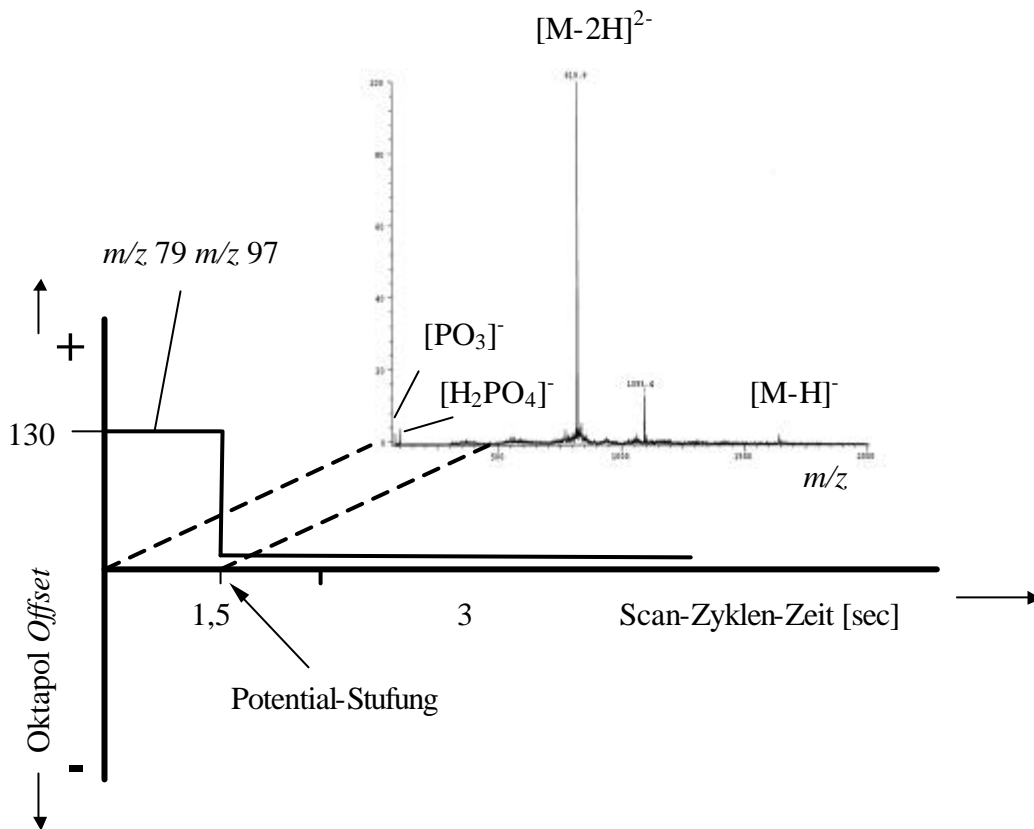


Abb. 5.56. Zeitlicher Potential- und Polaritätsverlauf des negativ-Ionen- μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Verfahrens (TSQ 700). Zur Erzeugung der phosphorylierungsspezifischen m/z 79-Markerionenspur wird im negativen Ionenmodus 1,5 sec lang bei einem hohen Q_0 -Offset (130 V, API-CID) im Bereich von m/z 75-105 gescannt. Zur Ermittlung der Peptidionen wird dann bei niedrigem Q_0 -Offset (10 V, kein API-CID) für 3 sec im Bereich von m/z 300-2000 gescannt. Dieser Ablauf wird nach einem Scan beendet und wiederholt sich während des gesamten LC/ESI-MS-Experimentes.

5.8.2.1. pH-Wert- und API-CID-Offset-abhängige Bildung der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Markerionen

Bei der $[PO_3]^-$ -Vorläuferionen-Analyse konnte die Bildung der phosphorylierungs-spezifischen m/z 79-Markerionen durch Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung deutlich verbessert werden. Mit Hilfe synthetischer Phosphopeptide sollte deshalb die pH-Wert-abhängige Bildung der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) beim negativ-Ionen-API-CID untersucht werden. Als Modellsubstanz wurde das Serin-phosphorylierte Hitzeschock Proteinfragment (81-94) CLNRQLpSSGVSEIR (HSP) eingesetzt ($5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Spritzenpumpeninfusion). Die maximale Ausbeute der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Markerionen (Intensität der m/z 79- bzw. m/z 97-Fragmentationen) wurde in Abhängigkeit des Skimmer-Potentials (Q0-Offset) und des pH-Wertes (pH 8,0-11,0) der HSP-Lösungen (50 % MeOH in Wasser) ermittelt. Die pH-Werte wurden mit wässrigen Ammoniaklösung eingestellt.

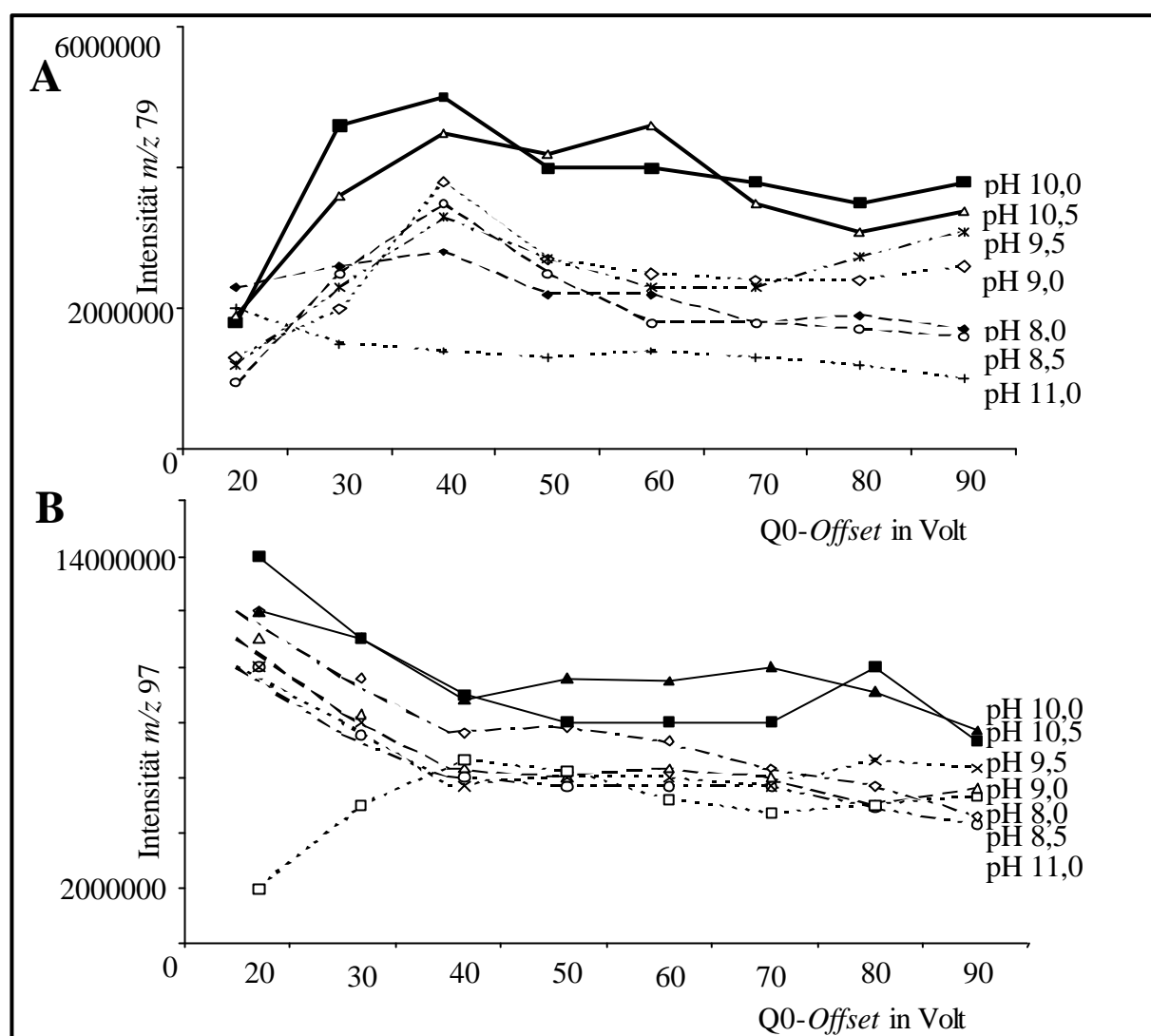


Abb. 5.57. Negativ-Ionen-API-CID-Untersuchung (TSQ 700) des Serin-phosphorylierten HSP $C^{81}LNQRQLpSSGVSEIR^{94}$ ($6 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH, pH-Werte eingestellt mit wässriger NH_3 (v/v)). (A und B) Intensitäten der $[PO_3]^-$ - (m/z 79) und $[H_2PO_4]^-$ - (m/z 97) Fragmentationen in Abhängigkeit vom Q0-Offset und pH-Wert ($5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Spritzenpumpen-Infusion). Die Datenaufnahme erfolgte im Hybrid-Scan-Verfahren (Abb. 5.56). Hybrid-Scan-

Bedingungen: + 4,5 kV ESI-Spannung; negativer Ionenmodus; API-CID: Oktapol-Offset-Werte (Q0) siehe Diagramm; Q1 Scan im Bereich von 75-105 m/z für 1,5 sec; niedriges Potential: 0V Oktapol-Offset (Q0); Q1 Scan im Bereich von 300-2000 m/z in 3 sec.

Hohe Intensitäten der $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentationen konnten bei dem negativ-Ionen-API-CID des Serin-phosphorylierten HSP im Bereich zwischen pH 10-10,5 sowie bei Q0-Offset-Werten zwischen 30-60 V beobachtet werden (Abb. 5.57.A). Intensive Bildung der m/z 79-Markerionen erfolgte somit nur innerhalb eines relativ engen pH-Bereichs. Bei pH-Werten $< 9,5$ sowie $> 11,0$ nahm die Intensität der m/z 79-Fragmentationen deutlich ab. Die Änderung des Q0-Offsets hatte einen weitaus unspezifischeren Einfluss auf die Bildung der m/z 79-Fragmentationen. Bei hohen Q0-Offset-Werten (30-90 V) konnte eine intensive Bildung der $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentationen beobachtet werden. Die Bildung der m/z 97-Fragmentationen verlief ebenfalls bei pH-Werten zwischen 10 und 10,5 am intensivsten (Abb. 5.57.B). Jedoch setzte deren Bildung im Vergleich zu den $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentationen schon bei niedrigen Offset-Werten (< 40 V) ein. Die intensivste Bildung der $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 97) war bei 20 V Q0-Offset zu beobachten. Bis zu einem Offset von 40 V nahm die Intensität dann relativ stark ab (etwa 50 % des Maximalwertes) und blieb dann bei höheren Offset-Werten (40-90 V) konstant niedrig.

5.8.2.2. Bildung der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen in Abhängigkeit vom Q0-Offset unter alkalischen (pH 10,5) und sauren (pH 2,5) Bedingungen

Zunächst wurde der Einfluss des Q0-Offset-Potentials auf die Bildung der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) bei einem pH-Wert von 10,5 untersucht (Abb. 5.58.A). Anschließend wurde die Q0-Offset-abhängige Bildung der $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentationen (m/z 79) unter alkalischen (pH 10,5) und sauren (pH 2,5) Bedingungen verglichen (Abb. 5.58.B). Als Modellsubstanz wurde das Tyrosin-phosphorylierte pp60 c-src-Peptid $\text{T}^{521}\text{STEPQpYQPGENL}^{533}$ ($6,5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, wässrige 50 % MeOH; pH 2,5 durch Zugabe von TFA, pH 10,5 durch Zugabe von NH_3) eingesetzt. Das Peptid wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe infundiert ($5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). Die Intensitäten der m/z 79- und m/z 97-Fragmentationen wurden in Abhängigkeit der Q0-Offset-Werte aufgezeichnet.

Beim negativ-Ionen-API-CID unter alkalischen Bedingungen (pH 10,5) zeigten die Intensitäten der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) in Abhängigkeit des Q0-Offset-Potentials einen unterschiedlichen Verlauf (Abb. 5.58.A). Die Bildung der m/z 97-Fragmentationen setzte schon bei relativ niedrigen Offset-Werten (10-20 V) ein. Die Intensität der Fragmentationen blieb auch im Bereich höherer Offset-Werte nahezu konstant. Im Vergleich konnte bei den niedrigen Offset-Werten (< 20 V) kaum eine Bildung von $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentationen (m/z 79) beobachtet werden. Mit steigenden Offset-Werten nahm deren Intensität aber deutlich zu und erreichte schließlich bei etwa 100 V ein Maximum (Bildung eines Plateaus). Im Bereich des Plateaus war die Intensität der m/z 79-Fragmentationen etwa fünfmal höher im Vergleich zu den m/z 97-Fragmentationen. Der Q0-Offset-Potential-abhängige Intensitätsverlauf der $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentationen (m/z 79) verlief unter den jeweiligen pH-Bedingungen (pH 10,5 bzw. pH 2,5) unterschiedlich (Abb. 5.58.B). Unter sauren und alkalischen Bedingungen nahm die Intensität der m/z 79-Ionen bis zu einem Q0-Offset von etwa 50 V zu. Mit zunehmenden Offset-Werten (> 50 V) konnte unter alkalischen Bedingungen eine Zunahme der Intensität der m/z 79-Fragmentationen (Erreichen eines Plateaus bei Offset-Werten > 90 V) beobachtet werden. Unter sauren Bedingungen war mit steigenden Offset-Werten (> 50 V) dagegen eine starke Abnahme der m/z 79-Fragmentationen-Intensitäten zu beobachten. Bei einem Q0-Offset von 100 V war unter den alkalischen

Bedingungen die Intensität der m/z 79-Fragmentationen etwa drei- bis vierfach höher im Vergleich zu den sauren Bedingungen.

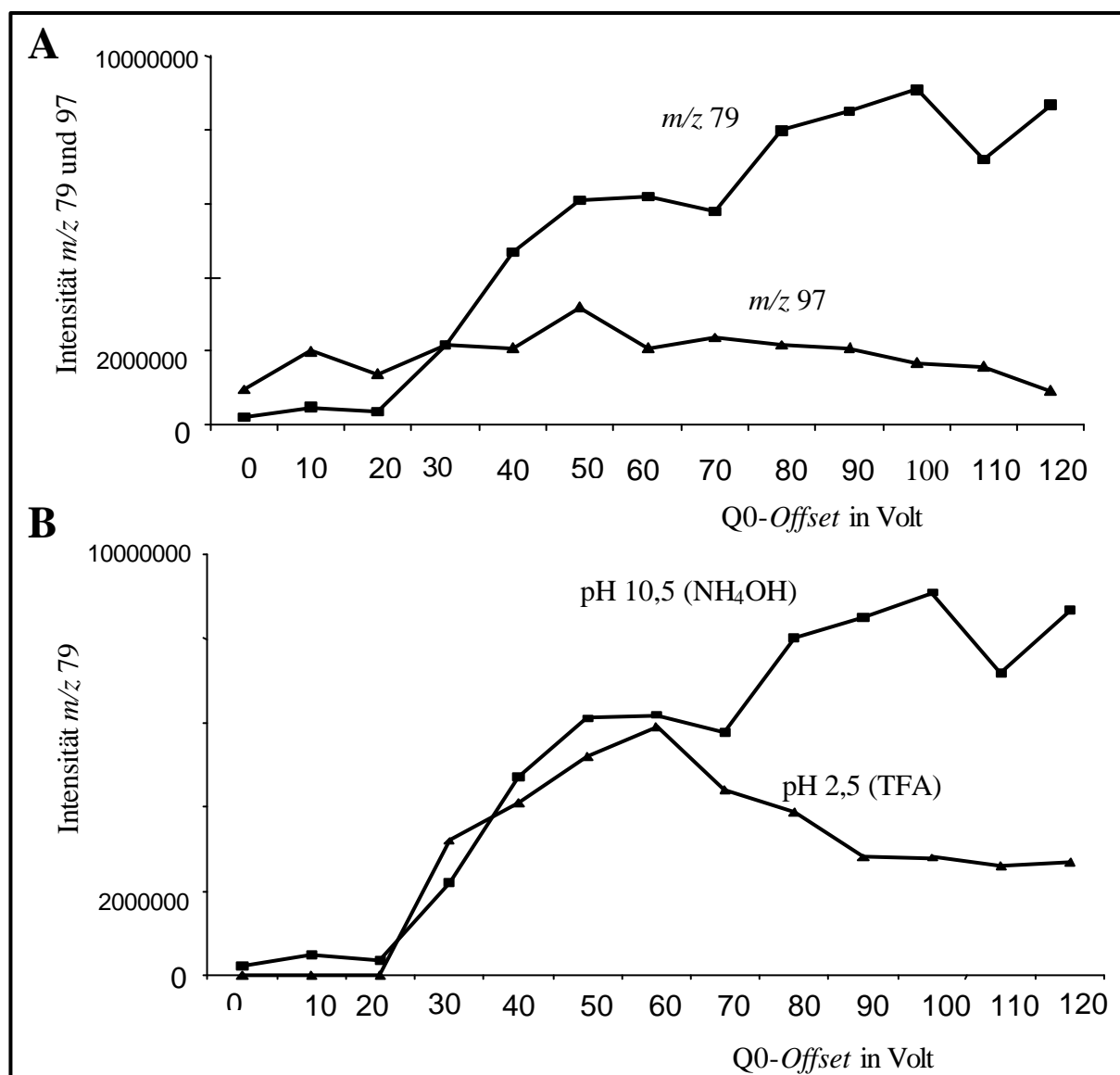


Abb. 5.58. Negativ-Ionen-API-CID-Untersuchung (TSQ 700) des Tyrosin-phosphorylierten pp60 c-src-Peptides $T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$ ($6,5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) (A) Abhängigkeit der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentationen-Intensitäten (m/z 79 bzw. m/z 97) vom Oktapol-Offset (API-CID) unter alkalischen Bedingungen (pH 10,5). (B) Abhängigkeit der $[PO_3]^-$ -Fragmentationen-Intensitäten (m/z 79) vom Oktapol-Offset (API-CID) unter alkalischen (pH 10,5) und sauren Bedingungen (pH 2,5) ($5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Spritzenpumpen-Infusion). Die Datenaufnahme erfolgte im Hybrid-Scan-Verfahren (Abb. 5.56). Hybrid-Scan-Bedingungen: + 4,5 kV ESI-Spannung; negativer Ionenmodus; API-CID: Oktapol-Offset-Werte (Q0) siehe Diagramm; Q1 Scan im Bereich von 75-105 m/z für 1,5 sec; niedriges Potential: 0V Oktapol-Offset (Q0); Q1 Scan im Bereich von 300-2000 m/z in 3 sec. Beim sauren API-CID-Hybrid-Scan-Experiment wurde bei niedrigem Q0-Potential in den positiven Ionenmodus gewechselt.

Abbildung 5.59.A zeigt das negativ-Ionen-ESI-API-CID-Hybrid-Scan-Massenspektrum des Tyrosin-phosphorylierten pp60 c-src-Peptides ($T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$, $6,5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), welches bei niedrigem Q0-Offset-Potential (10 V, Scan 300-2000 m/z in 3 sec) unter

alkalischen Bedingungen (pH 10,5) aufgezeichnet wurde. Bei der Ionisierung bildeten sich hauptsächlich $[M-2H]^{2-}$ -Phosphopeptid-Molekülon (m/z 770,4; S/N-Verhältnis von 110). Abbildung 5.59.B zeigt zusätzlich das negativ-Ionen-ESI-API-CID-Hybrid-Scan-Massenspektrum, welches bei einem hohem Q0-Offset-Potential (100 V, Scan 70-105 m/z in 1,5 sec) aufgezeichnet wurde. Die m/z 79- und m/z 97-Fragmentationen ($[PO_3]^-$ bzw. $[H_2PO_4]^-$), welche infolge der Kollisionsaktivierung gebildet wurden, sind deutlich zu erkennen. Beim sauren API-CID-Hybrid-Scan-Experiment (pH 2,5, TFA) wurde im Vergleich zu dem Experiment unter alkalischen Bedingungen die Ionisierungspolarität während des Hybrid-Scans gewechselt (Abb. 5.59.B). Die Spektren im positiven Ionenmodus wurden bei einem niedrigen Q0-Offset-Potential (kein API-CID) ermittelt. Bei der Ionisierung bildeten sich hauptsächlich $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Molekülonen (m/z 772,4, S/N-Verhältnis von 54, Abb. 5.59.B). Zur Erzeugung der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) wurde in den negativen Ionenmodus gewechselt (100 V Q0-Offset-Potential). Im Vergleich zu dem alkalischen Experiment (Abb. 5.59.A) wurde lediglich ein verrauschtes API-CID-Fragmentationenspektrum erhalten, zudem war die Intensität der Markerionen deutlich niedriger (Abb. 5.59.A bzw. B).

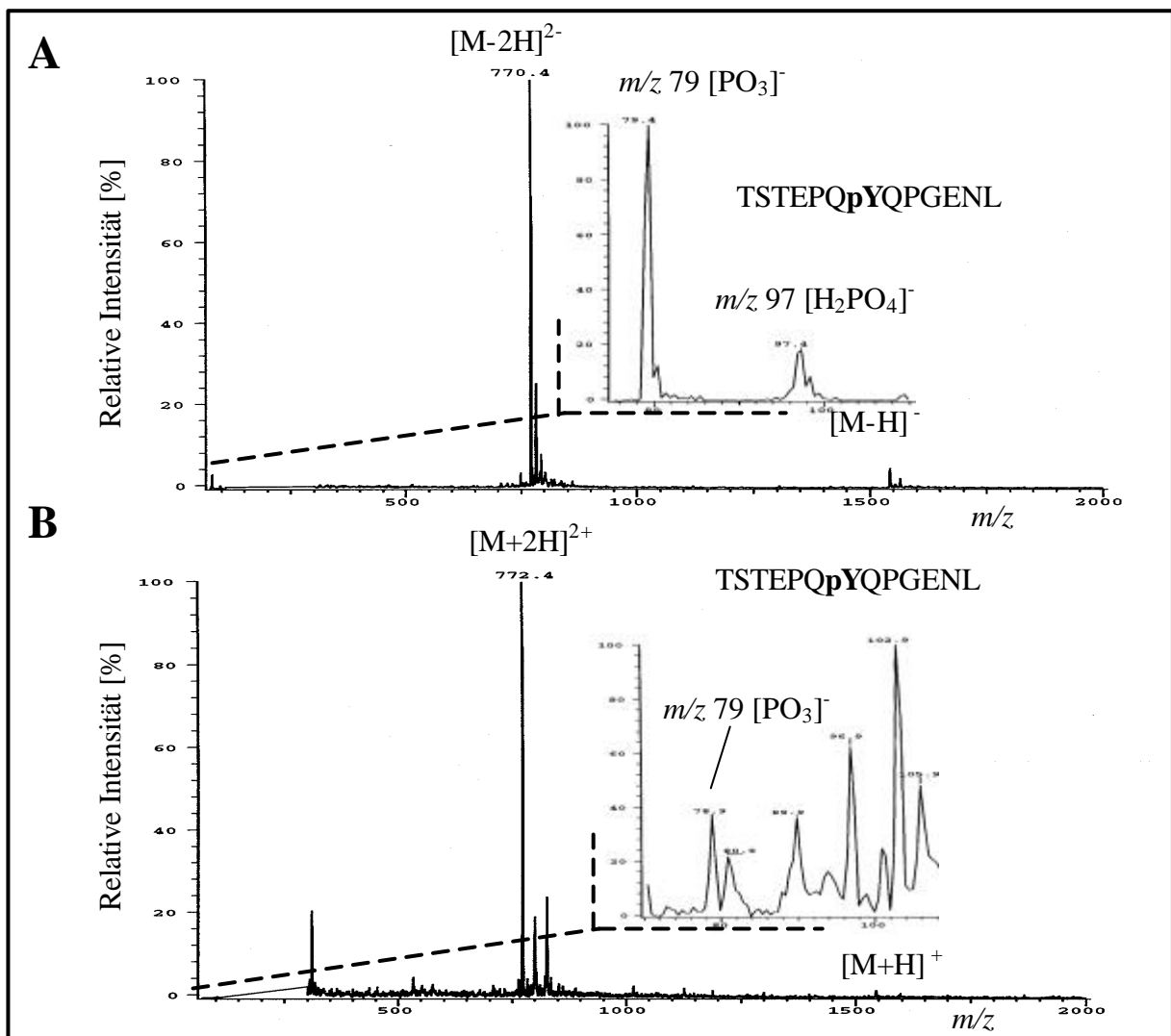


Abb. 5.59. (A) Negativ-Ionen-ESI-API-CID-Hybrid-Scan-Massenspektrum (TSQ 700) des Tyrosin-phosphorylierten pp60 *src*-Peptids $T^{521}STEPQpYQPGENL^{533}$ ($6,5 \text{ pmol} \mu\text{l}^{-1}$, pH 10,5), welches bei einem Q0-Offset-Potential von 100 V ermittelt wurde (siehe Abb. 5.58.B)

und (B) negativ/positiv-Ionen-ESI-API-CID-Hybrid-Scan-Massenspektrum des pp60 c-src-Peptids ($6,5 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$, pH 2,5), welches ebenfalls bei einem Q0-Offset-Potential von 100 V ermittelt wurde (siehe Abb. 5.58.B). Bedingungen siehe Abb. 5.57.

5.8.2.3. Sensitivität der alkalischen negativ-Ionen-API-CID-Hybrid-Scan-Methode

Bei den folgenden Experimente sollte die Empfindlichkeit des alkalischen (pH 10,5) negativ-Ionen-API-CID-Hybrid-Scan-Verfahrens ermittelt werden (Spritzenpumpeninfusion von HSP-Lösungen). Die Intensitäten der $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Quasimolekülonen und der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) wurden dazu bei unterschiedlichen HSP-Konzentrationen aufgezeichnet.

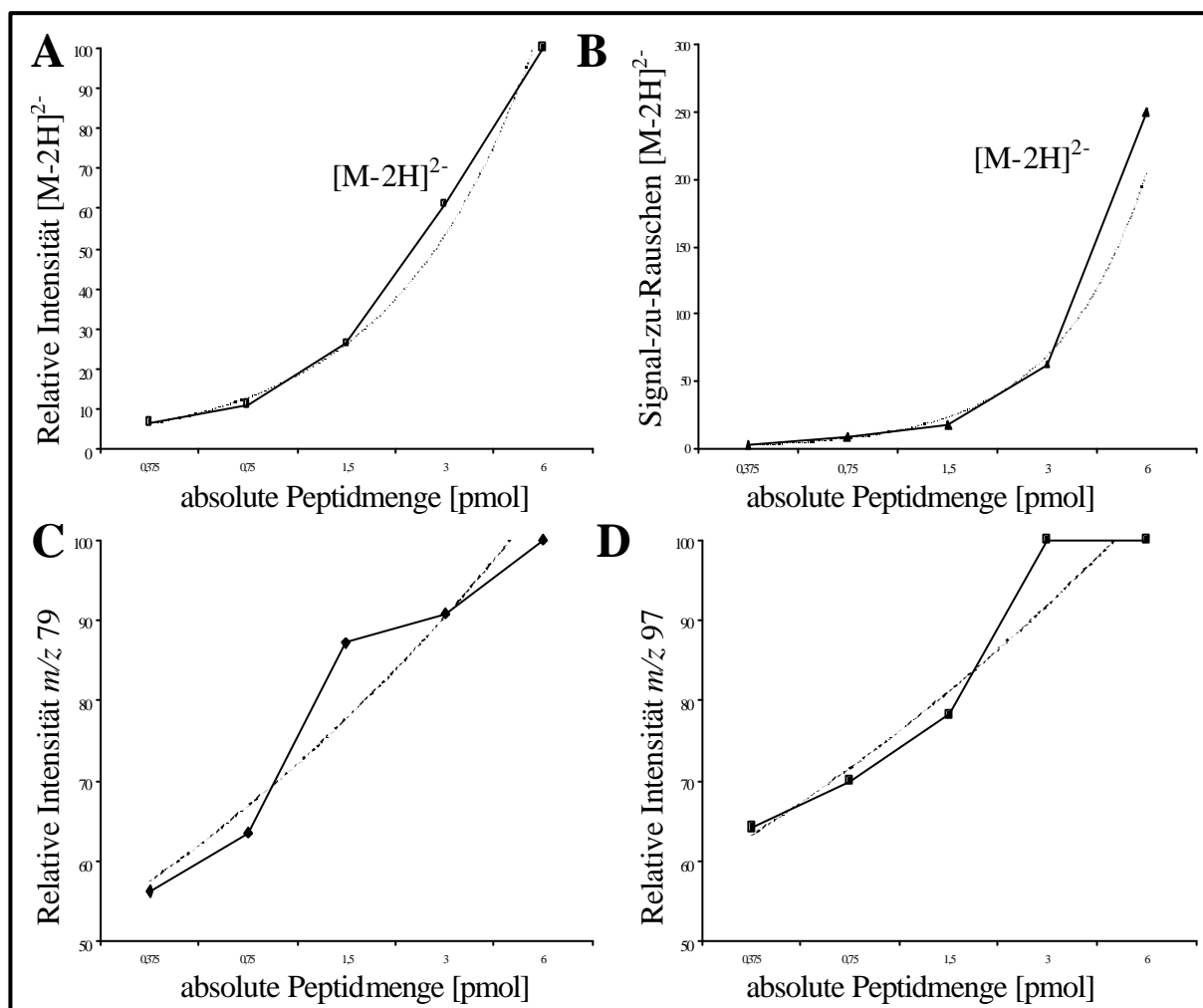


Abb. 5.60. Ermittlung der Empfindlichkeit der alkalischen (pH 10,5) negativ-Ionen-API-CID-Hybrid-Scan-Methode (40 V Q0-Offset) anhand des Serin-phosphorylierten HSP $\text{C}^{81}\text{LNRQLpSSGVSEIR}^{94}$. (A und B) Relative Intensität und berechnetes S/N-Verhältnis der $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Quasimolekülonen in Abhängigkeit der HSP-Konzentration. (C und D) Relative Intensität der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 bzw. m/z 97) in Abhängigkeit der HSP-Konzentration. Die berechneten Trends wurden in den Diagrammen als unterbrochene Linien dargestellt. Bedingungen: Peptid-Konzentrationen von 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 $\text{pmol}\mu\text{l}^{-1}$ in wässriger 50 % MeOH (v/v), pH 10,5 (NH_3); $5 \mu\text{l}\text{min}^{-1}$ Flussrate (Spritzenpumpe), $5 \mu\text{l}\text{min}^{-1}$ Sheath-Flüssigkeit (wässrige 70 % MeOH (v/v)); negativ-Ionen-Hybrid-Scan: API-CID: 40 V Q0-Offset; Scan in Q1 für 1,5 sec im Bereich von 75-100 m/z ;

niedriges Potential: 0 V Q0-Offset; Scan in Q1 für 3 sec im Bereich von 300-2000 m/z; insgesamt 8 Scans jeweils 4,5 sec (36 sec entspricht 3 µl Absolutverbrauch); MS-Gerät: TSQ 700).

Mit zunehmender HSP-Konzentration nimmt die relative Intensität sowie das berechnete S/N-Verhältnis der $[M-2H]^{2-}$ -HSP-Quasimolekülen zu (Abb. 5.60.A und B). Mit linear zunehmender Peptidkonzentration nimmt sowohl die Intensität als auch das berechnete S/N dabei nicht linear, sondern exponentiell zu. Mit der 50 µm I.D. ESI-Quarzglas-Kapillare konnte war für das $[M-2H]^{2-}$ -HSP-Quasimolekül selbst bei einer Konzentration von 125 fmol·µl⁻¹ noch ein S/N-Verhältnis von 2,9 zu beobachten. Die Intensität der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentionen (*m/z* 79 bzw. *m/z* 97) nimmt mit linear zunehmender HSP-Konzentration ebenfalls nahezu exponentiell zu (Abb. 5.60.C und D).

5.8.2.4. Untersuchung eines tryptischen b-Caseinverdaus mittels negativ-Ionen-µLC/ESI-API-CID-MS und µLC/ESI-MS unter alkalischen Bedingungen

Bei dem folgenden Experiment wurden die optimierten pH-Bedingungen und Q0-Offset-Werte zur *on-line*-µLC/ESI-API-CID- und µLC/ESI-MS-Analyse der Phosphopeptide eines tryptischen β-Caseinverdaus eingesetzt (Abb. 5.61). Bei dem Experiment sollte auch das Verhalten der Phosphopeptide während der LC-Elution- und der ES-Ionisierung genauer untersucht werden. Die Analyse bestand aus zwei direkt aufeinander folgenden Experimenten, bei denen jeweils 50 pmol tryptisch verdautes β-Casein eingesetzt wurde. Anhand der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentionen (*m/z* 79 und *m/z* 97), welche bei dem negativ-Ionen-µLC/ESI-API-CID-Experiment (hohes Q0-Offset-Potential, 130 V, API-CID) gebildet wurden, konnten die Phosphopeptide zunächst detektiert werden (Abb. 5.61.B). Anschließend wurden die Peptidmassen der Phosphopeptide mit Hilfe eines negativ-Ionen-µLC/ESI-MS-Experimentes (niedriges Q0-Offset-Potential) ermittelt (Abb. 5.61.A). Bei der Auswertung wurden die Chromatogramme überlagert und die Phosphopeptide somit anhand der Signale der *m/z* 79- und 97-Markerionen-Spuren ermittelt. Mit Hilfe von FindMod (ExPASy-Datenbank), einem Programm zur Identifizierung postribosomal modifizierter Peptide, wurden die ermittelten Phosphopeptide schließlich über das Internet identifiziert (Tab. 5.9).

Tab. 5.9. *Tabellarische Auflistung der tryptischen Phosphopeptide des b-Caseinverdaus, welche mit Hilfe des alkalischen µLC/ESI-MS-Experimentes identifiziert wurden (Abb.5.61.A). Die Auswertung erfolgte über das Internet mit Hilfe von FindMod, einem Programm zur Identifizierung postribosomal modifizierter Peptide (<http://www.expasy.ch/tools/findmod/>).*

Position Start	Ende	$[M-H]^-$ _{m.i.} best. ⁽¹⁾	$[M-H]^-$ _{m.i.} theor. ⁽¹⁾	Dm	R _t ⁽²⁾ [min]	Mod.	MC ⁽³⁾	Sequenz
48	63	2060,0	2059,8	0,2	4,0	1PO ₄	0	FQpSEEQQQTEDE LQDK ⁽⁴⁾
17	40	2963,8	2994,2	0,9	10	4PO ₄	0	ELEELNVPGEIVEp SLpSpSpSEESITR
16	40	3118,6	3120,3	0,9	10	4PO ₄	1	RELEELNVPGEIVE pSLpSpSpSEESITR

(1) *monoisotopische Molekulargewichte der einfach protonierten Peptide*

(2) *Retentionszeit im ESI-Base-Peak-Chromatogramm*

(3) *Missed Cleavage (Protease verpasst eine Schnittstelle)*

(4) *Phosphoserin pS*

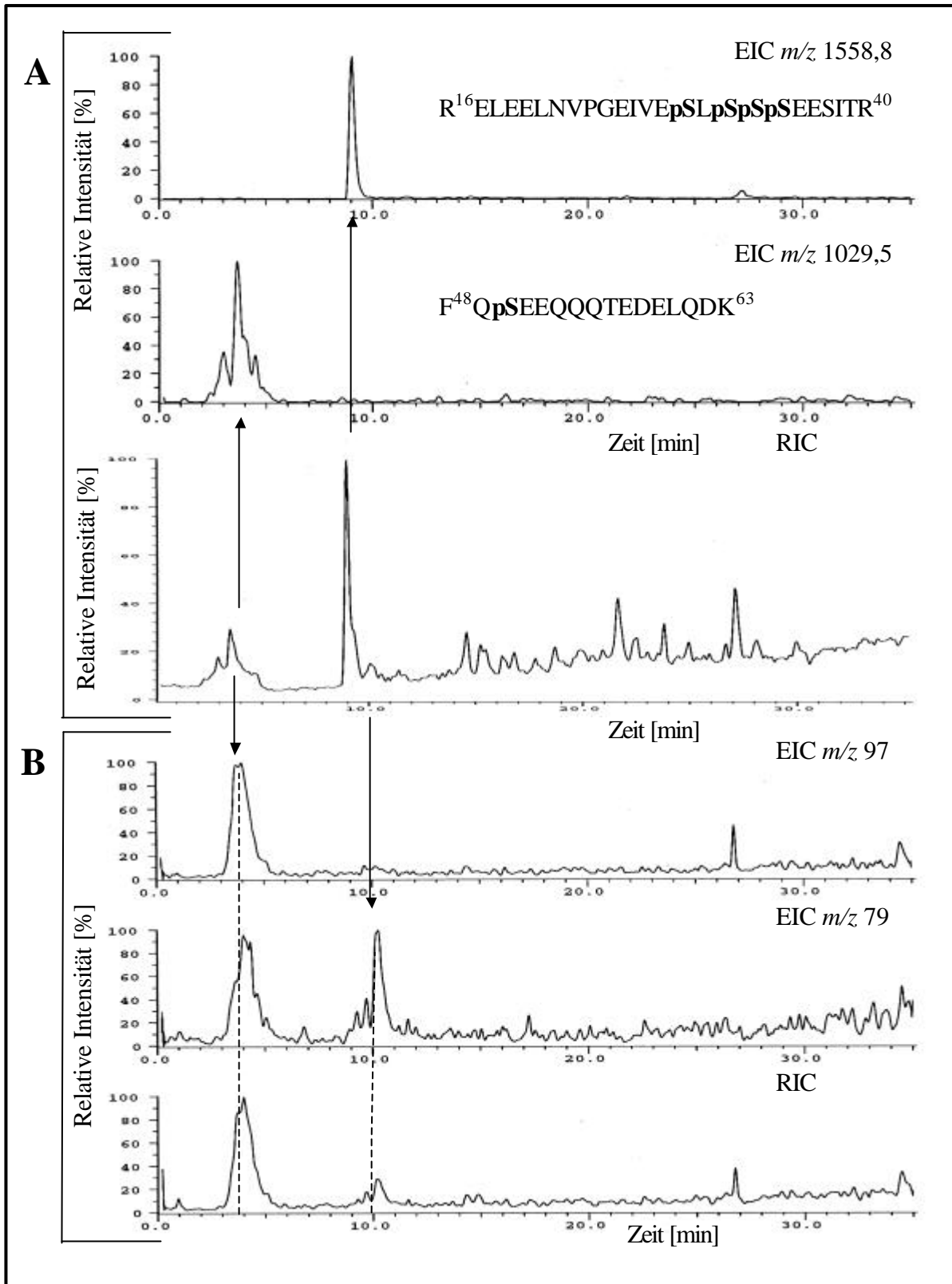


Abb. 5.61. Alkalische (pH 10,5) negativ-Ionen- μ LC/ESI-MS- und μ LC/ESI-API-CID-MS-Analyse (TSQ 700) von jeweils 50 pmol eines tryptischen **b**-Caseinverdaus. (A) Ermittlung der Peptidmassen mit Hilfe einer μ LC/ESI-MS-Analyse. Untere Spur: RIC (400-2500 m/z). Mittlere und obere Spur: EIC's der mono- (4 min Retentionszeit) und tetra-phosphorylierten (10 min Retentionszeit) Peptide. (B) Detektion der Phosphopeptide mit Hilfe eines μ LC/ESI-

API-CID-MS-Experimentes. Untere Spur: RIC (70-105 m/z). Mittlere und obere Spur: EIC's der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Markerionen (m/z 79 bzw. m/z 97). Bedingungen: LC: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μm I.D. (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); Flussrate: 5 $\mu l \text{min}^{-1}$; Elutionsmittel: Puffer A: wässrige NH_3 (pH 10,5); Puffer B: 80 % ACN in wässriger NH_3 (pH 10,5); Gradient: 0-80 % B in 40 min; Injektion: 50 pmol **b**-Caseinverdau in 10 μl Puffer A; MS: 5 $\mu l \text{min}^{-1}$ Sheath-Flüssigkeit (70 % MeOH in H_2O (v/v)); 60 psi Sheath-Gas; $\mu LC/ESI-MS$: 10 V API-CID Offset, Scan in Q_3 im Bereich von 400-2500 m/z in 3 sec; $\mu LC/ESI-API-CID-MS$: 130 V Q_0 -Offset, Scan in Q_3 im Bereich von 70-105 m/z in 1,5 sec.

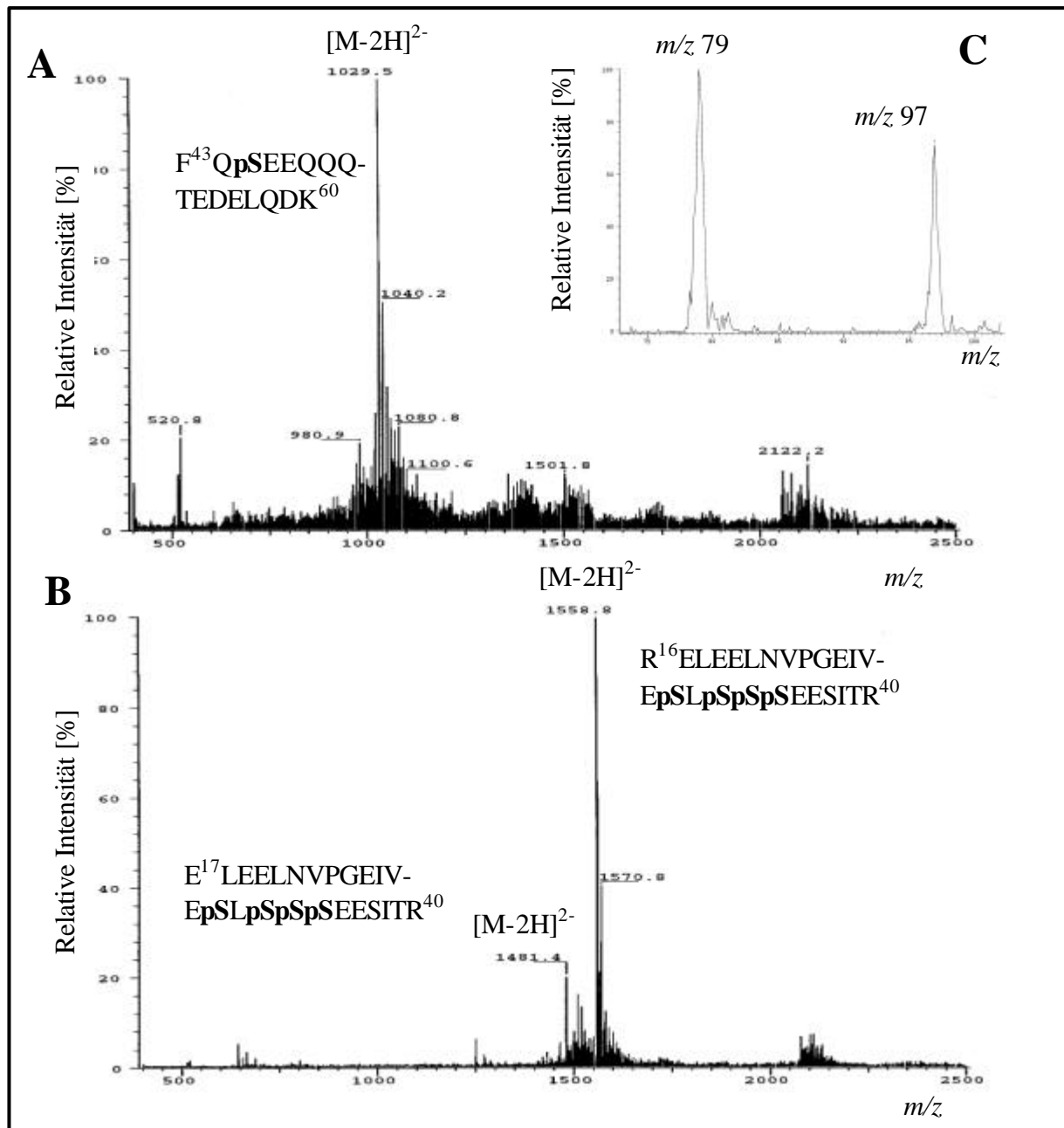


Abb. 5.62. Negativ-Ionen- $\mu LC/ESI$ -Massenspektren (TSQ 700) der Phosphopeptide des tryptisch verdauten **b**-Caseins, welche bei dem alkalischen (pH 10,5) negativ-Ionen- $\mu LC/ESI$ -Experiment (Abb. 5.61.A) aufgezeichnet wurden. (A) Aufsummiertes Massenspektrum (Scans 38-110) des einfach-Serin-phosphorylierten tryptischen **b**-Casein-Peptidfragmentes $F^{48}QpSEEQQQTEDELQDK^{63}$, welches nach 3 min eluierte (B) Aufsummiertes

*Massenspektrum (Scans 170-188) des vierfach-Serin-phosphorylierten tryptischen **b**-Casein-Peptidfragmentes R^{16} ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR⁴⁰, welches nach 9 min eluierte. (C) Massenspektrum (Scans 80-200) der $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentionen (m/z 79 bzw. m/z 97), welche beim alkalischen μ LC/ESI-API-CID-MS-Experiment (Abb. 5.61.B) während der Elution des einfach-Serin-phosphorylierten tryptischen **b**-Casein-Peptidfragmentes detektiert wurden.*

Zur Detektion der Phosphopeptide des tryptisch verdauten β -Caseins wurde zuerst ein negativ-Ionen- μ LC/ESI-API-CID-MS-Experiment unter alkalischen Bedingungen (pH 10,5) durchgeführt (Abb. 5.61B). Bei konstant hohem Q0-Offset-Potential (130 V, API-CID) wurde während der gesamten LC-Elution (pH 10,5) im Bereich von 70-105 m/z gescannt. Im RIC wurden dabei zwei Signale bei Retentionszeiten von 4 und 10 min erhalten (untere Spur Abb. 5.61.B). Die EICs der phosphorylierungsspezifischen $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Markerionen (m/z 79 bzw. m/z 97) sind im mittleren bzw. im oberen Teil von Abb. 5.61.B abgebildet. Im m/z 79 EIC ($[PO_3]^-$ -Fragmentation) waren ebenfalls zwei Signale bei Retentionszeiten von etwa 4 und 10 min enthalten (mittlere Spur Abb. 5.61.B). Das m/z 97-EIC ($[H_2PO_4]^-$ -Fragmentation) enthielt nur ein einziges Signal bei einer Retentionszeit von 4 min. Anhand der EIC-Signale (m/z 79 bzw. 97) war somit klar zu erkennen, dass bei den Retentionszeiten von 4 bzw. 10 min phosphorylierte Peptide von der Säule eluierten, welche beim negativ-Ionen-API-CID $[PO_3]^-$ - bzw. $[H_2PO_4]^-$ -Markerionen (m/z 79 bzw. m/z 97) erzeugten. Nur beim Phosphopeptid, welches nach 4 min eluierte, war eine gleichzeitige Bildung von $[PO_3]^-$ - und $[H_2PO_4]^-$ -Fragmentionen (m/z 79 bzw. m/z 97) zu beobachten, dagegen bildeten sich beim Phosphopeptid, welches nach 10 min eluierte, lediglich $[PO_3]^-$ -Fragmentionen (m/z 79). Durch ein μ LC/ESI-MS-Experiment konnten die detektierten Phosphopeptide dann identifiziert werden (Abb. 5.61.A). Dabei wurden sowohl der Ionenmodus als auch die LC-Bedingungen beibehalten (negative Ionisierung, Gradient, pH-Wert 10,5), das Q0-Offset-Potential wurde jedoch erniedrigt (kein API-CID); zudem wurde über einen Bereich von 400-2500 m/z gescannt (Abb. 5.61.A). Im RIC (rekonstruiertes Ionenchromatogramm) konnte nach 4 min Retentionszeit ein relativ intensives, breites Signal, nach 10 min Retentionszeit ein sehr intensives, schmales Signal (dreifache Intensität im Vergleich zu dem Signal bei 4 min) beobachtet werden (untere Spur Abb. 5.61.A). Die Peptide, welche später eluierten, erzeugten im RIC nur relativ schwache Signale. Durch Überlagerung der RICs (untere Spuren Abb. 5.61.A und B) konnten die beiden Signale eindeutig den beim μ LC/ESI-API-CID-MS-Experiment detektierten Phosphopeptiden zugeordnet werden (Abb. 5.61.B). Die Identifizierung der Phosphopeptide erfolgte schließlich anhand der negativ-Ionen-Massenspektren, welche während des μ LC/ESI-MS-Experimentes aufgezeichnet wurden (Abb. 5.62). Die ermittelten Peptidmassen wurden über das Internet mit Hilfe von FindMod identifiziert (Tab. 5.9). Das einfach-Serin-phosphorylierte tryptische β -Casein-Peptidfragment F^{48} QpSEEQQTEDELQDK⁶³ (M_w 2060,8 Da), welches nach 4 min eluierte, konnte anhand seines zweifach-negativ-geladenen $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülionen-Signals bei m/z 1029,5 identifiziert werden (Abb. 5.62.A, aufsummiertes Massenspektrum, Scans 38-110). Das S/N-Verhältnis diese Signals betrug 46. Bei dem μ LC/ESI-API-CID-MS-Experiment (Abb. 5.61.B, Scans 80-200) erzeugte das Phosphopeptid die phosphorylierungsspezifischen m/z 79- und m/z 97-Fragmentionen ($R_t = 4$ min, Abb. 5.62.C). Die Auswertung des zweiten RIC-Signals ($R_t = 9$ min, Scans 170-188) ergab, dass zu diesem Zeitpunkt gleichzeitig zwei Phosphopeptide von der Säule eluierten (Abb.5.61.A). Im aufsummierten Massenspektrum war sowohl das Signal des $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions (m/z 1558,8) des einfach fehlgeschnittenen, vierfach-Serin-phosphorylierten tryptischen β -Casein-Peptidfragmentes R^{16} ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR⁴⁰, als auch das $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülionen-Signal (m/z 1481,4) des entsprechenden nicht-fehlgeschnittenen Phosphopeptids

E^{17} LEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR⁴⁰ zu erkennen (Abb. 5.62.B). Die S/N-Verhältnisse der beiden Signale (m/z 1558,8 und m/z 1481,4) betragen 120 und 25. Das Verhältnis der ermittelten S/N-Werte der beiden $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülonen-Signale m/z 1029,5 (R_t 4 min, Abb. 5.62.A) und m/z 1558,8 (R_t 9 min, Abb. 5.62.B) von 1:3 entsprach somit dem bei dem μ LC/ESI-API-CID-MS-Experiment beobachteten Intensitätsverhältnis dieser Ionen (Abb. 5.61.A). Die EIC's der Phosphopeptide (m/z -Werte der $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülonen) wurden ebenfalls abgebildet (obere und untere Spur Abb. 5.61.A).

5.8.2.5. μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scantechnik unter alkalischen Bedingungen

Bei diesem Experiment wurden 30 pmol Serin-phosphoryliertes HSP C⁸¹LNRQLpSSGVSEIR⁹⁴ mit Hilfe einer alkalischen (pH 10,5) negativ-Ionen- μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Methode analysiert. Im negativen Ionenmodus wurden dabei während eines Hybrid-Scans (Abb. 5.63) zunächst die phosphorylierungsspezifischen m/z 79- und m/z 97-Markerionen erzeugt (hohes Q0-Offset-Potential (API-CID)) und anschließend die Phosphopeptid-Molekülonen ermittelt (niedriges Q0-Offset-Potential).

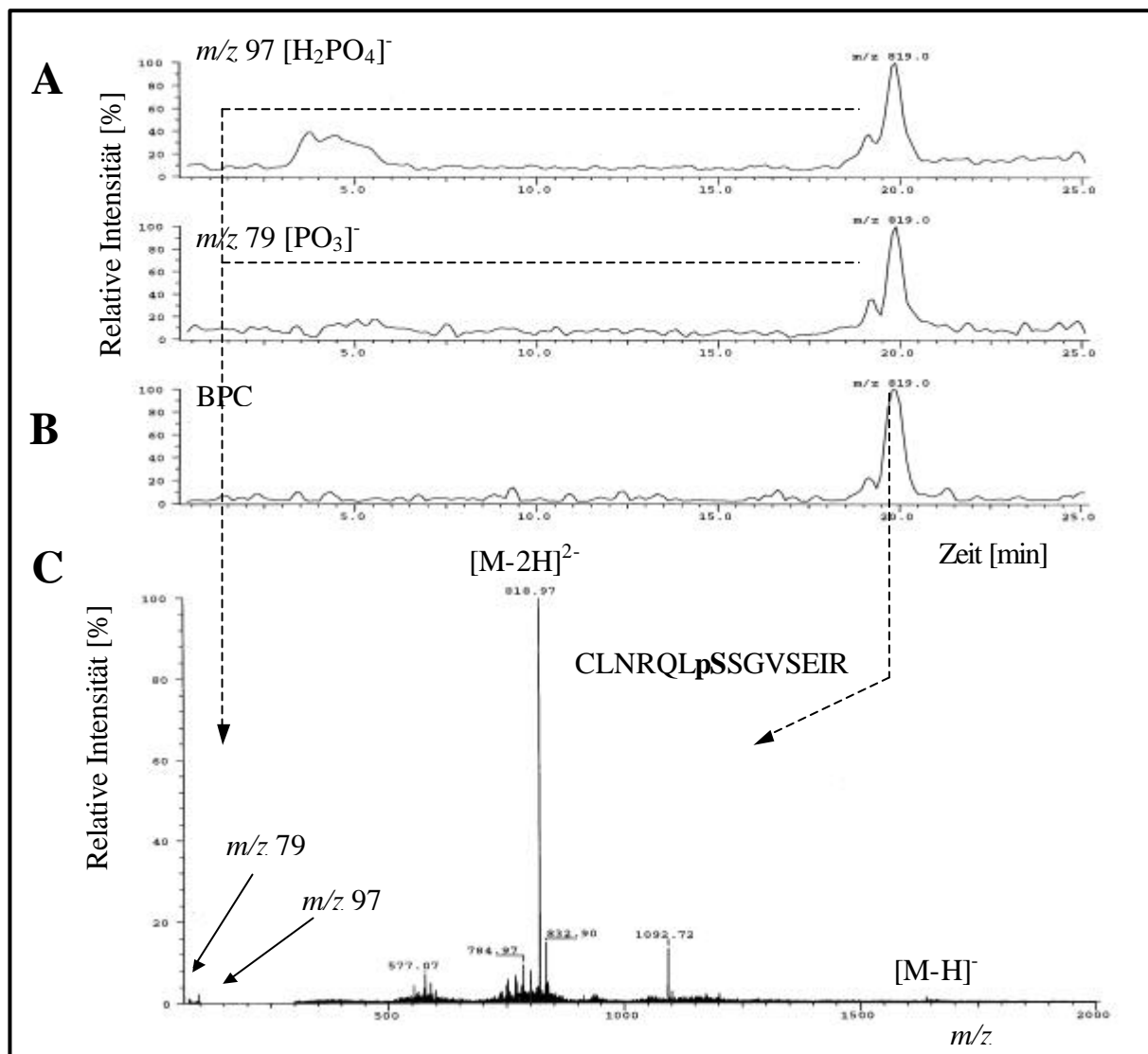


Abb. 5.63. Alkalische (pH 10,5) negativ-Ionen- μ LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Analyse (TSQ 700) des Serin-phosphoryliertes HSP C⁸¹LNRQLpSSGVSEIR⁹⁴ (30 pmol). (A) Obere

und untere Spur: EICs der phosphorylierungsspezifischen m/z 79- und m/z 97-Markerionen. (B) BPC des eluierten Phosphopeptids. (C) Aufsummiertes Massenspektrum des Signals im BPC (Scans 180-210). Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μm I.D. (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Flussrate; Elutionsmittel: Puffer A: wässrige NH_3 (pH 10,5); Puffer B: 80 % ACN in wässriger NH_3 (pH 10,5); Gradient: 0-80 % B in 40 min; Injektion: 30 pmol HSP gelöst in 10 μl Puffer A; MS: 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ Sheath-Flüssigkeit (70 % MeOH in H_2O (v/v)); 60 psi Sheath-Gas; negativ-Ionen-Hybrid-Scan-Methode: + 4,5 kV ESI-Spannung; API-CID: 70 V Oktapol-Offset (Q0); Q3 Scan im Bereich von 75-100 m/z in 1,5 sec; Offset-Wechsel; 0 V Oktapol-Offset (Q0); Q3 Scan im Bereich von 300-2000 m/z in 3 sec; Emult 1500; Egain 8; Dynode 15 kV; ESI-Kapillare: 50 μm I.D. Quarzglas-Kapillare.

Mit Hilfe des alkalischen (pH 10,5) negativ-Ionen- $\mu\text{LC}/\text{ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experimentes}$ konnte das Phosphopeptid ($R_t = 20$ min) sowohl detektiert als auch identifiziert werden. Für die Detektion wurden die beim API-CID erzeugten m/z 79- und m/z 97-Markerionen herangezogen. Die Identifizierung erfolgte anhand der negativ geladenen Phosphopeptid-Molekülonen (niedriges Q0-Offset-Potential, Abb. 5.63). Bei 70 V Q0-Offset (API-CID) bildeten sich sowohl $[\text{PO}_3]^-$ - als auch $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen (EIC's der m/z 79- und 97-Markerionen, Abb. 5.63.A). Im BPC war bei einer Retentionszeit von etwa 20 min ebenfalls ein intensives Signal zu beobachten (Abb. 5.63.B). Die Identifizierung des Phosphopeptids erfolgte anhand des aufsummierten negativ-Ionen-Massenspektrums (Scans 180-210, Abb. 5.63.C). Bei seiner Ionisierung erzeugte das Phosphopeptid sowohl ein einfach-geladenes $[\text{M-H}]^-$ -Molekülon bei m/z 1639,0 als auch ein zweifach-geladenes $[\text{M-2H}]^{2-}$ -Quasimolekülon bei m/z 819,0. Für das $[\text{M-2H}]^{2-}$ -Signal konnte ein S/N-Verhältnis von 150 berechnet werden.

5.9. *'In vivo'*-Phosphorylierung der HIR- β -UE und deren Einfluss auf die Substrat- und Autophosphorylierung

Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheit des humanen Insulinrezeptors (HIR) führt zur direkten Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste innerhalb der β -Untereinheit (β -UE) des Rezeptors. Es handelt sich dabei um folgende 6 Tyrosinreste: Tyr1146/50/51 innerhalb der katalytischen Kinasedomäne, Tyr1316/1322 im COOH-terminalen Teil der β -UE und Tyr960 innerhalb der Juxtamembranregion. Experimentell konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Phosphorylierung der drei Tyrosinreste innerhalb der Kinasedomäne für die Signaltransduktion des Rezeptors essentiell notwendig ist [549]. Außerdem spielen diese Tyrosinreste bei der Wechselwirkung mit der Rezeptor-Tyrosinkinase-Liganden-Bindungsdomäne des IRS-2 (Insulinrezeptorsubstrat-2) eine wichtige Rolle [550]. Die Phosphorylierung von Tyr960 scheint für die Anbindung der Phosphotyrosin-Bindungs-Domänen (PTB) verschiedener *Docking*-Proteine wichtig zu sein [416]. Der raschen insulinstimulierten Tyrosinphosphorylierung der HIR- β -UE folgt eine etwas langsamere Zunahme von Serin- und Threoninphosphorylierungen [549]. Obwohl die insulinstimulierte Ser/Thr-Phosphorylierung bereits 1982 [502] zum ersten Mal beschrieben wurde, ist bislang unklar, welche funktionelle Bedeutung dieser innerhalb der Insulin-Signaltransduktionskaskade zukommt. In den vergangenen Jahren konnten etliche Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen innerhalb der β -UE identifiziert werden. Die Stellen, bei welchen man annimmt, dass sie infolge Stimulation der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden, sind: Thr1336 [510], Ser1293/94 [551], Ser1315 [509], Ser1309 [552] und Ser1023/1025 [507]. An den Serinresten 955/56 innerhalb der Juxtamembranregion scheint eine insulinstimulierte Phosphorylierung aufzutreten [401,553]. Die Serin-phosphorylierten Domänen könnten möglicherweise die IR-Kinaseaktivität unterdrücken und somit eine verringerte Insulin-Signalwirkung bewirken. Diese Vermutung beruht auf Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, dass sowohl die Stimulation der PKC mit Phorbolestern als auch hyperglykämische Bedingungen sowie die Transfektion von Zellen mit den PKC-Isoformen α , β , ϵ , θ entweder die Tyrosin-Autophosphorylierung des IR oder die insulinabhängige Tyrosinphosphorylierung von Elementen im Abwärtsstrom der Insulin-Signalkette verringern können [513,518,554]. Die Serinphosphorylierung des IRS-1 scheint bei einigen PKC-Isoformen (α , β , θ) ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf den Insulinrezeptor auszuüben.

5.9.1. *Untersuchung des Einflusses der Serinreste 1177/78/82 des HIR auf die 'in vivo'*-Substrat- und Autophosphorylierung

Während die PKC-abhängige Serinphosphorylierung zu einer offensichtlichen Änderung des Molekulargewichts von IRS-1 führt, konnte über eine entsprechende Molekulargewichtsänderung beim IR nicht berichtet werden [518]. Bislang ist unklar, ob die PKC-abhängige Serinphosphorylierung des IR in ausreichender Menge erfolgt bzw. diese für die Unterdrückung des IR-Signals notwendig ist. Mit Hilfe von 16 Serinmutanten sowie einem Konstrukt, bei welchem der COOH-terminale Bereich des HIR entfernt wurde, wurde der Einfluss der Unterdrückung der IR-Kinase nach Behandlung der Zellen mit 2-Deoxyglucose untersucht [555]. Es konnte gezeigt werden, dass keine dieser Serinstellen für die 2-Deoxyglucose-abhängige Unterdrückung des Rezeptors notwendig war [556]. In einem cotransfizierten System in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) wurde mit Hilfe dieser Konstrukte ebenfalls der Einfluss der PKC-abhängigen Unterdrückung des Rezeptors untersucht. Bei den Mutanten HIR994 und HIR1023/25 trat eine verringerte Unterdrückung durch PKC- β 2 und - θ auf. Dies lässt vermuten, dass diese Domänen für die inhibitorischen Effekte der PKC auf den IR wichtig sind [557]. Neben der potentiellen Funktion der

Serinphosphorylierung auf die negative Modulation des IR ist auch eine Rolle im stromabwärts gelegenen Signalweg denkbar und sollte aus diesem Grund ebenfalls untersucht werden. Die Phosphorylierungsmuster des mutierten (Ser1177/78/82→Ala) und des Wildtyp IR wurden dazu mit Hilfe von *'in vivo'*-Markierungsexperimenten verglichen. Der [³²P]-markierte IR wurde dazu mittels Immunpräzipitation aus dem Lysat transient transfizierter (HIR) HEK-293-Zellen isoliert, die β-UE mittels SDS-PAGE gereinigt, reduziert (DTT), alkyliert (4-Vinylpyridin) und tryptisch im Gel verdaut. Danach wurden die daraus resultierenden Peptide mit Hilfe der μRP-HPLC aufgetrennt und in Fraktionen von jeweils 2 min gesammelt. Mit einem Cerenkov-Counter wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. Schließlich wurde ein MALDI-TOF-MS-basierendes Peptid-Mapping durchgeführt.

5.9.1.1. SDS-PAGE des immunpräzipitierten HIR

Zur Untersuchung des Einflusses der Serinreste 1177/78/82 auf die *'in vivo'*-Autophosphorylierung wurde der HIR zunächst radioaktiv markiert. Dazu wurden transient transfizierte (HIR) HEK-293-Zellen *'in vivo'* mit [³²P]Orthophosphat markiert. Die Zellen wurden lysiert und der IR mittels Immunpräzipitation (Antikörper 83-14) isoliert. Die β-UE wurde anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgereinigt [558]. Aufgrund des radioaktiven Ansatzes konnte nur eine sehr geringe Menge kultivierter Zellen eingesetzt werden. Die Proteinbanden konnten deshalb nicht durch Coomassie-Färbung, sondern nur autoradiographisch detektiert werden. Abbildung 5.64 zeigt exemplarisch ein CBB-gefärbtes SDS-Gel eines entsprechenden nicht-radioaktiven Experimentes, bei welchem eine weitaus größere Menge kultivierter Zellen eingesetzt wurde.

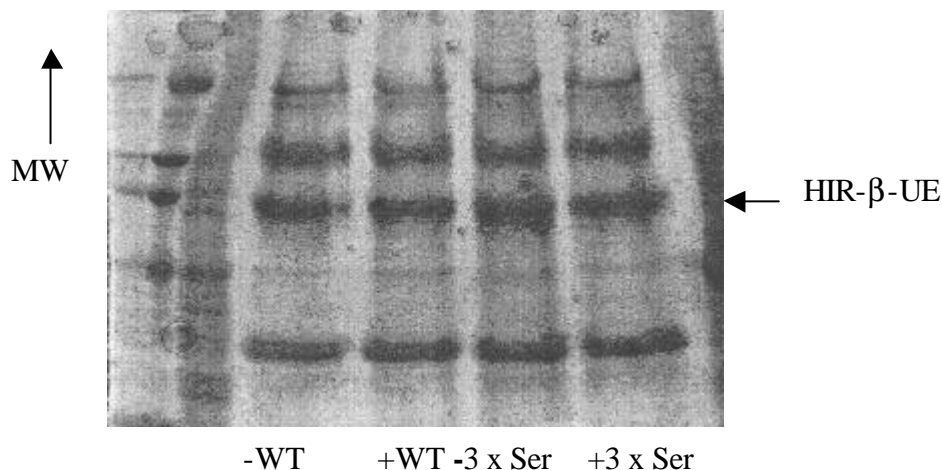


Abb. 5.64. SDS-PAGE-Reinigung der HIR-*b*-UE (CBB-Färbung). Der Rezeptor wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Zellysat transient transfizierter (HIR) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert. WT: Wildtyp HIR; 3 x Ser: Mutante Ser1177/78/82@Ala HIR, (+) insulinstimuliert ($10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$; 5 min bei 37°C) und (-) nicht insulinstimuliert.

Sowohl die insulinstimulierten als auch die nicht-stimulierten Wildtypen und Mutanten der HIR-β-UE konnten mit Hilfe der Immunpräzipitation aus dem Lysat der HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert und mittels SDS-PAGE gereinigt werden (Abb. 5.64). Die Mutationen Ser1177/78/82→Ala führten zu keiner feststellbaren Änderung des Molekulargewichts bzw. des Migrationverhaltens der HIR-β-UE während der SDS-PAGE.

Ebenso führte die Stimulation mit Insulin (10^{-7} mol l⁻¹; 5 min bei 37°C) weder bei den Wildtypen (M_w 69710,6 Da, nicht modifizierte HIR- β -UE), noch bei den Mutanten zu einer feststellbaren Änderung des Molekulargewichts bzw. des Migrationverhaltens während der SDS-PAGE.

5.9.1.2. UV- und Cerenkov-Chromatogramme der tryptisch im Gel gespaltenen Wildtypen und Mutanten der HIR-b-UE

Der Einfluss der Serinreste 1177/78/82 des HIR auf dessen Autophosphorylierung wurde anhand des direkten Vergleichs der μ RP-HPLC-Cerenkov-Chromatogramme der tryptisch im Gel gespaltenen [³²P]-markierten Mutanten und Wildtypen der HIR- β -UE untersucht. Zur Verhinderung der Oxidation der Cysteinreste wurden die Proteine vor ihrer tryptischen im Gel-Spaltung reduziert (DTT) und alkyliert (4-Vinylpyridin).

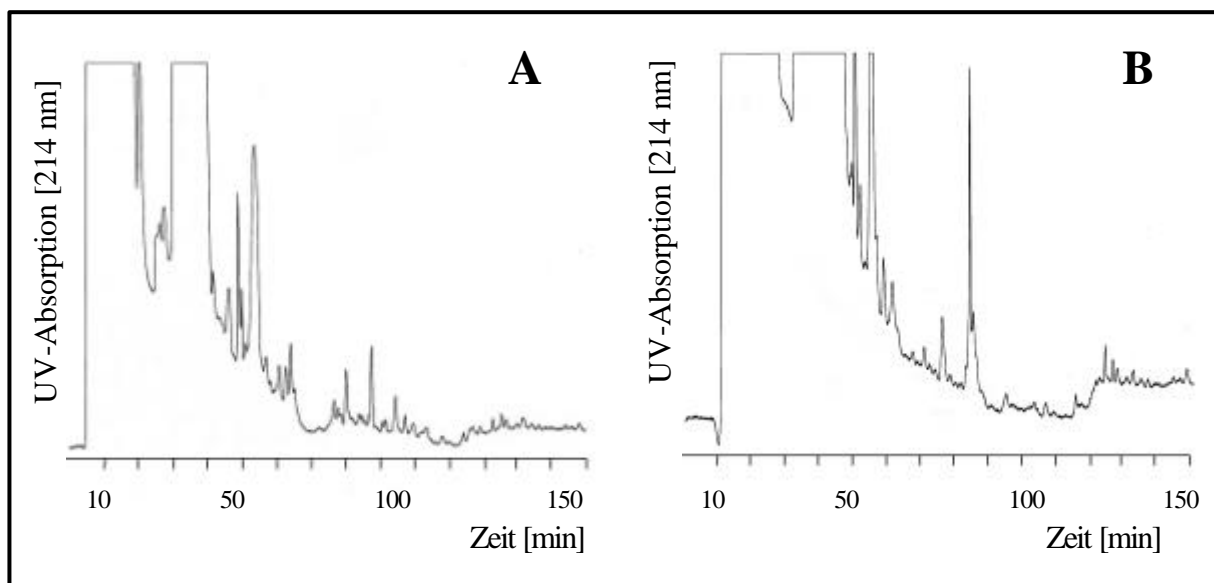


Abb. 5.65. μ RP-HPLC-Chromatogramme der tryptisch verdauten [³²P]-markierten HIR-**b**-UE. (A) +Wildtyp, (B) +Mutante. Wildtyp und Mutante wurden mittels Immunpräzipitation aus dem Lysat 'in vivo'-insulinstimulierter und [³²P]-markierter transient transfizierter (HIR) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE gereinigt und autoradiographisch detektiert (Abb. 5.64), im Gel reduziert (DTT), alkyliert (4-Vinylpyridin) und tryptisch gespalten. Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μ m (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); 5 μ l min⁻¹ Flussrate; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in H₂O; Puffer B: 80 % ACN, 0,075 % TFA in H₂O; Gradient: 20 min 5 % B, 110 min 45 % B, 140 min 95 % B, 150 min 95 % B; Injektion: SpeedVac-getrocknete Peptidmischung in 20 μ l Puffer A; UV-Detektion $\lambda = 214$ nm (Bubble-Zelle, ca. 150 μ m I.D.); Fraktionierung: jeweils 2 min.

Trotz der sehr empfindlichen UV-Detektion (Bubble-Zelle, ca. 150 μ m I.D.) wurden bei den μ RP-HPLC-Trennungen der tryptisch gespaltenen +Wildtyp und +Mutante der HIR- β -UE nur sehr wenig intensive UV-Signale erhalten (Abb. 5.65.A und B). Auf der Basis der beobachteten Signalintensitäten konnte von einer Proteinmenge von jeweils weniger als 1 pmol ausgegangen werden. Im Vergleich zur Mutante lag mehr Wildtyp vor.

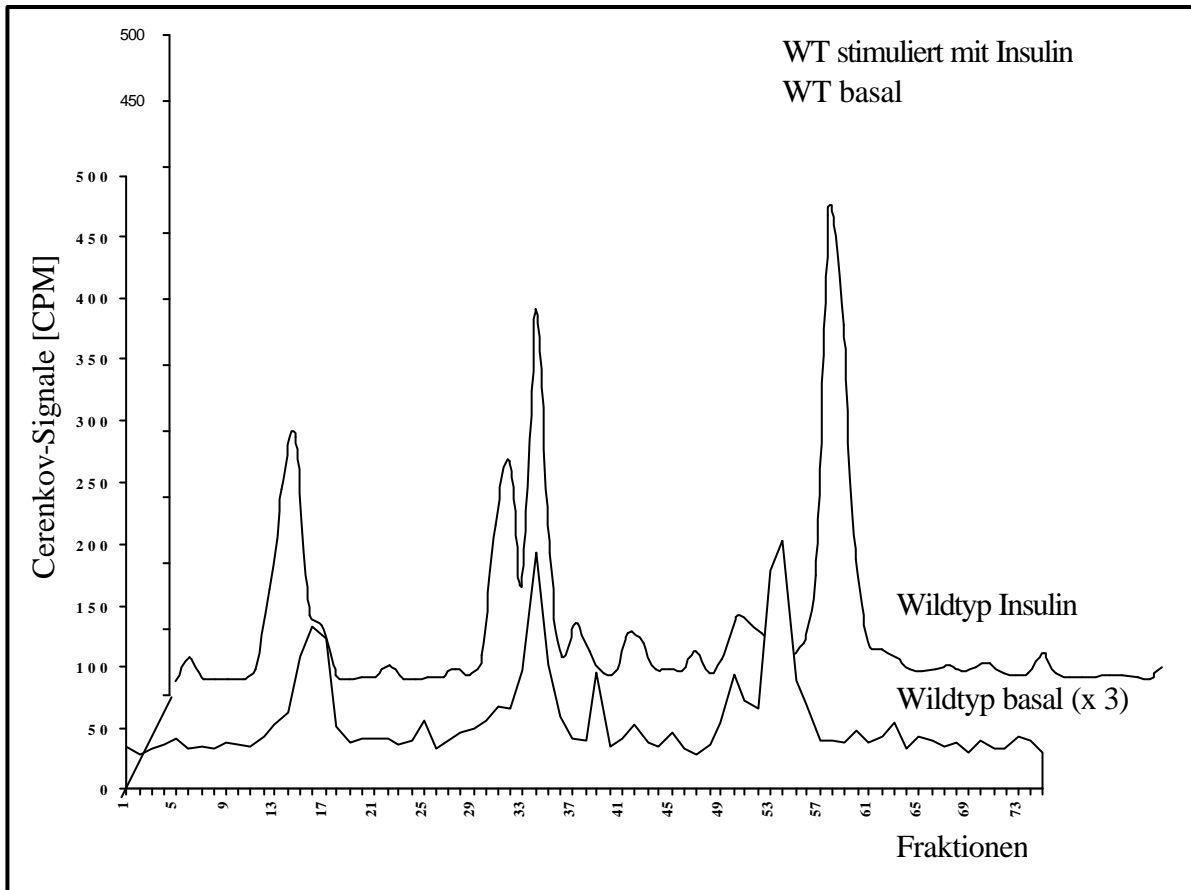


Abb. 5.66. μ RP-HPL- $[^{32}\text{P}]$ -Cerenkov-Chromatogramme der tryptisch verdauten basalen und insulinstimulierten Wildtypen der HIR- β -UE. Die Wildtypen wurden mittels Immunpräzipitation aus dem Lysat basaler bzw. 'in vivo'-insulinstimulierter, $[^{32}\text{P}]$ -markierter transient-transfizierter (HIR) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch detektiert (Abb. 5.64), im Gel reduziert (DTT), alkyliert (4-Vinylpyridin) und tryptisch gespalten. Die $[^{32}\text{P}]$ -markierten Phosphopeptide wurden durch Bestimmung der Cerenkov-Strahlung der einzelnen Fraktionen (2 min) detektiert. Mit einem Cerenkov-Counter wurde dazu von jeder Fraktion 3 mal für je 3 min die Cerenkov-Strahlung ermittelt (die Abbildungen zeigen jeweils die berechneten Mittelwerte). Zur besseren Darstellung wurden die ermittelten Werte des basalen Wildtyps mit Faktor 3 multipliziert. Sonstige Bedingungen siehe Abb. 5.65.

Die in den μ RP-HPL- $[^{32}\text{P}]$ -Cerenkov-Chromatogrammen der tryptisch gespaltenen basalen sowie insulinstimulierten HIR- β -UE-Wildtypen enthaltenen Signale entsprechen ausschließlich denen der $[^{32}\text{P}]$ -markierten Phosphopeptide (Abb. 5.66). Mit Hilfe der Cerenkov-Chromatogramme konnten die phosphorylierten Peptide sehr empfindlich, sowie hoch spezifisch detektiert werden. Obwohl nur sehr geringe Mengen kultivierter Zellen eingesetzt wurden, konnten insbesondere vom insulinstimulierten Wildtyp intensive Signale im $[^{32}\text{P}]$ -Cerenkov-Chromatogramm ermittelt werden (Abb. 5.66). Die Signale der einzelnen Phosphopeptide zeigten eine relativ große Fußbreite an der Peakbasis. Im Vergleich zu dem basalen Wildtyp der HIR- β -UE war beim insulinstimulierten Wildtyp die Intensität der $[^{32}\text{P}]$ -Signale deutlich erhöht. Die Stimulation mit Insulin bewirkte somit eine deutlich erhöhte Stöchiometrie der Phosphorylierung. Vergleicht man die Spuren der basalen und stimulierten

Wildtypen ist deutlich zu erkennen, dass Anzahl und Elutionsabfolge der [^{32}P]-markierten Phosphopeptide identisch sind, jedoch nicht ihre Intensität (s.o.).

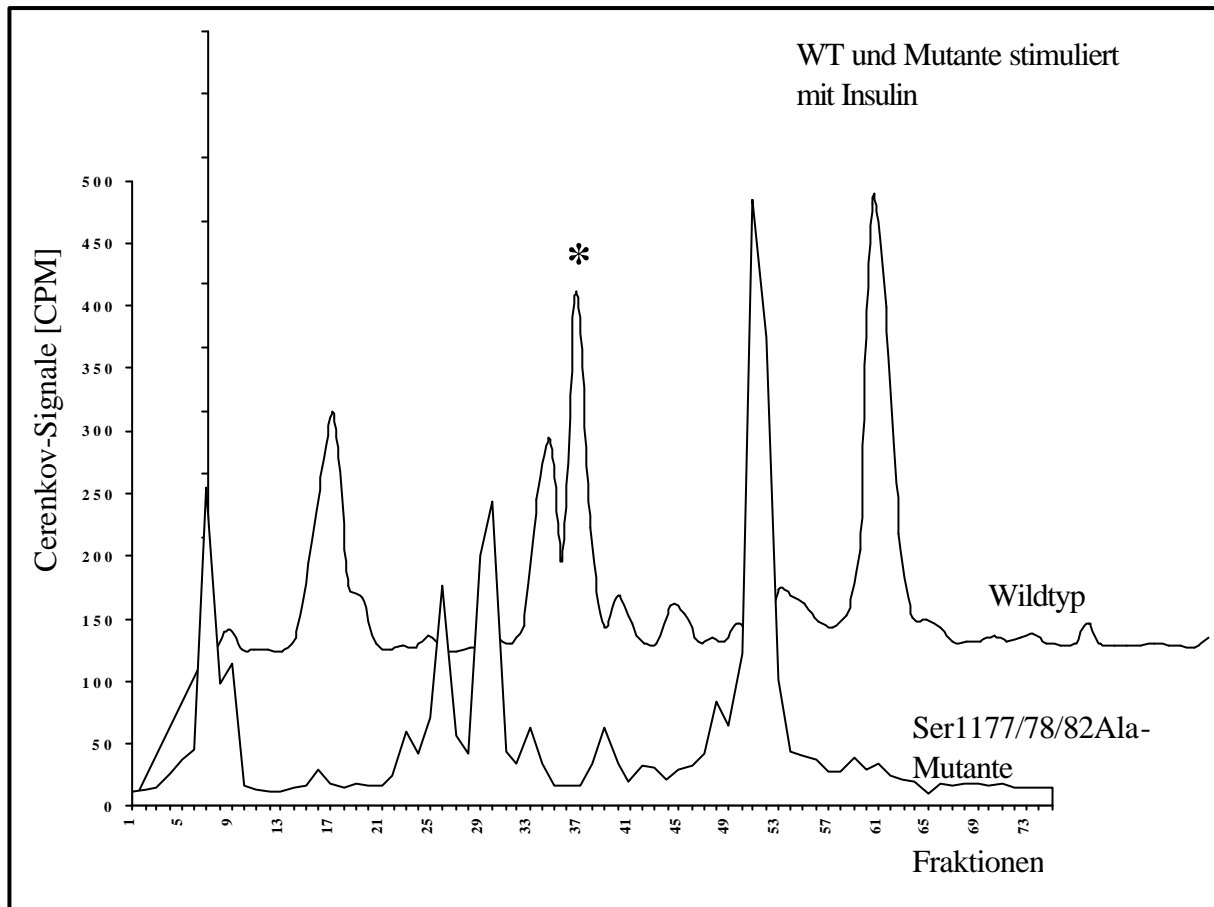


Abb. 5.67. $\mu\text{RP-HPL-}^{[32}\text{P}]\text{-Cerenkov-Chromatogramme}$ der tryptisch im Gel gespaltenen insulinstimulierten Wildtyp und dreifach-Ser1177/78/82Ala-Mutante der HIR- β -UE. Wildtyp und dreifach-Ser1177/78/82Ala-Mutante wurden durch Immunpräzipitation aus dem Lysat 'in vivo'-insulinstimulierter und [^{32}P]Orthophosphat-markierter transient-transfizierter (HIR) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch detektiert (Abb. 5.45), im Gel reduziert (DTT), alkylert (4-Vinylpyridin) und tryptisch gespalten. Die [^{32}P]-markierten Phosphopeptide wurden durch Bestimmung der Cerenkov-Strahlung der einzelnen 2 Fraktionen (2 min) detektiert. Mit einem Cerenkov-Counter wurde dazu von jeder Fraktion 3 mal für je 3 min die Cerenkov-Strahlung ermittelt (die Abbildungen zeigen jeweils die berechneten Mittelwerte). Die für die 3-fach Ser-Mutante ermittelten Werte wurden mit dem Faktor 3 multipliziert. Sonstige Bedingungen siehe Abb. 5.65. (*) Fraktion von welchem das in Abb. 5.68 abgebildete MALDI-TOF Massenspektrum ermittelt wurde.

Abbildung 5.67 zeigt die $\mu\text{RP-HPL-}^{[32}\text{P}]\text{-Cerenkov-Chromatogramme}$, welche von dem tryptisch verdauten Wildtyp und der Ser1177/78/82Ala-Mutante der insulinstimulierten [^{32}P]-markierten HIR- β -UE ermittelt wurden. In Bezug auf die relative Intensität und die Elutionsabfolge der Signale zeigen Wildtyp und dreifach Ser-Mutante identische Elutionsprofile der tryptischen [^{32}P]-markierten Phosphopeptide. Somit war die Stöchiometrie der Phosphorylierungen beim Wildtyp und der dreifach Ser-Mutante identisch.

5.9.1.3. MALDI-TOF-MS der tryptischen Phosphopeptid-Fractionen

Bei den μ RP-HPLC-Trennungen konnten aufgrund der geringen Menge eingesetzter kultivierter Zellen nur sehr schwache UV-Signale beobachtet werden (Kap. 5.9.1.2, Abb. 5.65). Dennoch konnten in den einzelnen Fraktionen mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers tryptische Peptide der HIR- β -UE detektiert werden (Abb. 5.68 und Tab. 5.10). Abb. 5.68 zeigt das positiv-Ionen-MALDI-TOF-Massenspektrum der vereinigten Fraktionen 29-32 (*), welche während der μ RP-HPLC-Trennung des tryptisch verdauten insulinstimulierten Wildtyps der HIR- β -UE gesammelt wurden. Das Massenspektrum (m/z 950-3400) zeigt die einfach-geladenen monoisotopischen $[M+H]^+$ -Peptidionensignale. Mit Hilfe des Peptidmassen-*Mapping* konnten zwei Signale den entsprechenden Peptiden aus dem Bereich der HIR-Tyrosinkinase-Domäne zugeordnet werden. Das einfach-phosphorylierte Peptid D¹¹⁴⁴IYETDYR¹¹⁵² (Reste, die phosphoryliert sein können wurden fett dargestellt) konnte anhand seines $[M+H]^+$ -Molekülions bei m/z 1317,4 identifiziert werden. Das nicht-phosphorylierte und einfach-fehlgeschnittene Peptid D¹¹⁴⁴IYETDYRK¹¹⁵³ konnte anhand seines $[M+H]^+$ -Molekülions bei m/z 1365,5 identifiziert werden. Die Intensität des phosphorylierten $[M+H]^+$ -Peptidions war im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Peptid etwa 40 % höher. Sowohl der Phosphatrest als auch der zusätzlich vorhandene Lysinrest bewirkten eine ähnliche Polaritätsänderung, sodass beide Peptide nahezu coeluierten. Da in dem vorliegenden Experiment kein PSD (Fragmentierung) durchgeführt wurde, konnte die exakte Position der Phosphorylierungsstelle nicht bestimmt werden. Bei der Auswertung der MALDI-TOF-Massenspektren konnte eine Vielzahl der ermittelten Ionen nicht den theoretisch berechneten tryptischen Peptiden der HIR- β -UE zugeordnet werden. Beim im Gel-Verdau sehr gering konzentrierter Proteine findet man in den Massenspektren häufig Signale von Verunreinigungen. Desweiteren erschweren unbekannte Proteinmodifikationen, unspezifische Spaltungen, sowie nicht nachvollziehbare Peptid-Modifikationen die Auswertung. Die mit Hilfe des Peptid-*Mappings* identifizierten Phosphopeptide wurden in Tab. 5.10 aufgelistet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von FindMod (<http://www.expasy.ch>). Es konnten weder alle in der Literatur publizierten Phosphorylierungsstellen, noch neue Phosphorylierungsstellen ermittelt werden. Die durch das *off-line*- μ RP-HPLC/MALDI-MS-Peptid-*Mapping* ermittelten Peptide deckten insgesamt 60,9 % der Sequenzabdeckung der HIR- β -UE ab, wobei auch mehrere Peptide aus überlappenden Sequenzen detektiert wurden (Abb. 5.69).

Tab. 5.10. Tabellarische Auflistung der tryptischen Phosphopeptide des insulinstimulierten Wildtyps der HIR- β -UE, welche mit Hilfe des *off-line*- μ RP-HPLC/MALDI-TOF-MS-Peptid-*Mapping* identifiziert werden konnten.

Fraktionen	Pos. b-UE ⁽¹⁾	$[M+H]^+$ _{mi} ⁽²⁾ best.	$[M+H]^+$ _{mi} ⁽³⁾ theor.	Dm ⁽⁴⁾	MC ⁽⁵⁾	Mod.	Sequenz ⁽⁶⁾
5-9	1293-1298	868,9	868,3	0,6	0	1 PO ₄ , 1 Cys-am	SSHCQR
29-32	1305-1314	1103,27	1103,48	0,2	1	1 PO ₄	DGGSSLGFKR
32-35	1144-1152	1317,4	1317,5	0,1	0	1 PO ₄	DIYETDYR
48-49	1314-1333	2550,2	2550,1	0,1	3	2 PO ₄ , 1 Met-ox	RSYEEHIPYTHMN GGKKNR

Tab. 5.10. Fortsetzung.

51-55	944-981	4330,3	4330,9	0,6	0	2 PO ₄ , Cys-am	QPDGPLGPLYASSN PEYLSASDVFPCSV YVPDEWEVSR
55-60	1305-1330	3055,0	3055,3	0,3	2	2 PO ₄	DGGSSLGFKRSYEE HIPYTHMNGGKK

(12) Numerierung nach Ullrich et al. [546]

(13) monoisotopische Molekulargewichte der einfach protonierten Peptide

(14) theoretisch berechnete Peptidmassen: MS-Digest 3.1.1, ProteinProspector 3.2.1, Bedingungen: variable Modifikationen: Phosphorylierung von S, T und Y, Oxidation von M (Met-ox), Acrylamid-modifizierte C (Cys-am); feste Modifikationen: Cystein Spyridylethylt; Trypsin als Protease mit 3 möglichen verpassten Schnittstellen; **b**-Untereinheit des humanen Insulinrezeptors als Protein

(15) **Dm**: Differenz zwischen den bestimmten und berechneten monoisotopischen Massen der einfach geladenen Peptidionen

(16) Missed Cleavage (Protease verpasst eine Schnittstelle)

(17) **S, T, Y** publizierte Phosphorylierungsstellen

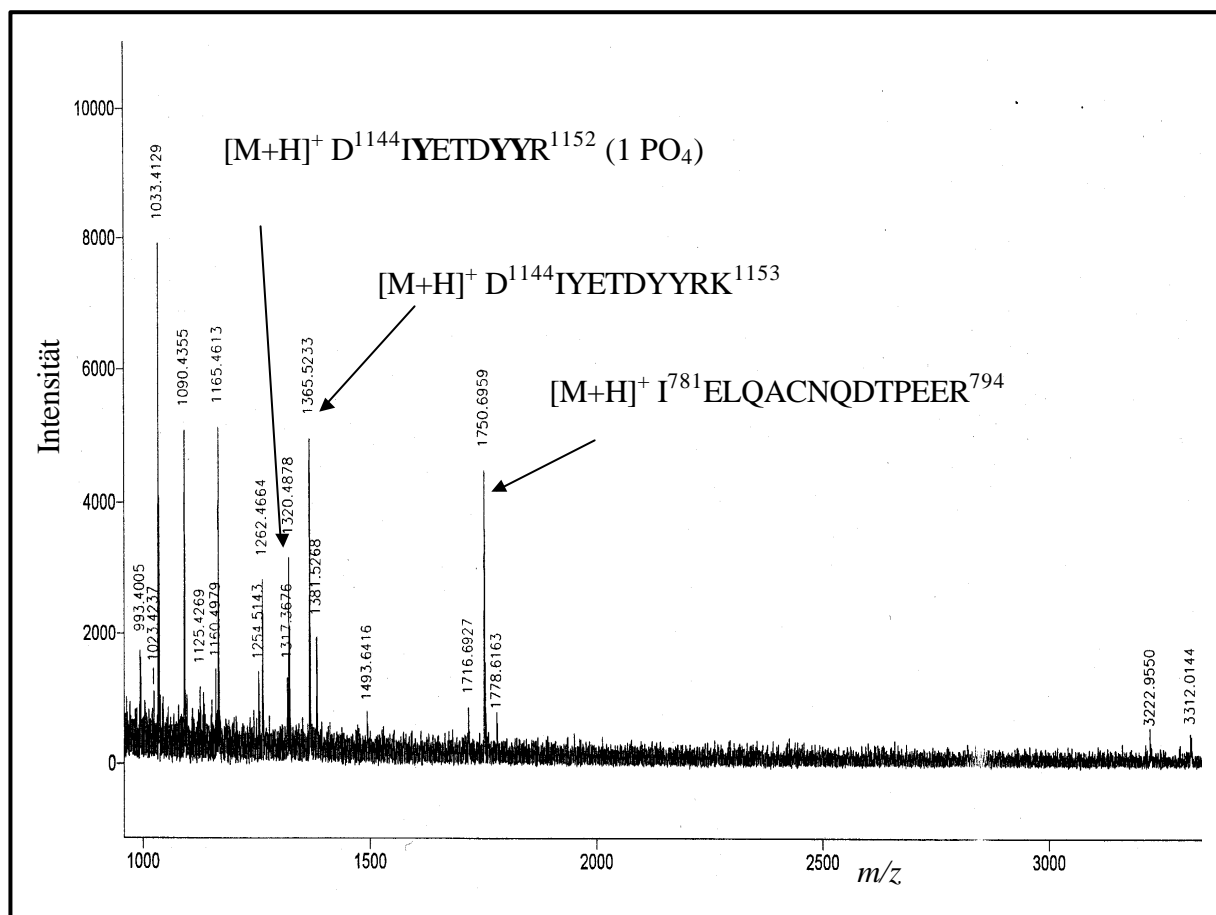


Abb. 5.68. Positiv-Ionen-MALDI-Massenspektrum (m/z 950-3400) der gepoolten Fraktionen 29-32, welche bei der μ RP-HPLC-Trennung des tryptisch verdauten insulinstimulierten HIR-**b**-UE-Wildtyps gesammelt wurden (Abb. 5.67, markiert mit *). Das Signal bei m/z 1317,4 entspricht dem $[M+H]^+$ -Molekülionen des einfach-phosphorylierten Peptids $D^{1144}IYETDYR^{1152}$ (die potentiell phosphorylierten Reste sind fett hervorgehoben). Das Signal bei m/z 1365,5 entspricht dem nicht-phosphorylierten einfach-fehlgeschnittenen Peptid $D^{1144}IYETDYRK^{1153}$. Beide Peptide stammen aus der katalytischen Tyrosinkinase-Domäne der HIR-**b**-UE. Die MALDI-Bestimmungen wurden von der Firma TOPLAB, Gesellschaft für

angewandte Biotechnologie mbH (München) mit Hilfe eines Voyager-DE STR (Perkin Elmer-Biosystems) MALDI-DE-TOF-Massenspektrometers durchgeführt.

724	734	744	754	764
SLGDVGNVTV	AVPTVAAFPN	TSSTSVPTSP	EEHRPFKVV	<u>NKESLVISGL</u>
774	784	794	804	814
<u>RHFTGYRIEL</u>	<u>QACNQDTPEE</u>	<u>RCSVAAYVSA</u>	<u>RTMPEAKADD</u>	<u>IVGPVTHEIF</u>
824	834	844	854	864
<u>ENNVVHLMWQ</u>	<u>EPKEPNGLIV</u>	<u>LYEVSRYRYG</u>	DEELHLCVSR	<u>KHFALERGCR</u>
874	884	894	904	914
LRGLSPGNYS	VRIRATSLAG	NGSWTEPTYF	YVTDYLDVPS	NIAKIIIGPL
924	934	944	954	964
IFVFLFSVVI	GSIIYFLRKR	<u>QPDGPLGPLY</u>	<u>ASSNPEYLSA</u>	<u>SDVFPCSVYV</u>
974	984	994	1004	1014
<u>PDEWEVSREK</u>	<u>ITLLRELGOQ</u>	<u>SFGMVYEGNA</u>	<u>RDI IKGEAET</u>	<u>RVAVKTVNES</u>
1024	1034	1044	1054	1064
<u>ASLRERIEFL</u>	<u>NEASVMKGFT</u>	<u>CHHVRLLGV</u>	<u>VSKGQPTLVV</u>	<u>MELMAHGDLK</u>
1074	1084	1094	1104	1114
SYLRLRPEA	ENNPGRPPPT	LQEMIQMAAE	IADGMAYLNA	<u>KKFVHRDLAA</u>
1124	1134	1144	1154	1164
<u>RNCMVAHDFT</u>	<u>VKIGDFGMTR</u>	<u>DIYETDYRK</u>	<u>GGKGLLPVRW</u>	<u>MAPESLKDGV</u>
1174	1184	1194	1204	1214
FTTSSDMWSF	GVVLWEITSL	AEOPYQGLSN	<u>EQVLKFVMDG</u>	<u>GYLDQPDNCP</u>
1224	1234	1244	1254	1264
<u>ERVTDLMRMC</u>	<u>WQFNPKMRPT</u>	<u>FLEIVNLLKD</u>	<u>DLHPSFPEVS</u>	<u>FFHSEENKAP</u>
1274	1284	1294	1304	1314
<u>ESEELEMEFE</u>	<u>DMENVPLDRS</u>	<u>SHCQREEAGG</u>	<u>RDGSSSLGFK</u>	<u>RSYEEHIPYT</u>
1324	1334			
<u>HMNGGKKNGR</u>	<u>ILTLPRSNPS</u>			

Abb. 5.69. Aminosäuresequenzabdeckung der HIR-**b**-UE (60,9 %) durch die tryptischen Peptidfragmente, welche bei dem off-line- μ RP-HPLC/MALDI-TOF-MS-Experiment ermittelt werden konnten. Die Aminosäuresequenz der HIR-**b**-UE ist im Einbuchstaben-Code mit Numerierung nach Ullrich et al. [546] abgebildet. Die ermittelten Sequenzabschnitte wurden unterstrichen.

5.9.2. 'In vivo'-NanoES-MS-Vorläuferionen-Phosphopeptid-Analyse der HIR-b-UE

Am Beispiel des β -Caseinverdaus konnte gezeigt werden, dass die NanoES-MS m/z 79-Vorläuferionen-Scantechnik ($[\text{PO}_3^-]$) für das radioaktivitätsfreie Phosphopeptid-Screening eingesetzt werden kann (Kap. 5.6). Das Screening-Verfahren sollte deshalb zur Identifizierung der Phosphopeptide eines aus 'in vivo'-kultivierten Zellen isolierten Phosphoproteins (Wildtyp der HIR- β -UE) angewendet werden. Der Insulinrezeptor wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Lysat transient transfizierter (HIR) und insulinstimulierter ($10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$; 5 min bei 37°C) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert, die β -UE mittels SDS-PAGE gereinigt und mit Lys-C enzymatisch im Gel gespalten. Die resultierenden Peptide wurden durch $\mu\text{RP-HPLC}$ aufgetrennt und fraktioniert und die Fraktionen anschließend mittels *off-line*-NanoES-MS analysiert.

5.9.2.1. SDS-PAGE, Lys-C-Verdau im Gel und $\mu\text{RP-HPLC}$ -Trennung der 'in vivo'-phosphorylierten HIR-b-UE

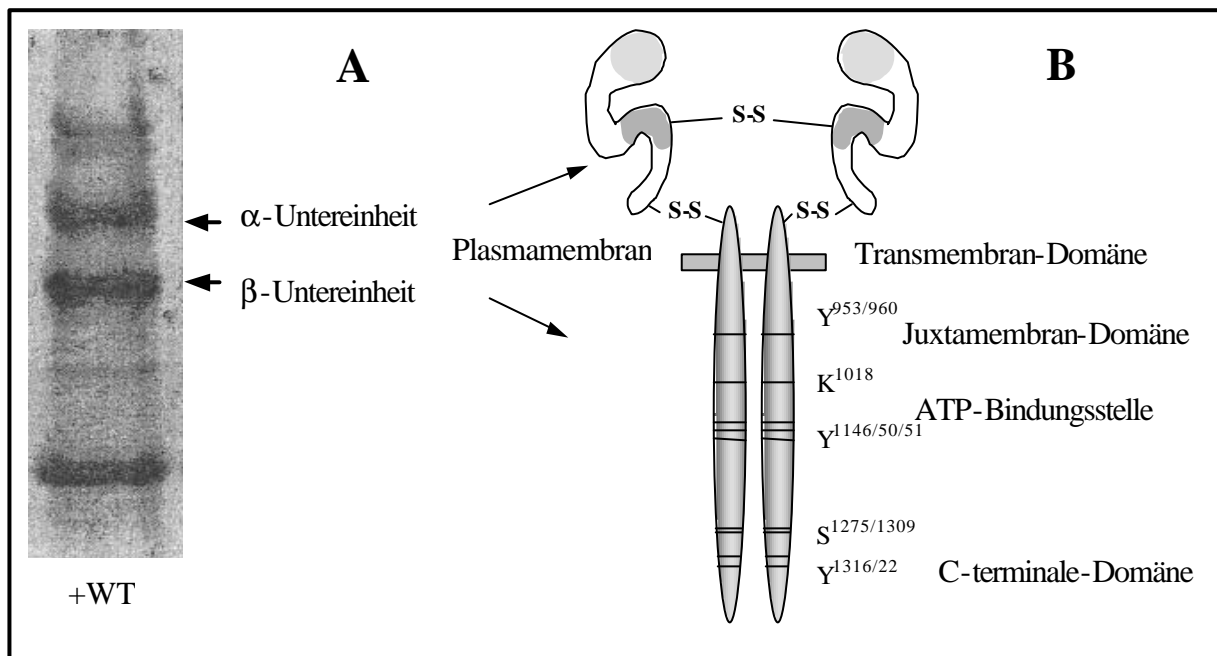


Abb. 5.70. (A) SDS-PAGE-Reinigung des Wildtyps der HIR-**b**-UE (CBB-Färbung). Der Rezeptor wurde durch Immunpräzipitation aus dem Lysat transient-transfizierter (HIR) und insulinstimulierter ($10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$; 5 min bei 37°C) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert. +WT: Wildtyp mit Insulin stimuliert. (B) Schematische Darstellung des Aufbaus des HIR-WT.

Der Wildtyp des humanen Insulinrezeptors (HIR) konnte durch Immunpräzipitation aus dem Lysat der transient-transfizierten (HIR) und insulinstimulierten ($10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$; 5 min bei 37°C) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert werden. Die beiden, durch Disulfidbrücken verbundenen, α - und β -Untereinheiten des Insulinrezeptors konnten durch SDS-PAGE getrennt werden (Abb. 5.70.A). Die β -UE zeigt im Vergleich zur α -UE eine höhere elektrophoretische Mobilität. Eine Auftrennung unterschiedlicher Isoformen der β -UE, welche infolge postribosomaler Modifikationen auftreten können, konnte nicht beobachtet werden.

Abbildung 5.71 zeigt das UV-Chromatogramm (bei 214 nm), welches bei der μ RP-HPLC-Trennung der enzymatisch im Gel mit Lys-C gespaltenen β -UE erhalten wurde. Die eluierten Peptide wurden als Fraktionen von jeweils 5 min gesammelt und direkt der NanoES-MS-Bestimmung zugeführt. Im Vergleich zur tryptischen Spaltung der HIR- β -UE (Abb. 5.4) resultierten bei der Lys-C-Spaltung deutlich weniger Signale im UV-Chromatogramm. Entsprechend dem *'in silico'*-Verdau bildeten sich bei der Lys-C-Spaltung somit deutlich weniger Peptidfragmente. Zwar ermöglichte der relativ lange LC-Gradient eine gute Auftrennung der Peptide, wie sich jedoch bei den NanoES-MS-Analysen zeigte, enthielten die einzelnen Fraktionen in der Regel mehrere unterschiedliche Peptide.

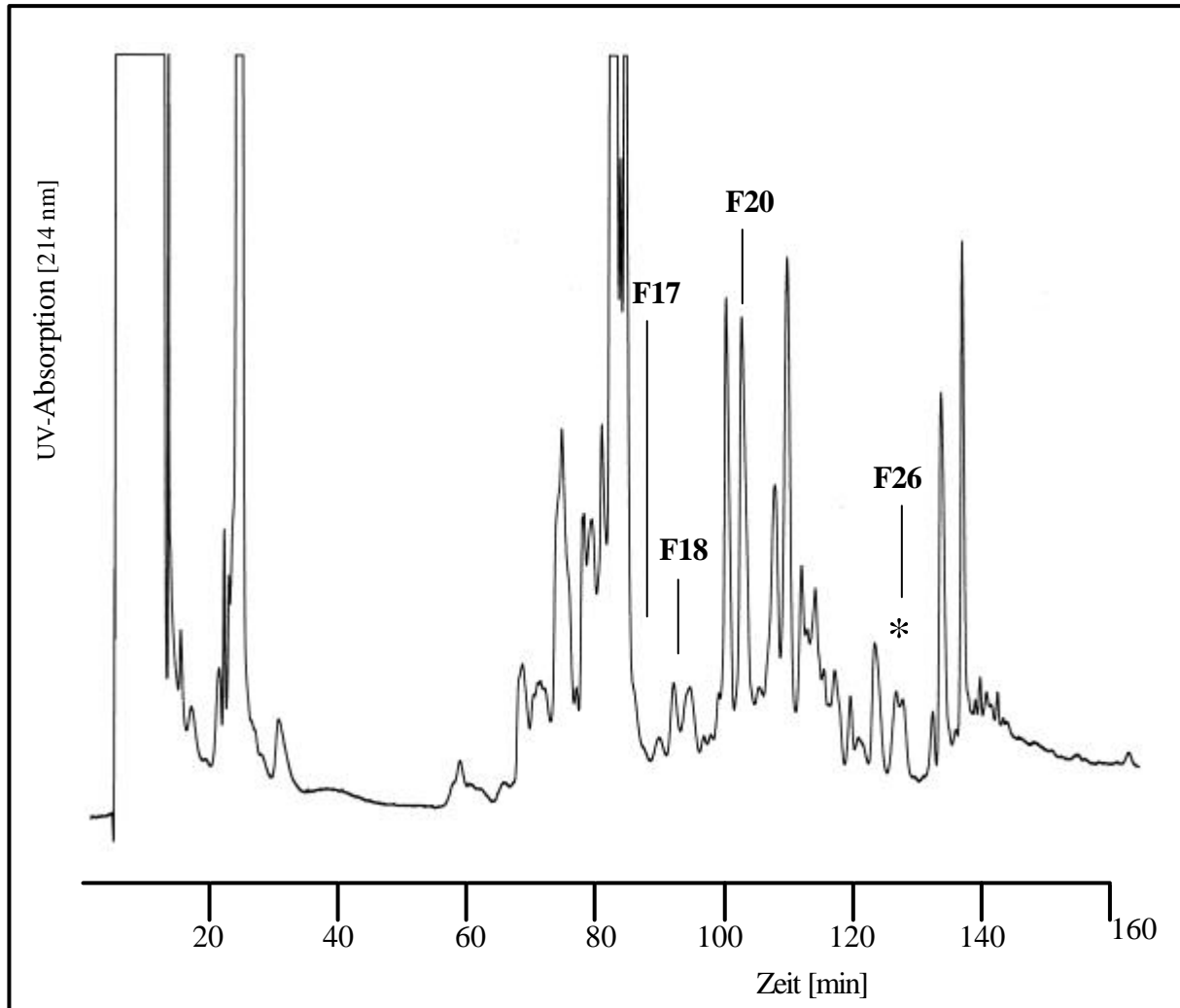


Abb. 5.71. μ RP-HPLC-Trennung der Peptide, welche bei der im Gel-Lys-C-Spaltung der HIR-**b**-UE (Abb. 5.70.A) erhalten wurden. Die **b**-UE wurde durch Immunpräzipitation aus dem Lysat transient-transfizierter (HIR) und insulinstimulierter ($10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$; 5 min bei 37°C) HEK-293-Fibroblastenzellen isoliert und durch SDS-PAGE gereinigt. Die CBB-gefärbte Proteinbande wurde im Gel reduziert (DTT), alkyliert (4-Vinylpyridin) und mit Lys-C enzymatisch gespalten. Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μm (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); 5 $\mu\text{l min}^{-1}$ Flussrate; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in H_2O (v/v); Puffer B: 80 % ACN, 0,075 % TFA in H_2O (v/v); Gradient: 40 min 5 % B, 130 min 45 % B, 160 min 95 % B, 170 min 95 % B; Injektion: getrocknete Peptide gelöst in 25 μl Puffer A; UV-Detektion: $\lambda = 214 \text{ nm}$ (Bubble-Zelle, ca. 150 μm I.D.). *: Fraktion, welche für die NanoES-MS/MS-Identifizierung verwendet wurde (Abb. 5.72).

5.9.2.2. Identifizierung der untersuchten Proteinbande durch off-line-NanoES-MS/MS

Die isolierte Proteinbande wurde mit Hilfe eines *off-line*-NanoES-MS/MS-Experimentes identifiziert (Abb. 5.72). Von Fraktion 26 ($R_t = 130-135$ min) der μ RP-HPLC-getrennten Lys-C-gespaltenen HIR- β -UE (Abb. 5.71) wurde zunächst ein positiv-Ionen-Übersichtsspektrum aufgenommen (Abb. 5.72.A). Das $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekilion bei m/z 788,9 wurde dann in Q1 isoliert und in der Kollisionszelle (q2-CID) fragmentiert (Abb. 5.72.B). Das Rohdaten-File des ermittelten Fragmentation-Spektrums (.dat) wurde zu einem ASCII-File konvertiert (.dta) und mittels MS/MS Ion Search über das Internet auf dem Mascot-Server ausgewertet.

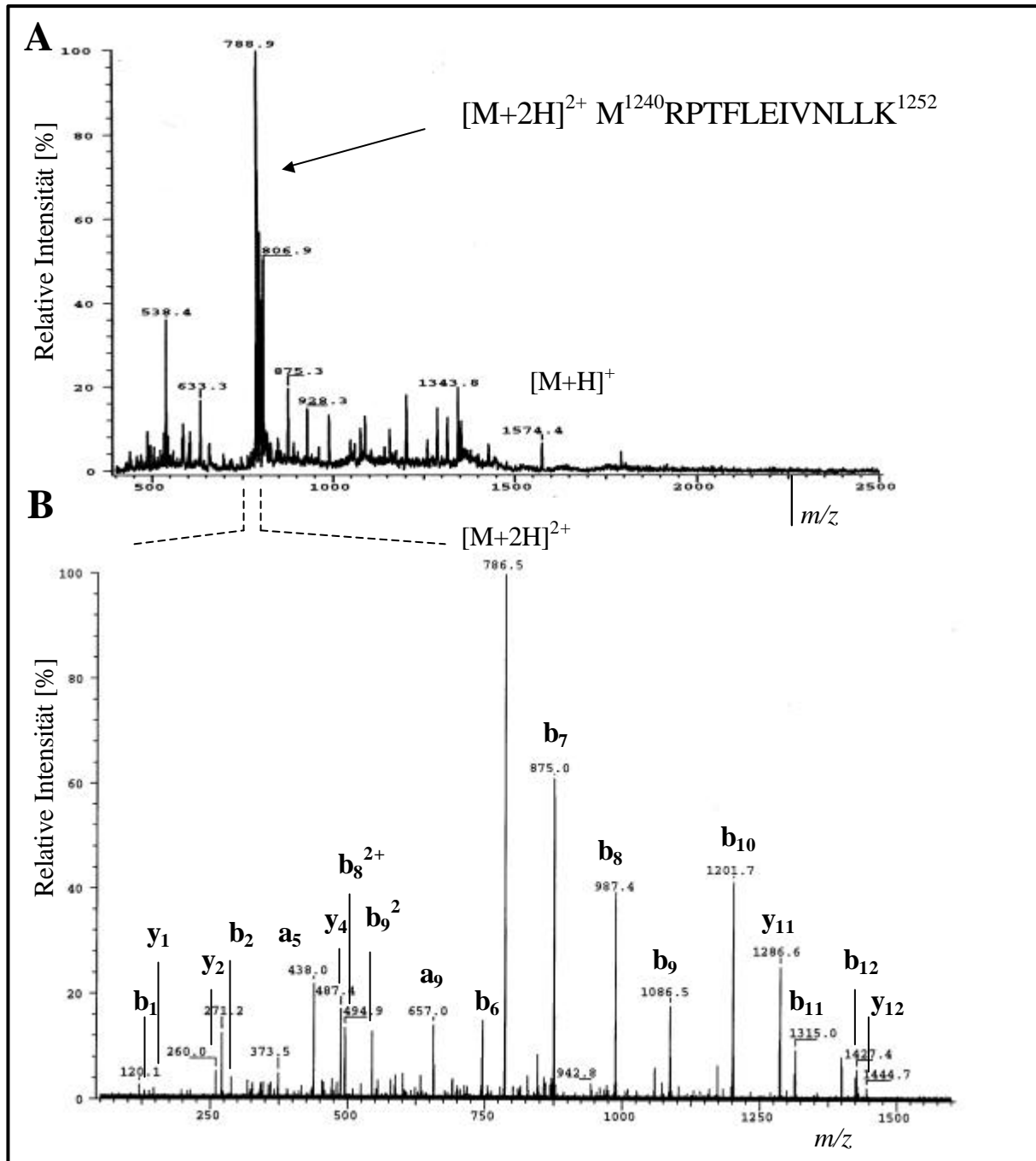


Abb. 5.72. Positiv-Ionen-NanoES-MS-Experimente (TSQ 700) zur Identifizierung der im Gel mit Lys-C-gespaltenen Proteinbande (Abb. 5.70.A). (A) Positiv-Ionen-NanoES-

Massenspektrum von Fraktion 26, welche bei der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-gespaltene Proteinbande zwischen 130-135 min gesammelt wurde (Abb. 5.71). (B) Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS-Spektrum des zweifach-positiv-geladenen $[M+2H]^{2+}$ -Quasimoleküls bei m/z 787,1. Beide Ionenserien wurden gleichzeitig erhalten. Die b- und y-Typ-Ionenserien repräsentieren die Sequenz ausgehend vom N bzw. C-Terminus (Kap. 2.4.4). Bedingungen: Speed-Vac-getrocknete Fraktion, gelöst in 2 μ l wässriger 50 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure (v/v); -800 V NanoES-Spannung; (A) Q3-Scan im Bereich von 400-2500 m/z in 4 sec; 24 Scans; (B) $[M+2H]^{2+}$ bei 787,1 m/z selektiert in Q1; MS/MS in q2: -35 V CID-Offset; 3 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3-Scan im Bereich von 50-1600 m/z in 3 sec; 21 Scans.

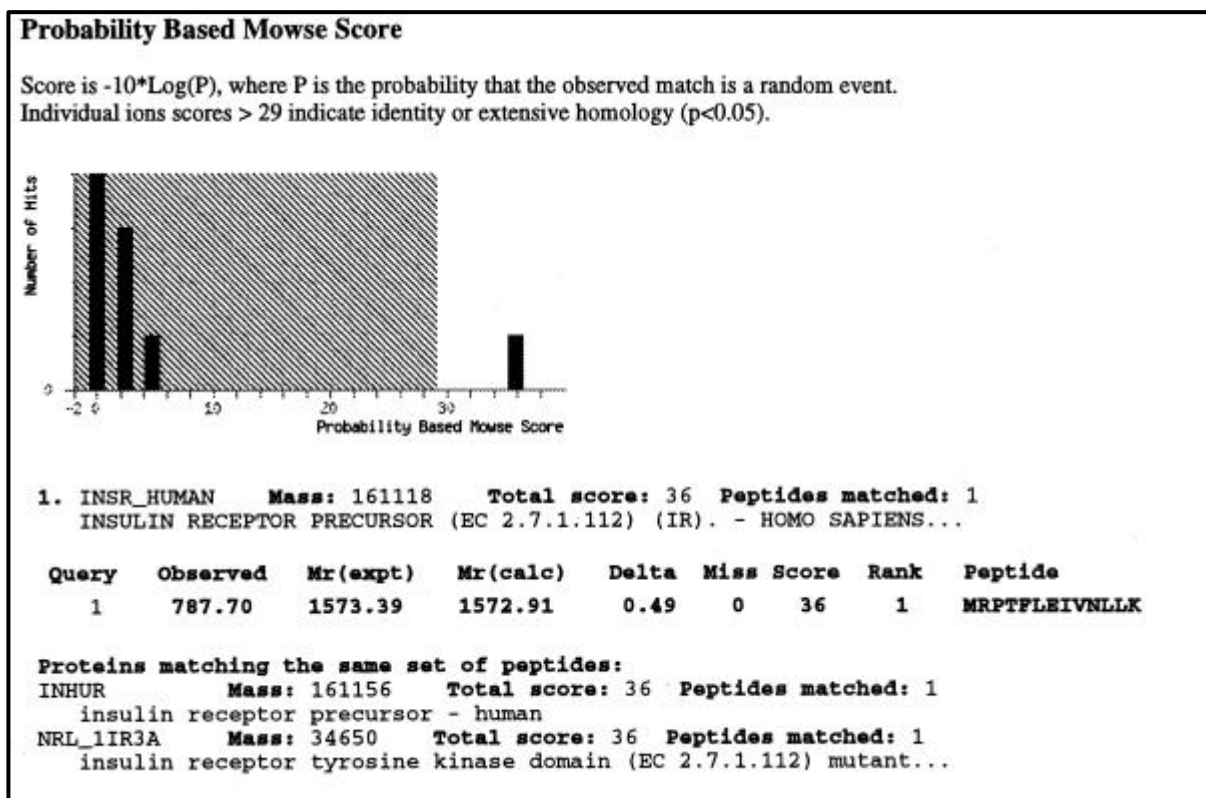


Abb. 5.73. Mascot-Identifizierung der Lys-C-verdauten Proteinbande mittels positiv-Ionen-NanoES-MS/MS (TSQ 700) des $[M+2H]^{2+}$ -Quasimoleküls bei m/z 787,1 in Fraktion 26 ($R_t = 130-135$ min) (Abb. 5.72.B). Der obere Teil der Abbildung gibt die ermittelten Scores der einzelnen Kandidaten graphisch wieder. Für den ersten Kandidaten (INSR_HUMAN: INSULIN RECEPTOR PRECURSOR (EC 2.7.1.112) (IR).-HOMO SAPIENS) wurde ein signifikanter Score von 36 ermittelt. Im unteren Teil der Abbildung ist die Identität des ersten Kandidaten sowie die Sequenz des analysierten Peptids (M^{1240} RPTFLEIVNLLK 1252) abgebildet. Das Rohdaten-File (.dat) wurde zu einem ASCII-File (.dta) konvertiert und auf dem Mascot-Server (<http://www.matrixscience.com/MS/MS> Ion Search) ausgewertet. Bedingungen: MS/MS Ion Search; Lys-C als Enzym; feste Modifikation: Cysteine S-pyridylethylert; monoisotopische Massen; unbegrenzte Proteinmasse; $\pm 0,5$ Da Peptidmassentoleranz; $\pm 0,5$ Da Fragmentionentoleranz; maximal 3 verpasste Schnittstellen; Daten-File: ab18_2_10.0004.0010.2.dta; Datenbank: OWL 31.4; Gattung: homo sapiens (26988 Proteinsequenzen).

Mit Hilfe des Tandem-MS/MS-Experimentes ($[M+2H]^{2+}$, m/z 788,9, Abb. 5.72.B) konnte die Proteinbande eindeutig als humaner Insulinrezeptor (EC 2.7.1.112) identifiziert werden (Abb. 5.73). Bei der Mascot-Auswertung wurde der humane Insulinrezeptor als wahrscheinlichster Kandidat mit einem signifikanten *Score* von 36 ($p < 0,05$) ermittelt. Bei dem fragmentierten zweifach geladenen $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion handelte es sich um das Peptid $M^{1240}RPTFLEIVNLLK^{1252}$. Die MS/MS Ion Search Analyse ergab, dass bei dem CID-Experiment nahezu die komplette Serie der einfach-geladenen b-Typ-Fragmentionen erhalten wurde (Abb. 5.72.B).

5.9.2.3. Off-line-NanoES-MS-Phosphopeptid-Screening

Die Detektion von *'in vivo'*-Phosphorylierungsstellen stellt im Bereich der Biologischen Massenspektrometrie auch heute noch eines der schwierigsten analytischen Probleme dar (Kap. 2.5). Neben der extrem hohen Empfindlichkeit und dem äußerst geringen Probenverbrauch hat die NanoES-MS den Vorteil, dass mit dieser Technik auch nicht-aufgetrennte Peptidmischungen analysiert werden können (Kap. 2.1.6). Triple-Quadrupol-Massenspektrometer eignen sich aufgrund der Durchführung von negativ-Ionen-NanoES-MS- m/z 79-Vorläuferionen-Experimente ($[PO_3]^-$) besonders gut zum *Screening* nach Phosphopeptiden in komplexen Peptidmischungen (Kap. 2.2.5). Bei den folgenden Experimenten wurden die einzelnen LC-Fractionen (Abb. 5.71) mit Hilfe unterschiedlicher NanoES-MS-Scantechniken unter verschiedenen pH- und Ionisierungsbedingungen untersucht. Von allen Fractionen wurden sowohl positiv- als auch negativ-Ionen-NanoES-MS-Übersichtsspektren aufgenommen. Die positiv-Ionen-Bestimmungen erfolgten unter sauren, die negativ-Ionen-Bestimmungen unter alkalischen pH-Bedingungen. Die NanoES-MS-Vorläuferionen-Experimente auf m/z 79 erfolgten stets unter alkalischen Bedingungen. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurden die Volumina der Spraylösungen sehr knapp bemessen. Wie die NanoES-MS-Analysen zeigten, handelte es sich bei den einzelnen Fractionen, trotz der zuvor durchgeführten μ RP-HPLC-Trennung des Proteinverdaus um komplex zusammengesetzte Peptidmischungen. Bei den positiv- bzw. negativ-Ionen-NanoES-MS-Experimenten lagen die Peptide als unterschiedlich geladene Molekülionen vor; in der Regel dominierten jedoch ein- bzw. zweifach-geladene $[M\pm H]^\pm$ - bzw. $[M\pm 2H]^{2\pm}$ -Peptidionen (Abb. 5.74). Beim Wechsel der Ionisierungspolarität bzw. des pH-Wertes der Spraylösung war in den meisten Fällen eine starke Änderung der relativen Intensitäten der einzelnen Ionensignale in den ermittelten Massenspektren zu beobachten. Abbildung 5.73.A und 5.73.B zeigen die positiv- und negativ-Ionen-ESI-Massenspektren von Fraction 17, welche zwischen 85 und 90 min während der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-gespaltenen HIR- β -UE-Proteinbande gesammelt wurden (Abb. 5.71). Im positiven Ionenmodus ionisiert das Peptid $I^{1335}LTPR^{1339}$ als einfach-geladenes $[M+H]^+$ -Molekülion bei m/z 712,4; im negativen Ionenmodus als $[M-H]^-$ -Molekülion bei m/z 709,9. Sowohl im positiv- als auch im negativ-Ionen-NanoES-Massenspektrum dominierte somit jeweils das einfach-geladene Molekülion. Beim Polaritätswechsel kam es zu einer deutlichen Änderung der relativen Intensitäten der übrigen Peptidionensignale. Im negativen Ionenmodus nahmen die Intensitäten nahezu aller Peptidionensignale relativ zum Signal des $[M-H]^-$ -Molekülions (m/z 709,9) stark ab (Abb. 5.74.B). Lediglich die Signale bei m/z 1129,8 und m/z 1367,8 erhöhten sich in Relation zum einfach-geladenen $I^{1335}LTPR^{1339}$ -Molekülionen-Signal. Bei der Auswertung der positiv- und negativ-Ionen-NanoES-MS-Übersichtsspektren von Fraction 17 (R_t 85-90 min) konnte das Peptid $R^{1314}SYEEHIPYTHMNGGK^{1329}$ detektiert werden, das drei potentielle, in der Literatur beschriebene, Phosphorylierungsstellen enthält. Das Peptid konnte anhand seines $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülions bei m/z 960,0 (Abb. 5.74.A) bzw. seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions bei m/z 958,9 (Abb. 5.74.A) identifiziert werden. Von den ermittelten

Peptidionensignale konnte keines einem phosphorylierten Peptid zugeordnet werden. Mit Hilfe der negativ-Ionen-NanoES-MS-Vorläuferionen-Scantechnik auf $[\text{PO}_3]^-$ (m/z 79) konnten die in Fraktion 17 enthaltenen Phosphopeptide aber detektiert werden (Abb. 5.74.C).

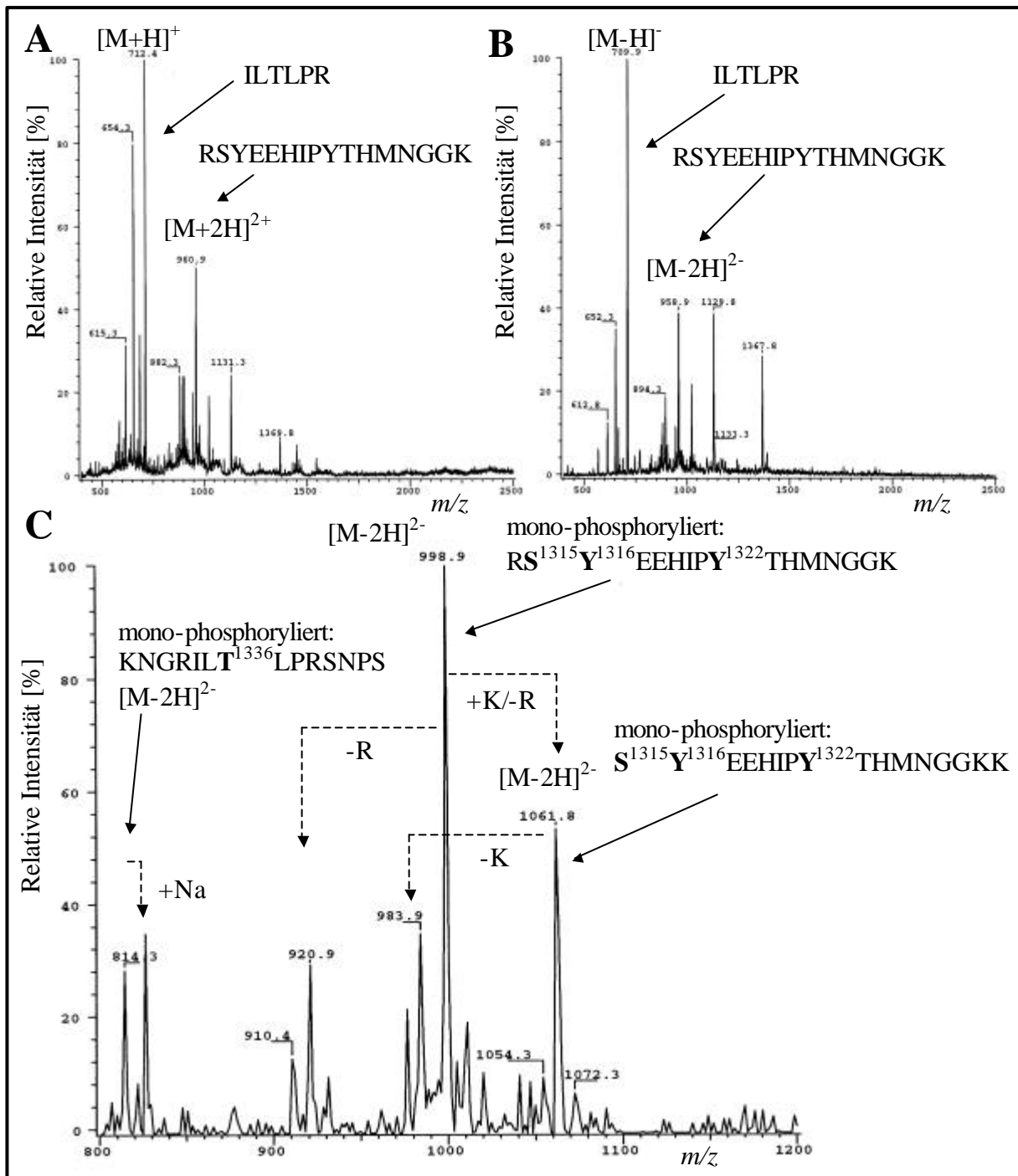


Abb. 5.74. NanoES-MS-Analyse (TSQ 700) von Fraktion 17 (R_t 85-90 min während der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-verdauten HIR-**b**-UE, Abb. 5.71). (A) Positiv-Ionen-NanoES-MS-Analyse (Fraktion 17 gelöst in 2 μ l wässriger 50 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure (v/v)). Bedingungen: -800 V NanoES-Spannung; Q3-Scan im Bereich von 400-2500 m/z in 4 sec; 10 Scans. (B) Negativ-Ionen-NanoES-MS-Analyse (Fraktion 17 gelöst in 1 μ l wässriger 50 % MeOH, 5 % NH_3 (v/v)). Bedingungen: +700 V NanoES-Spannung; Q3-Scan im Bereich von 400-2500 m/z in 4 sec; 7 Scans. (C) Negativ-Ionen-NanoES-MS-Vorläuferionen-Analyse

(Fraktion 17 gelöst in 1 μ l wässriger 50 % MeOH, 5 % NH₃ (v/v)). Zur Detektion phosphorylierter Peptide wurde nach m/z 79 Vorläufer-Ionen gescannt. Bedingungen: +700 V NanoES-Spannung; Q1-Scan im Bereich von 800-1200 m/z in 4 sec; MS/MS in q_2 : +64 VKollisions-Offset; 3 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3 SIM auf m/z 79; 41 Scans. Die detektierten Phosphopeptide sind ebenfalls abgebildet. In der Literatur beschriebene potentiellen Phosphorylierungsstellen mit entsprechenden Positionen im HIR sind fett dargestellt. Na: Natrium-Addukt; K: Lysin; R: Arginin.

Abbildung 5.74.C zeigt die negativ-Ionen-NanoES-MS m/z 79-Vorläuferionen-Analyse von Fraktion 17, welche während der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-verdauten HIR- β -UE zwischen 85 und 90 min gesammelt wurde (Abb. 5.71). Das mono-phosphorylierte Peptid KNGRILT¹³³⁶LPRSNPS konnte anhand seines [M-2H]²⁻-Quasimolekülions bei m/z 814,3 sowie dem zugehörigen [M+Na-3H]²⁻-Natrium-Adduktion bei m/z 825,3 identifiziert werden. Das Peptid stammt aus dem C-terminalen Bereich innerhalb der HIR- β -UE. Entsprechend den in der Literatur beschriebenen Phosphorylierungen des Insulinrezeptors handelt es sich bei phosphorylierten Aminosäure um Threoninrest 1336. Desweiteren konnte das mono-phosphorylierte Peptid RS¹³¹⁵Y¹³¹⁶EEHIPY¹³²²THMNGGK anhand seines zweifach-negativ-geladenen [M-2H]²⁻-Quasimolekülions bei m/z 998,9, sowie das entsprechende nicht-fehlgeschnittene mono-phosphorylierte Peptid S¹³¹⁵Y¹³¹⁶EEHIPY¹³²²THMNGGK anhand seines [M-2H]²⁻-Quasimolekülions bei m/z 1061,8 identifiziert werden. Beide Phosphopeptide stammen ebenfalls aus dem C-terminalen Bereich der HIR- β -UE. Die Peptide enthalten jeweils drei Aminosäurereste, welche potentiell phosphoryliert sein können (Ser1315, Tyr1316 sowie Tyr1322). Die entsprechenden [M+2H]²⁺-Quasimolekülionen konnten im positiven Ionisierungsmodus nicht detektiert werden, die MS/MS-Sequenzierung dieser Phosphopeptide war somit nicht durchführbar. Die exakte Position der Phosphorylierungsstelle(n) liegt deshalb nicht vor. Anhand der großen Anzahl von im Vorläuferionen-Massenspektrum ermittelten Ionensignalen ist deutlich zu erkennen, dass bei der Lys-C-Spaltung der β -UE im Gel, viele Phosphopeptide mit statistisch verteilten Proteaseschnittstellen resultierten (siehe K- und R-Reste). Somit unterscheiden sich die Peptide nur in ihren N- bzw. C-terminalen Aminosäureresten (Abb. 5.74.C). Abbildung 5.75 zeigt die NanoES-Massenspektren, die bei der Analyse von Fraktion 18, welche während der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-verdauten HIR- β -UE zwischen 90 und 95 min gesammelt wurde (Abb. 5.71), aufgenommen wurden. Mit Hilfe der negativ-Ionen-NanoES-MS m/z 79-Vorläuferionen-Analyse konnte das zweifach-phosphorylierte Peptid IGDFGMTRDIY¹¹⁴⁶ETDY¹¹⁵⁰Y¹¹⁵¹RK anhand seines [M-2H]²⁻-Quasimolekülions bei m/z 1201,4 sowie das entsprechende einfach-phosphorylierte und Methionin-oxidierte Peptid IGDFGM(ox)TRDIY¹¹⁴⁶ETDY¹¹⁵⁰Y¹¹⁵¹RK anhand seines [M-2H]²⁻-Quasimolekülions bei m/z 1167,8 detektiert werden (Abb. 5.75.C). Das entsprechende nicht-Methionin-oxidierte mono-phosphorylierte Peptid IGDFGMTRDIY¹¹⁴⁶ETDY¹¹⁵⁰Y¹¹⁵¹RK konnte mit Hilfe der m/z 79-Vorläuferionen-Analyse in Fraktion 20 detektiert werden (Abb. 5.76.B). Durch das zusätzlich vorhandene Sauerstoffatom erhöhte sich im Vergleich zum nicht-oxidierten Peptid das Molekulargewicht um 16 Da. Die [M-2H]²⁻-Quasimolekülionen der oxidierten und nicht-oxidierten Peptide unterscheiden sich somit um 8 Th (Vgl. Abb. 5.75.C und Abb. 5.76.B). Mit Hilfe eines positiv-Ionen-NanoES-Experimentes konnte in Fraktion 18 zusätzlich das zweifach-phosphorylierte Peptid IGDFGMTRDIY¹¹⁴⁶ETDY¹¹⁵⁰Y¹¹⁵¹RK anhand seines [M+H]⁺-Molekülions bei m/z 2402,3 detektiert werden (Abb. 5.75.A). Aufgrund der geringen Intensität des Molekülions konnte das Peptid aber nicht sequenziert werden. Die in Fraktion 18 bzw. 20 detektierten phosphorylierten Peptide stammen alle aus der Tyrosinkinase-Domäne innerhalb der HIR- β -UE. Entsprechend der Literatur können die Tyrosinreste Y1146/1150/1151 phosphoryliert sein. Abbildung 5.76 zeigt die NanoES-Massenspektren, die

bei der Untersuchung von Fraktion 20, welche während der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-verdauten HIR- β -UE zwischen 100 und 105 min gesammelt wurde (Abb. 5.71), aufgenommen wurden. Das einfach-phosphorylierte Peptid IGDFGMTRDIY¹¹⁴⁶ETDY¹¹⁵⁰Y¹¹⁵¹RK konnte sowohl im m/z 79-Vorläuferionen-Spektrum anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimolekülions bei m/z 1096,8 als auch im positiv-Ionen-NanoES-Spektrum ($[M+2H]^{2+}$ -Molekülion bei m/z 1099,4) identifiziert werden (Abb. 5.76.B bzw. 5.76.A). Das entsprechende nicht-phosphorylierte Peptid konnte im positiv-Ionen-NanoES-Massenspektrum anhand seines $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülions bei m/z 1123,3 detektiert werden (Abb. 5.76.A). Das $[M+2H]^{2+}$ -Ion wurde zusätzlich in einem positiv-Ionen-Tandem-MS/MS-Experiment sequenziert (Abb. 5.76.C). Die SEQUEST-Auswertung ergab, dass es sich bei dem sequenzierten Ion um das Peptid IGDFGMTRDIY¹¹⁴⁶ETDY¹¹⁵⁰Y¹¹⁵¹RK handelt (Abb. 5.77).

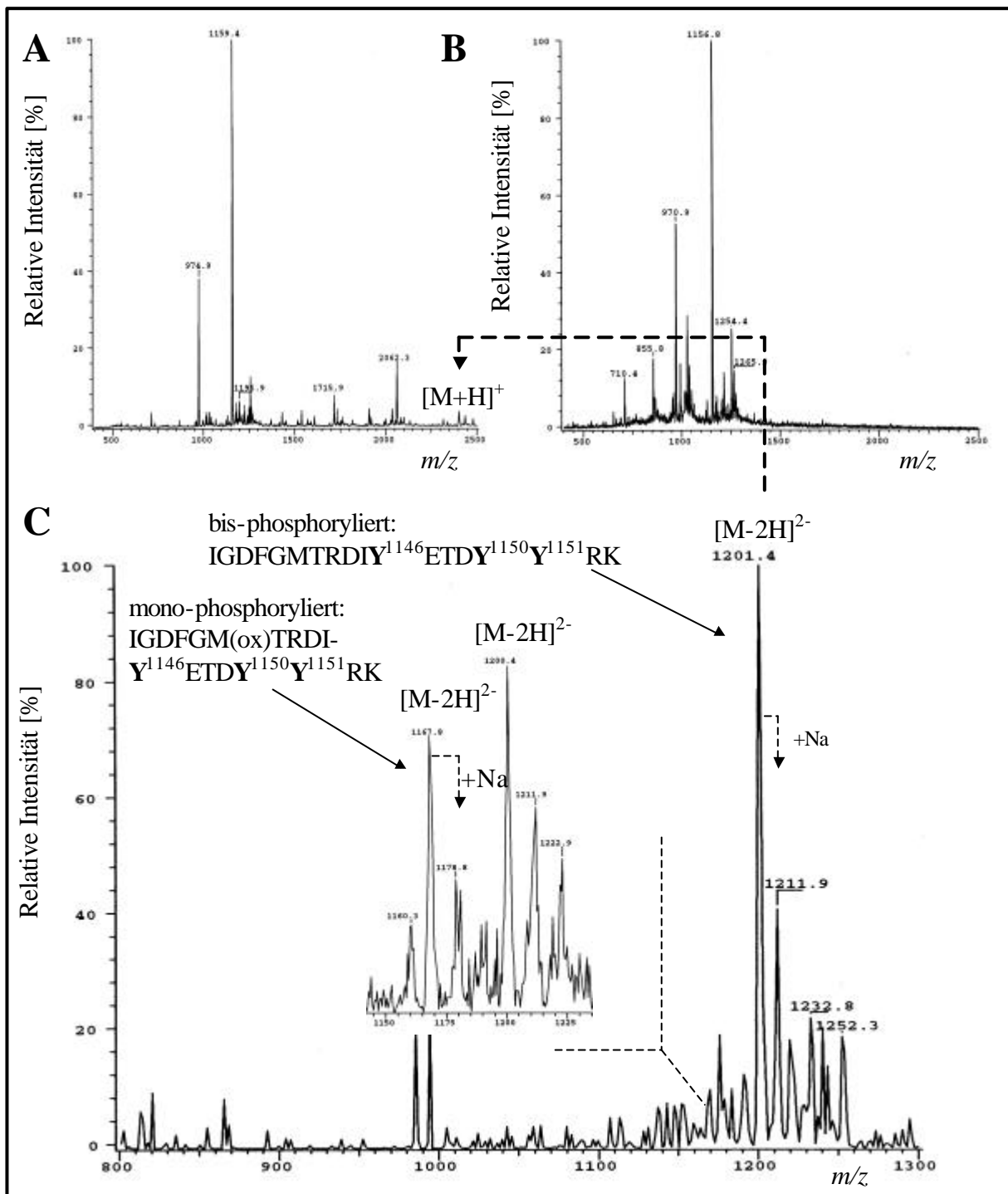


Abb. 5.75. (vorherige Seite) NanoES-MS-Analyse (TSQ 700) von Fraktion 18 (R_t 90-95 min während der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-verdauten HIR-**b**-UE, Abb. 5.71). (A) Positiv-Ionen-NanoES-MS-Analyse (Fraktion 18 gelöst in 2 μ l wässriger 50 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure (v/v)). Bedingungen: -800 V NanoES-Spannung; Q3-Scan im Bereich von m/z 400-2500 in 4 sec; 11 Scans. (B) Negativ-Ionen-NanoES-MS-Analyse (Fraktion 18 gelöst in 1 μ l wässriger 50 % MeOH, 5 % NH_3 (v/v)). Bedingungen: -700 V NanoES-Spannung; Q3-Scan im Bereich von 400-2500 m/z in 4 sec; 9 Scans. (C) Negativ-Ionen-NanoES-MS m/z 79-Vorläuferionen-Analyse (Fraktion 18 gelöst in 1 μ l wässriger 50 % MeOH, 5 % NH_3 (v/v)). Bedingungen: -700 V NanoES-Spannung; Q1-Scan im Bereich von 800-1300 m/z (Zoom-Scan 1100-1300 m/z) in 4 sec; MS/MS in q2: +64 V Kollisions-Offset; 3 mTorr Stossgasdruck (Argon), Q3 SIM m/z 79; 41 Scans (Zoom-Scan 203 Scans). Die detektierten Phosphopeptide sind ebenfalls abgebildet. In der Literatur beschriebene potentiellen Phosphorylierungsstellen mit entsprechenden Positionen im HIR sind fett dargestellt. Na: Natrium-Addukt.

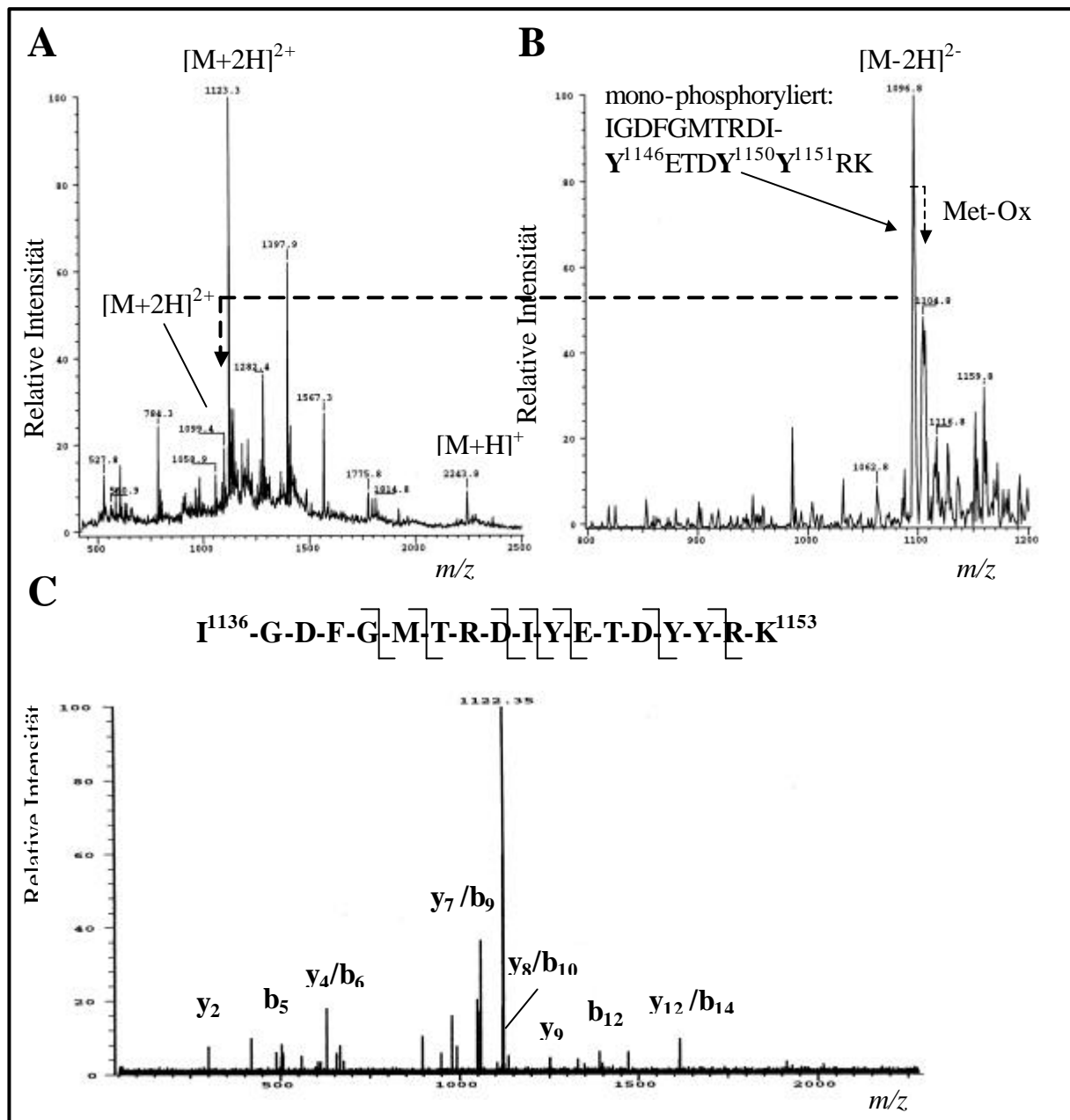


Abb. 5.76 (vorherige Seite) *NanoES-MS-Analyse (TSQ 700) von Fraktion 20 (R_t 100-105 min während der μ RP-HPLC-Trennung der Lys-C-verdauten HIR-**b**-UE, Abb. 5.71). (A) Positiv-Ionen-NanoES-MS-Analyse (Fraktion 20 gelöst in 2 μ l wässriger 50 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure (v/v)). Bedingungen: -800 V NanoES-Spannung; Q3-Scan im Bereich von 400-2500 m/z in 4 sec; 18 Scans. (B) Negativ-Ionen-NanoES-MS m/z 79-Vorläuferionen-Analyse (Fraktion 20 gelöst in 1 μ l wässriger 50 % MeOH, 5 % NH₃ (v/v)). Bedingungen: +700 V NanoES-Spannung; Q1-Scan im Bereich von 800-1200 m/z in 4 sec; MS/MS in q2: +64 V Kollisions-Offset; 3 mTorr Stossgasdruck (Argon), Q3 SIM m/z 79; 52 Scans. Die detektierten Phosphopeptide sind ebenfalls abgebildet. In der Literatur beschriebene potentiellen Phosphorylierungsstellen mit entsprechenden Positionen im HIR sind fett dargestellt. Met-Ox: Methionin oxidiert. (C) Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS-Analyse des [M+2H]²⁺-Quasimolekülon bei m/z 1123,3 (¹³⁶GDFGMTRDIYET-DYYRK¹¹⁵³) einschließlich Zuordnung der bei der SEQUEST-Analyse identifizierten b- und y-Typ-Fragmentionen. Bedingungen: -800 V NanoES-Spannung; [M+2H]²⁺ bei m/z 1123,3 isoliert in Q1; MS/MS in q2: - 44 V (88 eV) Kollisions-Offset; 3 mTorr Stossgasdruck (Argon); Q3-Scan im Bereich von 50-2300 m/z in 4 sec; 93 Scans.*

#	Rank/Sp	(M+H) ⁺	Cn	deltCn	C*10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1 / 1	2243.0	1.0000	0.0000	1.1337	49.8	8/34	owl P06213 INSR	(K)IGDFGMTR DIYETDYYRK
2.	2 / 2	2244.9	0.7384	0.2616	0.8371	47.4	7/36	owl P06213 INSR	(D)GSSSLGFK RS*YEEHIPYTH

1. owl|P06213|INSR_HUMAN insulin receptor beta-chain (620 AAs) - human

Abb. 5.77. *SEQUEST-Resultat der positiv-Ionen-NanoES-MS/MS-Untersuchung des [M+2H]²⁺-Quasimolekülon (m/z 1123,3), welches in Fraktion 20 detektiert werden konnte (Abb. 5.76). Bei dem sequenzierten Quasimolekülon (m/z 1123,3) handelt es sich um das nicht-phosphorylierte Peptid ¹³⁶GDFGMTRDIYETDYYRK¹¹⁵³ aus der Tyrosinkinasedomäne der HIR-**b**-UE. Bedingungen: kein Enzym; monoisotopische Massen; \pm 3 Da Peptidmassentoleranz; \pm 0 Da Fragmentionentoleranz; variable Modifikationen: M können oxidiert, S, T, Y können phosphoryliert sein; Datenbank: HIR-**b**-UE.*

Die Phosphopeptide der mit Lys-C-gespaltenen HIR- β -UE, welche mit Hilfe der NanoES-MS-Experimente ermittelt wurden, sind in Tab. 5.11 aufgelistet. Es konnten nicht alle in der Literatur beschriebenen Phosphorylierungsstellen bzw. die entsprechenden Phosphopeptide detektiert werden. Von den in der Literatur beschriebenen Tyrosinphosphorylierungen konnte Y960 innerhalb der Juxtamembranregion, sowie Y1146/50/51 innerhalb der Kinasedomäne detektiert werden. Das dreifach Tyrosin-phosphorylierte Peptid, welches alle drei Autophosphorylierungsstellen der Tyrosinkinasedomäne enthält (Y1146/50/51), konnte nicht detektiert werden, jedoch aber das entsprechende zweifach Tyrosin-phosphorylierte Peptid. Des weiteren wurden Phosphopeptide gefunden, welche die in der Literatur beschriebenen phosphorylierten Tyrosinreste Y1316/1322 enthielten. Diese Peptide enthielten neben den Tyrosinresten Y1316/1322 jedoch auch S1315, eine in der Literatur beschriebene potentielle Serinphosphorylierung. Außerdem konnten die in der Literatur beschriebenen Phosphorylierungen an Threoninrest 1336, sowie an den Serinresten 1023/25 detektiert werden. Auf der Basis der ermittelten Peptidmassen konnte eine Sequenzabdeckung der HIR- β -UE von 73,5 % erzielt werden (Abb. 5.78).

Tab. 5.11. Tabellarische Auflistung der Phosphopeptide, welche mit Hilfe der NanoES-MS-Experimente identifiziert werden konnten. Bei dem untersuchten Protein handelte es sich um den Lys-C-verdauten insulinstimulierten Wildtyp der HIR-**b**-UE (Abb. 5.70 und 5.71).

Frakt	Position (b-UE) ⁽¹⁾	[M+H] ⁺ best. ⁽²⁾	[M+H] ⁺ theor. ⁽³⁾	Dm ⁽⁴⁾	MC ⁽⁵⁾	Mod. ⁽⁶⁾	Aminosäuresequenz
15	1144-1153	1444,8 720,9 (-1)	1445,6	0,8	1	1 PO ₄ Parent-Ion	DIYETDYYRK
16	1315-1330	2127,9 2127,9 (+1) 1064,0 (+2) 1062,4 (-2)	2126,9	1,0	1	1 PO ₄ Parent-Ion	SYEEHIPYTHMNGGKK
16	1315-1330	2143,8 2143,8 (+1) 1072,4 (+2) 1072,9 (-2)	2142,9	0,9	1	1 PO ₄ 1 Met-ox Parent-Ion	SYEEHIPYTHMNGGKK
16/17	1315-1330	1972,5 1972,5 (+1) 987,0 (+2) 984,4 (-2)	1970,8	1,7	1	1 PO ₄ Parent-Ion	SYEEHIPYTHMNGGKK
16/17/ 18	1314-1329	2000,9 2000,9 (+1) 1000,0 (+2) 665,8 (+2) 998,8 (-2)	1998,9	2,0	1	1 PO ₄ Parent-Ion	RSYEEHIPYTHMNGGKK
16/17	1315-1329	1844,4 1844,1 (+1) 919,9 (-2)	1842,8	1,3	0	1 PO ₄ Parent-Ion	SYEEHIPYTHMNGGKK
17	1314-1330	2127,4 1061,8 (-2)	2126,9	0,5		1 PO ₄ Parent-Ion	SYEEHIPYTHMNGGKK
17	1330-1343	1631,6 814,3 (-2)	1632,9	1,3	0	1 PO ₄ Parent-Ion	KNGRILTLPRSNPS
18/20	1334-1339	792,1 790,1 (-1)	792,4	0,3	0	1 PO ₄ Parent-Ion	ILTLPR
18/20	1136-1153	2403,8 2402,3 (+1) 1202,8 (+2) 1200,4 (-2)	2403,0	0,8	2	2 PO ₄ Parent-Ion	IGDFGMTRDIYETDYYR K
18	1136-1152	2210,7 1103,8 (-2)	2210,9	0,2	1	1 PO ₄ 1 Met-ox Parent-Ion	IGDFGMTRDIYETDYYR
18/20	1136-1153	2339,0 2339,0 (+1) 1168,2 (-2)	2339,0	0,0	2	1 PO ₄ 1 Met-ox Parent-Ion	IGDFGMTRDIYETDYYR K
18	1136-1153	2323,2 1160,1 (-2)	2323,0	0,2	2	1 PO ₄ Parent-Ion	IGDFGMTRDIYETDYYR K
20	1136-1152	2195,6 1096,3 (-2)	2194,6	1,0		1 PO ₄ 1 Met-ox Parent-Ion	IGDFGMTRDIYETDYYR
20	1136-1153	2232,0 1159,5 (-2)	2323,0	0,7		1 PO ₄ Parent-Ion	IGDFGMTRDIYETDYYR K
20	1019-1049	3840,7 1923,4 (+1) 1280,9 (+3)	3840,8	0,1		2 PO ₄ 1 Met-ox	TVNESASLRERIEFLNEA SVMKGFTHHVVVR
22	1125-1153	3754,9 1250,3 (-2)	3753,6	1,3	3	2 PO ₄ Parent-Ion	NCMVAHDFTVKIGDFGM TRDIYETDYYRK
22	1125-1153	3674,8 1223,6 (-2)	3673,6	0,8	3	1 PO ₄ Parent-Ion	NCMVAHDFTVKIGDFGM TRDIYETDYYRK

Tab. 5.11. Fortsetzung.

27	944-988	5368,6 1342,9 (+4) 1074,9 (+5) 895,2 (+6)	5365,6	3,0	3	IPO ₄	QPDGPLGPLYASSNPEYL SASDVFPCSVYVPDEWE VSREKITLLR
----	---------	--	--------	-----	---	------------------	---

(18) Numerierung nach Ullrich et al. [546]

(19) monoisotopische Molekulargewichte der einfach protonierten Peptide sowie der ermittelten Quasimoleküle

(20) MS-Digest 3.1.1, ProteinProspector 3.2.1; die Bedingungen waren: variable Modifikationen: Phosphorylierung von S, T und Y, Oxidation von M, Acrylamid-modifiziertes C; feste Modifikationen: C pyridylethylt; Protease: Lys-C mit max. 3 verpassten Schnittstellen; Protein: HIR-b-UE, (AA 733-1343)

(21) Δm : Differenz zwischen bestimmten und theoretischen monoisotopischen Massen

(22) Missed Cleavage (Protease verpasst eine Schnittstelle)

(23) Parent-Ion: Phosphopeptide wurden mit Hilfe der Vorläuferionen-Scantechnik detektiert

724	734	744	754	764
SLGDVGNVTV	AVPTVAAFNP	TSSTSVPTSP	EEHRPFKVV	NKESLVISGL
774	784	794	804	814
<u>RHFTGYRIEL</u>	<u>QACNQDTPEE</u>	<u>RCSVAAYVSA</u>	<u>RTMPEAKADD</u>	<u>IVGPVTHEIF</u>
824	834	844	854	864
<u>ENNVVHLMWQ</u>	<u>EPKEPNGLIV</u>	<u>LYEVSRYRYG</u>	<u>DEELHLCVSR</u>	<u>KHFALERGCR</u>
874	884	894	904	914
LRGLSPGNYS	VRIRATSLAG	NGSWTEPTYF	YVTDYLDVPS	NIAKIIIGPL
924	934	944	954	964
IFVFLFSVVI	GSIIYFLRKR	<u>QPDGPLGPLY</u>	<u>ASSNPEYLSA</u>	<u>SDVFPCSVYV</u>
974	984	994	1004	1014
<u>PDEWEVSREK</u>	<u>ITLLRELQGG</u>	<u>SFGMVYEGNA</u>	<u>RDIKGEAET</u>	<u>RVAVKTVNES</u>
1024	1034	1044	1054	1064
<u>ASLRERIEFL</u>	<u>NEASVMKGF</u>	<u>CHHVRLIGV</u>	<u>VSKGQPTLVV</u>	MELMAHGDLK
1074	1084	1094	1104	1114
SYLRSLRPEA	<u>ENNPGRPPPT</u>	<u>LOEMIQMAAE</u>	<u>IADGMAYLNA</u>	<u>KKFVHRDLAA</u>
1124	1134	1144	1154	1164
<u>RNCMVAHDFT</u>	<u>VKIGDFGMTR</u>	<u>DIYETDYYRK</u>	<u>GGKLLPVRW</u>	<u>MAPESLKDGV</u>
1174	1184	1194	1204	1214
<u>FTTSSDMWSF</u>	<u>GVVLWEITSL</u>	<u>AEOPYQGLSN</u>	<u>EQVLKRVMDG</u>	<u>GYLDQPDNCP</u>
1224	1234	1244	1254	1264
<u>ERVTDLMRMC</u>	<u>WQFNPKMRPT</u>	<u>FLEIVNLLKD</u>	<u>DLHPSFPEVS</u>	<u>FFHSEENKAP</u>
1274	1284	1294	1304	1314
<u>ESSELEMEFE</u>	<u>DMENVPLDRS</u>	<u>SHCQREEAGG</u>	<u>RDGGS</u> SLGFK	<u>RSYEEHIPYT</u>
1324	1334			
<u>HMNGGKKNR</u>	<u>ILLPRSNPS</u>			

Abb. 5.78. Aminosäuresequenzabdeckung der HIR-b-UE (73,5 %), welche bei der off-line- μ RP-HPLC/NanoES-MS-Analyse des Lys-C-verdauten insulinstimulierten Wildtyps der HIR-b-UE erhalten wurde. Die Aminosäuresequenz der HIR-b-UE ist im Einbuchstaben-Code mit Numerierung nach Ullrich et al. [546] abgebildet. Die ermittelten Sequenzabschnitte wurden unterstrichen, die publizierten Phosphorylierungsstellen grau unterlegt dargestellt.

5.10. Untersuchung der 'in vitro'-Substratspezifität verschiedener Proteinkinase C-Subtypen

Bei der Identifizierung der PKC-Substrate erwies sich die geringe Substratspezifität der Proteinkinase C (PKC) als Problem [559]. Da die PKC-Konsensussequenzen der Phosphorylierungsstellen in den Substratproteinen oft denen der PKA gleichen, kann bei 'in vitro'-Untersuchungen die Substratspezifität der PKC oft nicht von der der PKA unterschieden werden.

Folgende Konsensussequenzen der PKC sind bekannt [530]:

S*/T*XK/R

K/RXXS*/T*

K/RXXS*/T*XK/R

K/RXS*/T*

K/RXS*/T*XK/R

(* = Phosphorylierungsstelle; X = beliebige Aminosäure).

In der Nachbarschaft der zu phosphorylierenden Ser/Thr-Reste müssen somit basische Aminosäuren vorhanden sein.

Ein sehr gut untersuchtes Substrat der PKC ist MARCKS (Myrisoyliertes Alanin-reiches C-Kinase-Substrat) [560,561]. MARCKS-Proteine besitzen sehr viele saure Aminosäurereste und werden schon seit vielen Jahren in verschiedenen Zellsystemen als Marker für die PKC-Aktivierung herangezogen [560,562]. Die PKC-Phosphorylierungsstellen liegen in der Phosphorylierungsstellen-Domäne (PSD), einem 25 Aminosäurereste umfassenden basischen Sequenzbereich. 'In vitro' werden vier Serinreste innerhalb der PSD durch die PKC phosphoryliert. Physiologisch wurden jedoch nur drei dieser Reste als Phosphorylierungsstellen beschrieben [560,562]. Das verwendete MARCKS-PSD-ständige Peptid KKRFSFKKSFKL (M_w 1542,9 Da, Aminosäuren 154-165 im MARCKS-Protein, SWISSProt Acc. Nr. P35570) enthält die ersten zwei der insgesamt vier Serinreste innerhalb der PSD. Das Peptid wird von folgenden PKC-Subtypen an Ser5 und Ser9 phosphoryliert: cPKC α/β , nPKC $\delta/\epsilon/\theta$, aPKC ζ .

5.10.1. MS-Analyse des 'in vitro' mit den PKC-Isoformen α , β I, β II, θ , ι umgesetzten MARCKS-PSD-ständigen Peptids

Zur Ermittlung der Substratspezifität der PKC-Isoformen α , β I, β II (cPKC), θ (nPKC) und ι (aPKC) wurden diese 'in vitro' mit dem MARCKS-PSD-ständigen Peptid umgesetzt. Die Phosphorylierungsreaktion wurde nach 30 bzw. 90 Minuten abgebrochen. Für den semiquantitativen Vergleich der verschiedenen Ansätze wurden *on-line*- μ LC/ESI-MS-Analysen durchgeführt. Die hochkonzentrierten Pufferbestandteile, welche für die Kinasereaktion notwendig sind, verhinderten eine direkte MS-Analyse (Probenschleifen-Injektion) der 'in vitro'-Ansätze. Die Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen erfolgte *off-line* mit Hilfe der positiv-Ionen-NanoES-MS/MS. Vor ihrer NanoES-MS-Analyse wurden die Proben mit Hilfe von RP-Mikro-Tips entsalzt (siehe Kap. 5.2).

5.10.1.1. μ LC/ESI-MS-Analyse des Kontrollexperimentes

In einem Kontrollexperiment wurde das MARCKS-PSD-ständige Peptid (K^{154} KRFSFKKSFKL¹⁶⁵, M_w 1542,9 Da) 'in vitro' ohne Kinase umgesetzt. Wie die μ LC/ESI-MS-Analyse ergab, wurde das MARCKS-PSD-ständige Peptid bei dem 'in vitro'-Experiment nicht verändert (Abb. 5.79). Unter den gewählten Bedingungen eluierte das Peptid nach 25 min von der RP-Säule (Signal bei $R_t = 25$ min im UV- bzw. BP-Chromatogramm, Abb. 5.79.A und B).

Im positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum, welches über den BPC-Peak (R_t 25 min) aufsummiert wurde, sind deutlich die $[M+2H]^{2+}$ - und $[M+3H]^{3+}$ -Quasimolekülonen bei m/z 772,2 bzw. m/z 514,6 des unmodifizierten MARCKS-PSD-ständigen Peptids zu erkennen (Abb. 5.79.C).

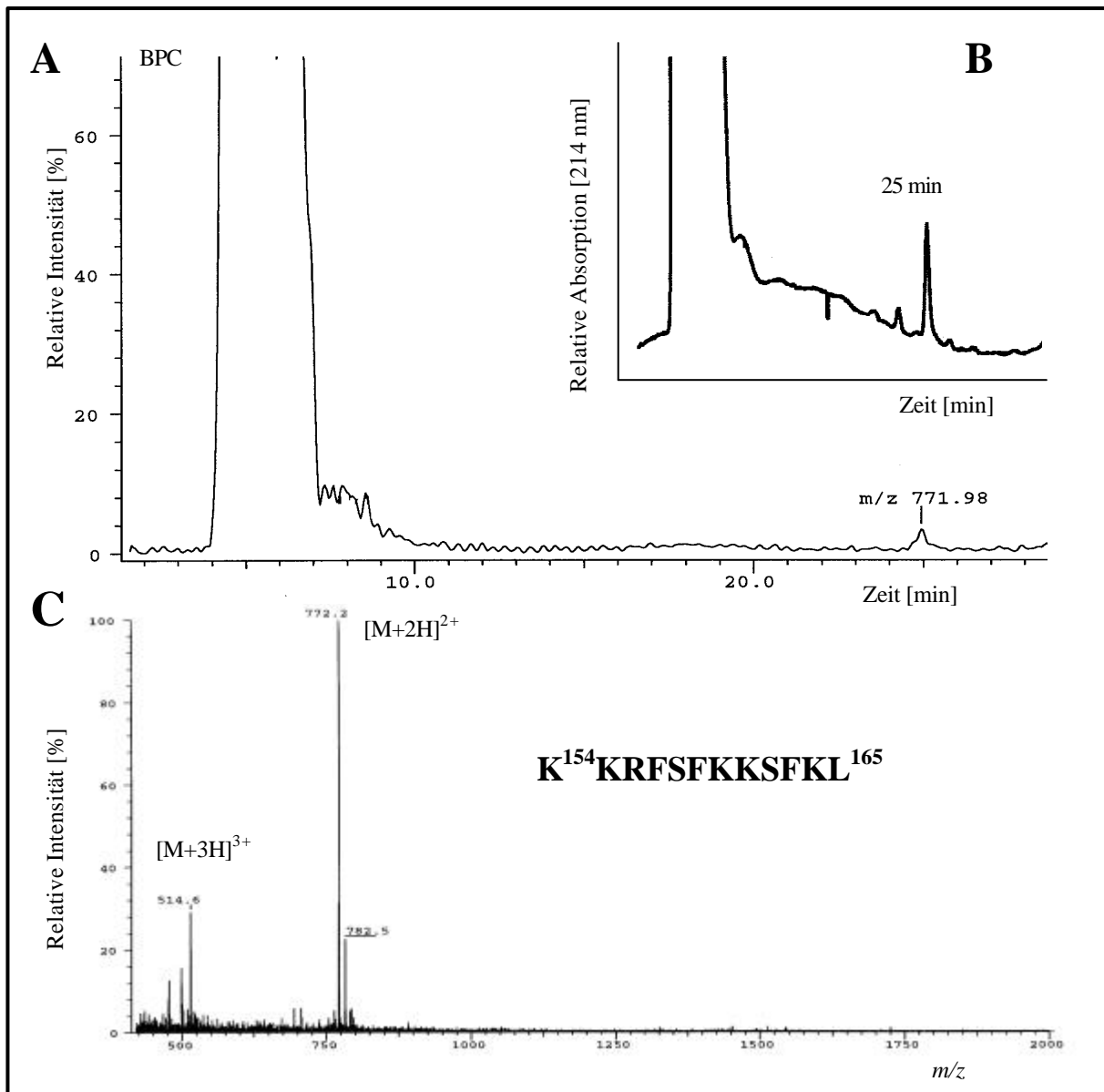


Abb. 5.79. Positiv-Ionen- μ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) des 'in vitro' ohne Kinase umgesetzten MARCKS-PSD-ständigen Peptids $K^{154}KRFSFK-KSFKL^{165}$. (A) Base-Peak-Chromatogramm, (B) UV-Chromatogramm, welches on-line bei einer Wellenlänge von 214 nm während der LC-Trennung aufgenommen wurde. (C) Über das Signal im BPC ($R_t = 25$ min) aufsummiertes ESI-Massenspektrum mit Zuordnung der Peptidmassen: nicht-phosphoryliertes MARCKS-PSD-ständiges Peptid, $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 772,2, $[M+3H]^{3+}$ bei m/z 514,6. Bedingungen: LC: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μ m (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); Flussrate 5 μ l \cdot min $^{-1}$; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in Wasser; Puffer B: 80 % ACN, 0,075 % TFA in Wasser; Gradient: 5-95 % B in 40 min; UV-Detektion $\lambda = 214$ nm (Bubble-Zelle, ca. 150 μ m I.D.); Injektion: Probe gelöst in 10 μ l 5 % B; Standard-ESI-Quelle; 50 μ m I.D. f.s.-ESI-Kapillare; -4,5 kV ESI-Spannung; positiv-Ionenmodus; 5 μ l \cdot min $^{-1}$ Sheath-Flüssigkeit (70 % MeOH in Wasser); Q1-Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec.

5.10.1.2. μ LC/ESI-MS-Analyse des 'in vitro' mit PKC- β I umgesetzten MARCKS-PSD-ständigen Peptids

Das MARCKS-PSD-ständige Peptid ($K^{154}KRFSFKKSFKL^{164}$, M_w 1542,9 Da) wurde 'in vitro' mit der cPKC-Isoform β I umgesetzt; die Reaktion wurde nach 90 min beendet.

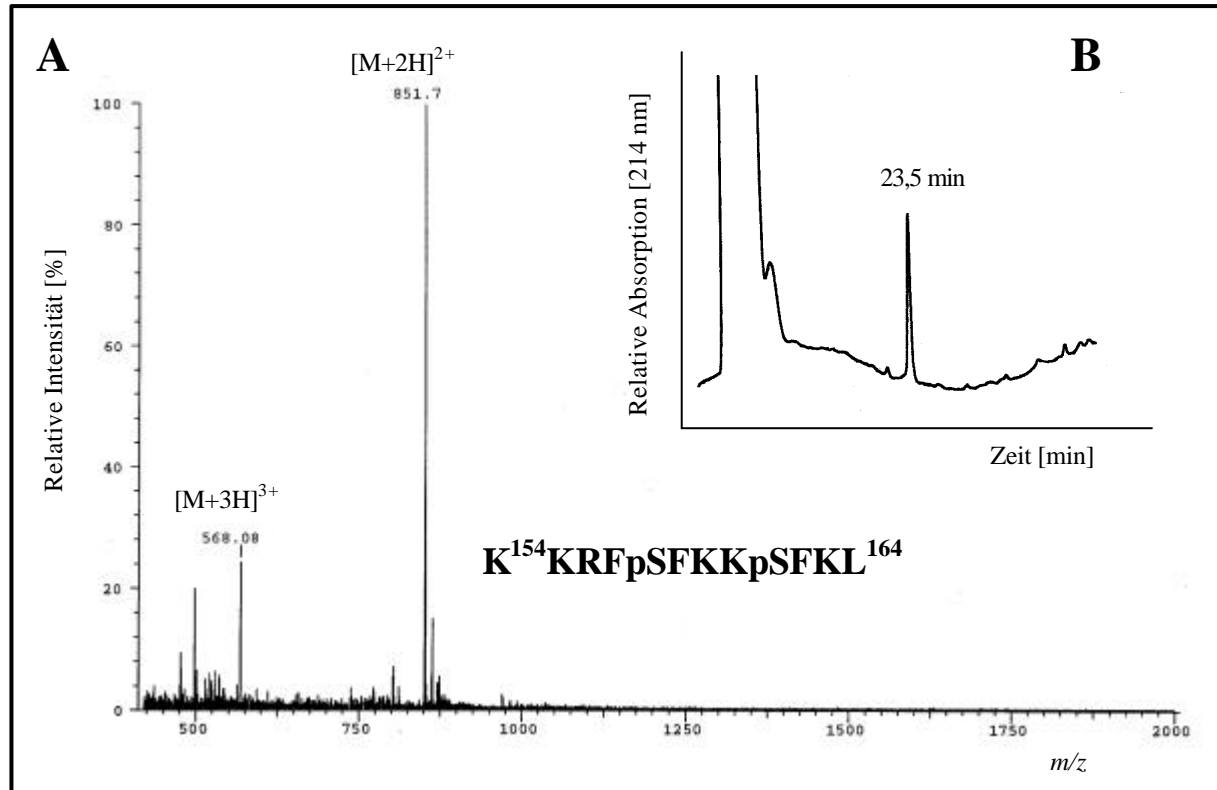


Abb. 5.80. Positiv-Ionen- μ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) von 'in vitro' mit PKC- β I umgesetztem MARCKS-PSD-ständigem Peptid $K^{154}KRFSFKKSFKL^{164}$ (Reaktionsdauer 90 min). (A) Über das Signal im BP- bzw. UV-Chromatogramm ($R_t = 23,5$ min, Teil B der Abb.) aufsummiertes ESI-Massenspektrum mit Zuordnung der Peptidmassen: zweifach-Serin-phosphoryliertes MARCKS-PSD-ständiges Peptid $KKRFpSFKKpSFKL$ $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 851,7, $[M+3H]^{3+}$ bei m/z 568,1. Bedingungen: LC: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μ m (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); Flussrate 5 μ l min^{-1} ; Elutionsmittel: Puffer A: 0,05 % TFA in Wasser; Puffer B: 80 % ACN, 0,075 % TFA in Wasser; Gradient: 5-95 % B in 40 min; UV-Detektion $\lambda = 214$ nm (Bubble-Zelle, ca. 150 μ m I.D.); Injektion: Probe gelöst in 10 μ l 5 % B; Standard-ESI-Quelle; 50 μ m I.D. f.s.-ESI-Kapillare; -4,5 kV ESI-Spannung; positiv-Ionenmodus; 5 μ l min^{-1} Sheath-Flüssigkeit (70 % MeOH in Wasser); Q1-Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec.

Abbildung 5.80 zeigt die Resultate, welche bei der μ LC/ESI-MS-Analyse des 'in vitro' mit der PKC-Isoform β I umgesetzten MARCKS-PSD-ständigen Peptids (Reaktionsdauer 90 min) erhalten wurden. Im UV-Chromatogramm konnte nur ein einziges Signal bei $R_t = 23,5$ min detektiert werden (Abb. 5.80.B). Im Vergleich zu dem nicht-phosphorylierten Peptid (Abb. 5.79) eluierte das phosphorylierte Peptid etwa 1,5 min früher von der Säule. Durch die vorhandenen Phosphatgruppen erhöhte sich die Polarität des Peptids und bewirkte dadurch die raschere Elution gegenüber dem nicht-phosphorylierten Peptid (Abb. 5.79). Im positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum der über den BPC-Peak bei $R_t = 23,5$ min aufsummierten Scans sind

deutlich die $[M+2H]^{2+}$ - und $[M+3H]^{3+}$ -Quasimolekülonen des zweifach-Ser-phosphorylierten MARCKS-PSD-ständigen Peptids, bei m/z 851,7 bzw. m/z 568,1 zu sehen (Abb. 5.80.A). Das Peptid wurde somit an beiden Serinresten (Position 5 und 9) zu 100 % phosphoryliert.

5.10.1.3. μ LC-ESI-MS- und NanoES-MS-Analyse von 'in vitro' mit PKC-i umgesetztem MARCKS-PSD-ständigem Peptid

Das MARCKS-PSD-ständige Peptid ($K^{154}KRFSFKKSFKL^{164}$, M_w 1542,9 Da) wurde 'in vitro' mit der PKC-Isoform ι 30 bzw. 90 min lang umgesetzt. Zur Ermittlung der Phosphorylierungsstelle des mono-phosphorylierten Peptids wurde *off-line* eine positiv-Ionen Neutralverlust-Analyse sowie eine NanoES-MS/MS-Sequenzanalyse nach vorhergehender RP-Mikro-Tip-Entsalzung durchgeführt.

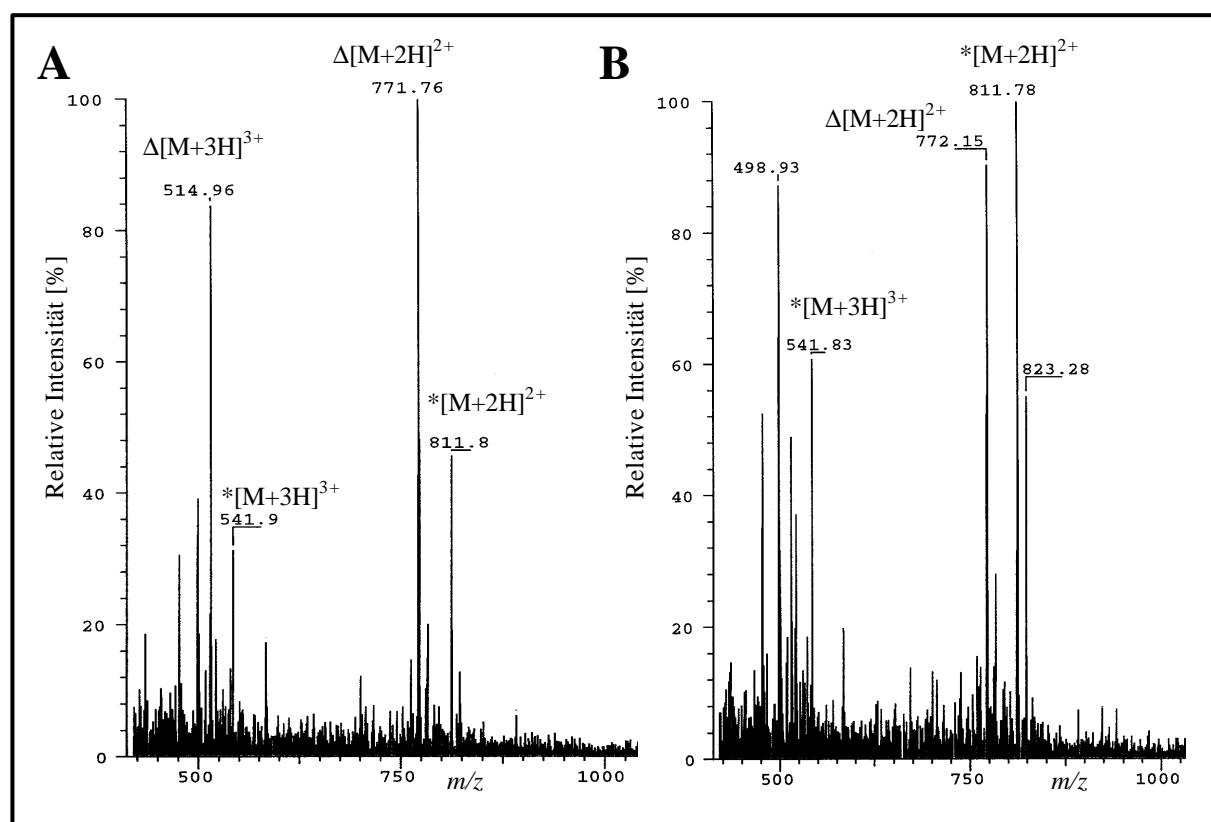


Abb. 5.81. Positiv-Ionen ESI-Massenspektren (TSQ 700) von 'in vitro' mit der PKC-Isoform ι umgesetztem MARCKS-PSD-ständigem Peptid $K^{154}KRFSFKKSFKL^{164}$ nach (A) 30 und (B) 90 min Reaktionsdauer. Die Spektren wurden während der on-line- μ LC/ESI-MS-Experimente aufgezeichnet. Zuordnung der Peptidmassen: einfach-Serin-phosphoryliertes MARCKS-PSD-ständiges Peptid $KKRFSFKKpSFKL$ (*): $[M+2H]^{2+}$ - und $[M+3H]^{3+}$ -Quasimolekülon bei m/z 811,8 bzw. m/z 541,9; nicht-phosphoryliertes MARCKS-PSD-ständiges Peptid $KKRFSFKKSFKL$ (Δ): $[M+2H]^{2+}$ - und $[M+3H]^{3+}$ -Quasimolekülon bei m/z 771,8 bzw. m/z 515,0. Bedingungen siehe Abb. 5.79.

Im Vergleich zu der 'in vitro'-Umsetzung des MARCKS-PSD-ständigen Peptids mit der PKC-Isoform β I (Kap. 5.10.1.2) führte die Umsetzung mit der ι -Isoform lediglich zu der Phosphorylierung eines einzigen Serinrestes. Zudem konnte eine quantitative Phosphorylierung, wie mit der Isoform β I, nicht beobachtet werden (siehe Tab. 5.13).

Abbildung 5.81 zeigt die ermittelten positiv-Ionen- μ LC/ESI-Massenspektren nach 30 und 90 min Reaktionsdauer. Die Ionensignale des nicht-phosphorylierten (KKRFSFKKSFKL, m/z 771,8 $[M+2H]^{2+}$, m/z 515,0 $[M+3H]^{3+}$) sowie des einfach-phosphorylierten (KKRFSFKKpSFKL, m/z 811,8 $[M+2H]^{2+}$, m/z 541,9 $[M+3H]^{3+}$) MARCKS-PSD-ständigen Peptids sind deutlich zu erkennen. Der Phosphorylierungsgrad wurde aus dem Verhältnis der Intensitäten der zweifach-positiv-geladenen $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülonen (nicht-phosphoryliert und phosphoryliert) berechnet. Nach 30 min waren demnach 36 %, nach 90 min 56 % der eingesetzten Peptidmenge phosphoryliert.

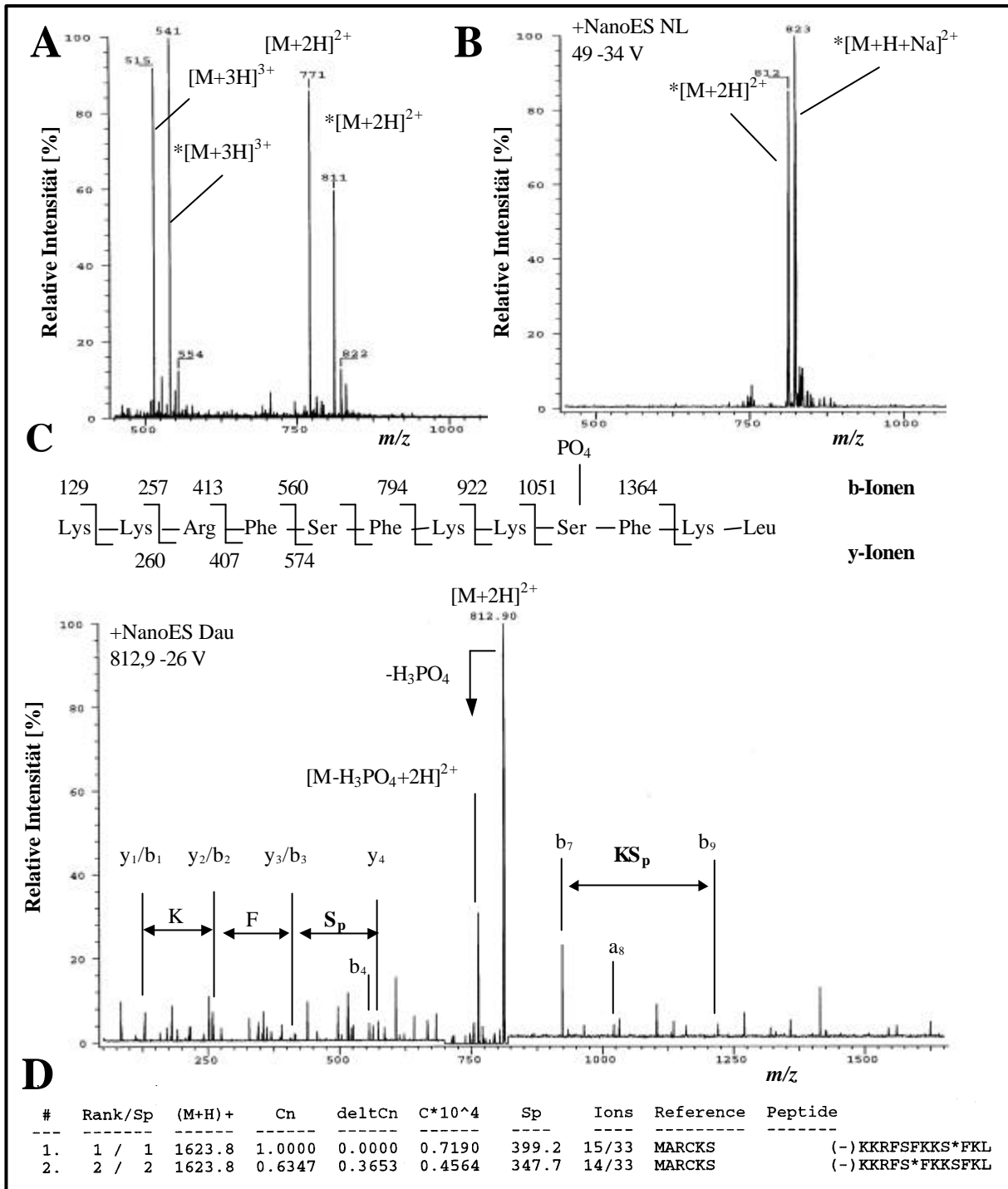


Abb. 5.82. (vorherige Seite) *Positiv-Ionen-NanoES-MS-Identifizierung (TSQ 700) der Serin-Phosphorylierungsstelle des 'in vitro' mit der PKC-Isoform θ phosphorylierten MARCKS-PSD-ständigen Peptids $K^{154}KRFSFKKSFKL^{164}$. Die Reaktionslösung wurde vor der MS-Analyse durch RP-Mikro-Tips entsalzt. (A) NanoES-Massenspektrum der entsalzten Reaktionslösung mit Zuordnung der Peptidmassen: nicht-phosphoryliertes MARCKS-PSD-ständiges Peptid ($[M+2H]^{2+}$ bei m/z 771,9, $[M+3H]^{3+}$ bei m/z 515); einfach-Serin-phosphoryliertes MARCKS PSD-ständiges Peptid ($(*)[M+2H]^{2+}$ bei m/z 811,9, $[M+3H]^{3+}$ bei m/z 541). (B) NanoES-MS-Neutralverlust-Analyse. Neutralverlust-Scan auf 49 Da (98/2 Da) zur Detektion von $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptidionen. Zuordnung der Peptidmassen: einfach-Ser-phosphoryliertes MARCKS-PSD-ständiges Peptid ($(*) [M+2H]^{2+}$ bei m/z 811,9 mit Na-Adduktion). (C) NanoES-MS/MS-Massenspektrum des einfach-Serin-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -Quasimoleküls bei m/z 811,9 mit Zuordnung der bei der SEQUEST-Analyse (Teil D der Abbildung) identifizierten b- und y-Typ-Fragmentationen. Bei der phosphorylierten Aminosäure handelte es sich um Serinrest an Position 9. Bedingungen: RP-Mikro-Tip entsalzte Probe eluiert mit 3 μ l 50 % ACN, 5 % Ameisensäure (v/v); -800 V NanoES-Spannung; Übersichtsspektrum: Q1-Scan im Bereich von 450-2000 m/z in 3 sec; 10 Scans; Neutralverlust-Analyse: Q1-Scan im Bereich von 450-2050 m/z , MS/MS in q2: -34 V Kollisions-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon), Q3-Neutralverlust-Scan um 49 m/z gegenüber Q1 versetzt im Bereich von 400-2000 m/z in 3,5 sec; 22 Scans; Tochterionen-Experiment: $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 812,4 isoliert in Q1; MS/MS in q2: -26 V (52 eV) Kollisions-Offset; 2,6 mTorr Stossgasdruck (Argon), Q3-Scan im Bereich von 50-1650 m/z in 3 sec; 46 Scans.*

Die intensiven Peptidionen-Signale des NanoES-MS-Übersichtsspektrums (Abb. 5.82.A) lassen klar erkennen, dass die Reaktionslösung mit Hilfe der selbstgefertigten Mikro-Tips sehr gut entsalzt werden konnte. Trotz der geringen Anzahl akkumulierter Scans konnte ein sehr gutes S/N-Verhältnis beobachtet werden. Abbildung 5.82.B zeigt das positiv-Ionen-NanoES-Neutralverlust-Spektrum (Scan auf 49 Da, Neutralverlust von H_3PO_4 aus einem zweifach-positiv-geladenen Phosphopeptidion), welches bei einem Kollisions-Offset von -34 V aufgenommen wurde. Im Vergleich zum Übersichtsspektrum (Abb. 5.82.A) konnte nur noch das $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion des einfach-phosphorylierten Peptids bei m/z 812,4, sowie dessen Natrium-Adduktion detektiert werden. Die Position der phosphorylierten Aminosäure innerhalb der Sequenz des MARCKS-PSD-ständigen Peptids erfolgte *off-line* mittels positiv-Ionen-NanoES-Tandem-MSMS und anschließender SEQUEST-Analyse (Abb. 5.82). Das Tochterionenspektrum des $[M+2H]^{2+}$ -Ions bei m/z 812,4 ist in Abb. 5.82.C abgebildet. Infolge der β -Eliminierung von Phosphorsäure wurde das $[M-H_3PO_4+2H]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentation bei m/z 763,4 gebildet. Durch die SEQUEST-Analyse (Abb. 5.82.D) konnte die Position des Phosphatrestes eindeutig bestimmt werden. Bei der phosphorylierten Aminosäure handelte es sich um den Serinrest an Position 9 innerhalb der Sequenz des MARCKS-PSD-ständigen Peptids ($K^{154}KRFSFKKpSFKL^{164}$).

5.10.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Phosphorylierung von intaktem MARCKS durch atypische PKC-Subtypen konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, phosphorylieren die verschiedenen PKC-Subtypen das MARCKS-PSD-ständige Peptid in unterschiedlicher Weise (siehe Tab. 5.13). Das MARCKS-PSD-ständige Peptid wurde durch die klassischen PKC-Subtypen α , β I, β II *'in vitro'* sowohl an Ser-5 als auch an Ser-9 phosphoryliert. Der neue PKC-Subtyp θ phosphorylierte das MARCKS PSD-ständige Peptid ebenfalls an beiden Serinresten. Bei allen vier Subtypen konnte schon nach 30 min

Reaktionsdauer ein Phosphorylierungsgrad von 100 % beobachtet werden. Die atypische PKC- ι phosphorylierte das MARCKS-PSD-ständige Peptid nur an Ser-9. Mit zunehmender Reaktionsdauer nahm der Phosphorylierungsgrad zu. Nach 30 min waren 36 % der eingesetzten Peptidmenge, nach 90 min 56 % phosphoryliert.

Tab. 5.12. Monoisotopische Molekulargewichte (in Da) der einfach und zweifach positiv geladenen Molekülonen der nicht-, einfach- sowie zweifach-phosphorylierten MARCKS-PSD-ständigen Peptide.

Sequenz	m/z $[M+2H]^{2+}$	m/z $[M+H]^+$
KKRFSFKKSFKL	772,5	1543,9
KKRFpSFKKSFKL	812,5	1623,9
KKRFSFKKpSFKL	812,5	1623,9
KKRFpSFKKpSFKL	852,4	1703,9

Tab. 5.13. Tabellarische Auflistung der Ergebnisse, welche bei den Analysen der 'in vitro'-Experimente ermittelt wurden. MARCKS-PSD-ständiges Peptid wurde mit den PKC-Subtypen **a**, **β I**, **β II**, **q**, und **ι** umgesetzt. Die Reaktionsdauer betrug jeweils 30 und 90 min. Die Peptidmassen wurden mit Hilfe von μ LC/ESI-MS- oder NanoES-MS-Experimenten ermittelt. Der Phosphorylierungsgrad wurde aus dem Verhältnis der Intensitäten der zweifach-positiv-geladenen $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülonen (nicht-phosphoryliert und phosphoryliert) der entsprechenden Peptide ermittelt.

PKC-Subtyp	Reaktions-dauer [min]	Peptidmassen (siehe Tab. 5.12.)	Phosphorylierungsstellen	Phosphorylierungsgrad
α	30	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
	90	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
β I	30	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
	90	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
β II	30	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
	90	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
θ	30	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
	90	852,4	KKRFpSFKKpSFKL	100 %
ι	30	772,5	KKRFSFKKSFKL	64 %
		812,5	KKRFSFKKpSFKL	36 %
	90	772,5	KKRFSFKKSFKL	44 %
		812,5	KKRFSFKKpSFKL	56 %

5.11. Identifizierung der Serinphosphorylierungsstellen von 'in vitro' mit den Proteinkinase C-Isoformen βI und βZ umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteinen

Insulinrezeptor Substrat 1 (IRS-1) ist ein 130 kDa großes Protein aus der Familie der IRS-Proteine, welches 1991 kloniert wurde [426]. Die IRS Proteine sind physiologische Substrate der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase [415,426,439,563]. IRS-1 enthält insgesamt 244 Serin- und Threoninreste, wobei über 70 dieser Reste innerhalb potentieller Phosphorylierungskonsensussequenzen unterschiedlicher Kinasen (PKA, PKC und MAPK) liegen [415,426,439]. Vor seiner Stimulierung durch den Insulinrezeptor liegt IRS-1 stark Serinphosphoryliert vor [426]. Mit Hilfe von 'in vitro'-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Insulinrezeptor-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 durch die IRS-1 Serinphosphorylierung verhindert wird. Die Dephosphorylierung dieser Serinreste bewirkte dann wiederum eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung des IRS-1 [563]. Die Tyrosinphosphorylierten IRS-Proteine werden aufgrund der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen als *Docking*-Proteine für SH2-Domänen-haltige Proteine, u.a. PI 3-Kinase, Grb2/Sos, SHP2 usw. herangezogen [20] (Kap. 2.6.8). Im N-terminalen Bereich des IRS-1 befindet sich eine PH- (*Pleckstrin Homology*, AS 12-115) sowie eine PTB-Domäne (*Phosphotyrosine-binding*, AS 152-262). Die PTB-Domäne bindet, ebenso wie die SH2-Domänen, an phosphorylierte Tyrosinreste. Die Bindung der PTB-Domäne an das NPXY-Motiv (NH₂-LYASSNPEpY⁹⁶⁰LSASDV-COOH) des Insulinrezeptors vermittelt die Wechselwirkung zwischen dem Insulinrezeptor und dem IRS-1. Bei Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes kann eine erhöhte IRS-1-Serinphosphorylierung beobachtet werden [564], welche die insulinstimulierte Autophosphorylierung des Insulinrezeptors, die Aktivierung der PI 3-Kinase, die Glukoseaufnahme und somit andere insulinstimulierte biologische Reaktionen unterdrückt [516,519,522,565-571]. Einigen Berichten zufolge unterdrückt die Serinphosphorylierung von IRS-1 dessen Fähigkeit zur Zusammenlagerung mit dem Insulinrezeptor und somit auch dessen Wirkung als Substrat der Tyrosinkinase [515,519,521,522,565,567]. Die Identifizierung signalhemmender, auf Serin/Threonin-Phosphorylierungen basierender Mechanismen, welche zur Entstehung des Typ 2 Diabetes führen, könnte somit einen molekularen Ansatz zur Entwicklung einer Insulinresistenz beinhalten. Vor kurzem wurde über die Phosphorylierung von IRS-1 durch PKC- ζ berichtet [488]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die insulinstimulierte PKC- ζ vermittelte Phosphorylierung von IRS-1 deren Proteinfunktion in negativer Weise reguliert [489]. Die PKC-vermittelte Phosphorylierung des N-terminalen Bereichs des IRS-1 könnte somit für die Störung der IR/IRS-1 Wechselwirkung verantwortlich sein. Zur Identifizierung der PKC- ζ -abhängigen IRS-1-Phosphorylierungsstelle(n) wurde deshalb ein 'in vitro'-Phosphorylierungssystem etabliert. Ein Bereich aus dem N-terminalen Teil des IRS-1 (direkte Nachbarschaft zur PTB-Domäne) wurde als GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsprotein 'in vitro' durch die PKC-Isoformen ζ und βI phosphoryliert und anschließend die Phosphorylierungsstelle(n) mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren ermittelt.

5.11.1. Das GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsprotein

Der N-terminale Bereich (Aminosäuren 265-522, IRS-1^{Nk}) des IRS-1 Proteins (Swiss Prot Nr. P35570) wurde als Glutathion S-Transferase (GST) Fusionsprotein mit dem pGEX-2T Vektor (Amersham Pharmacia Biotech) exprimiert [572]. Die DNA, welche diesen Bereich des IRS-1 kodiert, wurde durch PCR (*Polymerase Chain Reaction*) unter Verwendung von cDNA (Ratten IRS-1) als Vorlage und Paaren von Oligonukleotid Primern, welche die entsprechenden Restriktionsstellen des Fragmentes begrenzen, synthetisiert. Die PCR-

Produkte wurden isoliert, mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und in den pGEX-2T Vektor subkloniert, welcher zur Transformation von *Escherichia coli* BL21TMRiL benutzt wurde. Nach der Lyse der gewachsenen transformierten Zellen wurde das Fusionsprotein affinitätschromatographisch entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt (Glutathion-Sepharose Säule, Amersham Pharmacia Biotech). Der Sequenzbereich des IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins enthält 56 Serin- und 18 Threoninreste. Nach Pearson und Kemp [530] sind somit 17 potentielle Phosphorylierungsmotive für die Proteinkinase C vorhanden, wobei nur eine dieser Stellen (KPGS³¹⁸FVR) eine konventionelle Konsensussequenz der PKCs (R/KXXS/TXKR) darstellt.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYY
 GDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRRIAYSKDFETI
 DFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVLC
 KRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGS²²⁷**SQSSSSCSNI**
VPLRRHHLNPPPSQVGLTRRSRTESITATSPASMVGGKPGSFRVRRASDGEGTM^{SRE}
 VD^{GSPVSPSTNRTHAHRHRGSSRLHPPLNHSRSIPMPSSRCSPSATSPVSLSSSSTSG}
 STSDCLFPRRSSASVSGSPSDGGFISSEYGGSSPCDFRSSF^{RSVTPDSLGH}TTPPARGE
 LSNYICMGGK**GASTLT**APNGHYILSRGGNGHRYIPGATMGTSPAL**TGDEAAGAALDNR**
KRTHS⁴⁸³GDPRNSW

Abb. 5.83. Aminosäuresequenz des GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code wiedergegeben. Aminosäuren aus dem IRS-1 wurden fett, die des GST kursiv abgebildet. Der IRS-1^{Nk}-Teil (Aminosäuren 265-522) entspricht somit Ser227-Ser483 im GST-Fusionsprotein. Die potentiellen Phosphorylierungsstellen, welche nach Pearson [23] innerhalb der Konsensussequenzen der PKC-Isoformen liegen, wurden unterstrichen (siehe Kap. 2.6.11).

5.11.2. 'In vitro'-Phosphorylierung, SDS-PAGE, enzymatische Spaltung und Isolierung der phosphorylierten Peptide

Das GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsprotein wurde 'in vitro' durch die rekombinanten PKC-Isoformen β I und ζ in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP phosphoryliert (1 pmol ATP entspricht dabei 2080 CPM). Danach wurde die Proteinmischung in einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Phosphoproteine autoradiographisch detektiert. Die phosphorylierten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteine wurden tryptisch im Gel gespalten. Die extrahierten tryptischen Peptide wurden anschließend durch RP-HPLC aufgetrennt und fraktioniert. Die phosphorylierten Peptide wurden anhand der ermittelten Cerenkov-Counts (Radioaktivität) der isolierten LC-Fraktionen detektiert.

5.11.3. 2-D-RP-LC und massenspektrometrische Detektion der Phosphopeptide

Um die Phosphopeptide des tryptisch verdauten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins in den radioaktiven LC-Fraktionen detektieren zu können, wurde ein Kapillar-chromatographisches μ LC/ESI-MS-Verfahren entwickelt (experimenteller Aufbau siehe Abb. 5.84). Insgesamt handelt es sich somit um ein neues, zwei-dimensionales RP-Chromatographieverfahren, bei welchem die Trennung in der ersten Dimension unter TFA-sauren Bedingungen, in der zweiten Dimension unter alkalischen Bedingungen (pH 10,5) erfolgt. Zur Steigerung der Ionisierungseffizienz der Phosphopeptide wurde zusätzlich im negativen Ionisierungsmodus gearbeitet. Die Ionisierung bzw. der Sprayprozess wurde mit Hilfe von unbeschichteten PicoTips ebenfalls verbessert (75 μ m I.D., 360 μ m O.D.-Kapillaren, auf 30 \pm 2 μ m

ausgezogene Spitze an der Öffnung). Die *Spray-Tips* wurden über ein Titan-Mikro-T-Stück (VICI) direkt an die LC-Säule gekoppelt. Dieser Aufbau ermöglichte die Trennung des Säuleneluates. Während der Analyse konnten somit *on-line* Fraktionen gesammelt werden. Bei einer Flussrate von $5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ($4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ LC, $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ *Sheath*-Flüssigkeit) wurden etwa $1,7 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ins MS-Gerät infundiert, während $3,3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ fraktioniert werden konnten. Das Mikro-T-Stück diente gleichzeitig als elektrischer Kontakt (LC-Eluat hatte im Bereich der Bohrung des T-Stücks direkten Kontakt mit dem Metall) für den ESI-Prozess. Von den gesammelten Fraktionen wurde im Anschluss an die LC-Trennung mit Hilfe eines Cerenkov-Counters deren Radioaktivität bestimmt. Die radioaktiven Fraktionen wurden dann der *off-line*-NanoES-MS zugeführt (saure Bedingungen) und die Phosphopeptide mit Hilfe der positiv-Ionen-NanoES-MS/MS sequenziert.

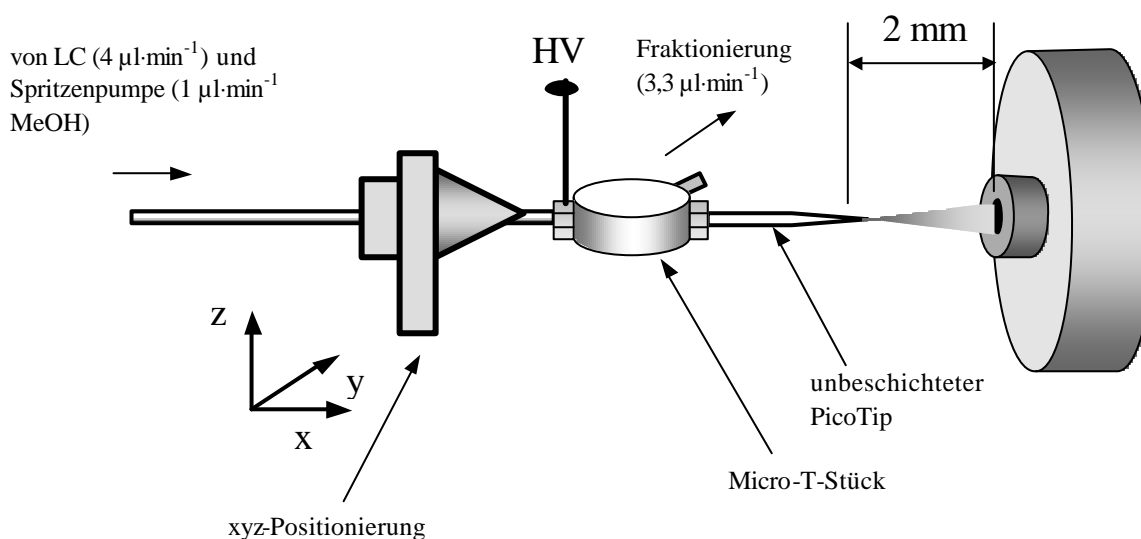


Abb. 5.84. Schematische Darstellung des $\mu\text{LC}/\text{ESI-MS}$ -Aufbaus. Zur Stabilisierung des Elektrosprays wurde dem μLC -Eluat ($4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) über ein T-Stück $1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ MeOH zugemischt. Mit Hilfe eines Titan-Mikro-T-Stücks wurde das Säuleneluat geteilt (Split, Fraktionierung). Das T-Stück diente gleichzeitig als elektrischer Kontakt zum Anlegen der ESI-Spannung. Durch die Verwendung unbeschichteter PicoTips ($30 \mu\text{m}$ I.D. an der Öffnung der Spitze) konnte ohne *Sheath*-Gas gearbeitet werden. Mit Hilfe einer xyz-Positionierungseinrichtung konnte der PicoTip exakt vor der Orifice-Öffnung des MS-Gerätes positioniert werden.

5.11.4. Detektion der tryptischen Phosphopeptide des 'in vitro' mit PKC- ζ umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins

5.11.4.1. LC-Trennung und Fraktionierung des tryptisch gespaltenen Fusionsproteins

Abbildung 5.85 zeigt das UV-Chromatogramm, welches bei der TFA-sauren RP-HPLC-Trennung des tryptisch im Gel gespaltenen phosphorylierten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins erhalten wurde. Vor seiner enzymatischen Spaltung wurde das Fusionsprotein in Anwesenheit von [γ - ^{32}P]ATP 'in vitro' durch PKC- ζ phosphoryliert. Anhand der UV-Signale ist deutlich zu erkennen, dass bei der tryptischen Spaltung eine komplexe Peptidmischung resultierte (Abb. 5.85). Die ermittelten Radioaktivitäten (Cerenkov-Signale) der gesammelten Fraktionen sind ebenfalls in der Abbildung dargestellt. Die intensiven Cerenkov-Signale bei den

Elutionszeiten von 35 und 38 min lassen deutlich erkennen, dass zu diesen Zeitpunkten phosphorylierte Peptide eluierten. Die entsprechenden UV-Signale waren im Vergleich mit den restlichen UV-Signalen wenig intensiv. Für die weiteren Analysen wurden die Fraktionen F34, F35 und F36 miteinander vereinigt, ebenso F37 und F38.

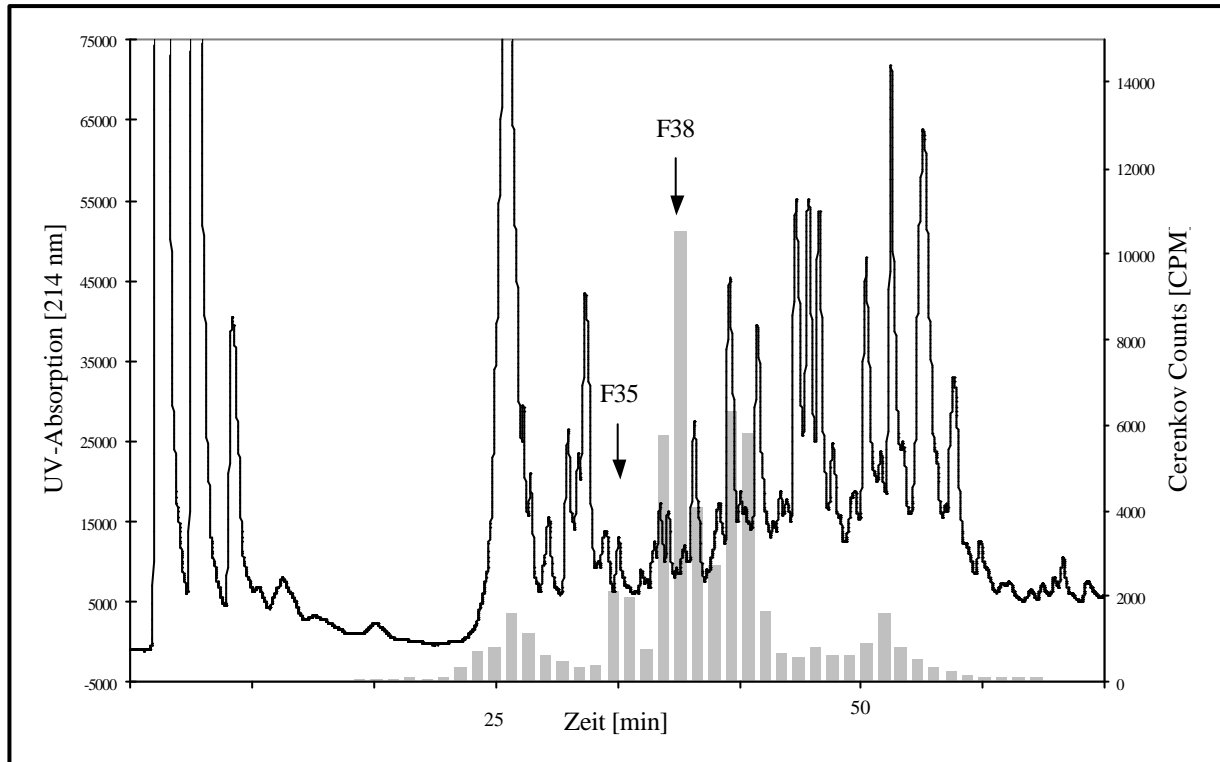


Abb. 5.85. UV-Chromatogramm (durchgezogene Kurve) und Cerenkov-Chromatogramm (^{32}P -Spur, graue Balken) der tryptischen Peptide des im Gel verdauten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins, welches 'in vitro' mit PKC- α phosphoryliert wurde. Das UV-Chromatogramm wurde on-line ermittelt. Zur Erstellung des Cerenkov-Chromatogramms wurden Fraktionen gesammelt (jeweils 1 min) und die Radioaktivitäten off-line am Cerenkov-Counter bestimmt (jeweils 1 min). Entsprechend ihren Elutionszeiten bei 35 und 38 min sind die Fraktionen F35 und F38 (intensive Radioaktivitäten im Cerenkov-Chromatogramm) gekennzeichnet. Bedingungen: C18 RP-Säule 10 cm x 1 mm I.D. (Pharmacia Biotech); Flussrate 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$; Elutionsmittel: System A: 0,05 % TFA in Wasser; System B: 80 % ACN, 0,05 % TFA in Wasser; Gradient: 0-10 min 0 % B, 10-60 min 40 % B, 60-90 min 100 % B; on-line-UV-Detektion bei $\lambda = 214 \text{ nm}$.

5.11.4.2. μLC /MikroESI-MS-Analyse und Fraktionierung der Phosphopeptide

Die Substanzen der in den beiden radioaktiven Fraktionen F35 und F38 (Abb. 5.85) enthaltenen tryptischen Peptide wurden mit Hilfe der in Abschnitt 5.11.3 beschriebenen μLC /ESI-MS-Anordnung (Abb. 5.84) bestimmt. Zur Injektion wurden die Proben in 10 μl wässriger 5 % ACN (pH 10,5) gelöst. Die Fraktionen wurden anhand der Base-Peak-Signale gesammelt (ansteigende bzw. abfallende Signale). Die Abbildung 5.86 bzw. 5.87 zeigen die Resultate, welche bei der alkalischen μLC /ESI-MS-Analyse von Fraktion F35 bzw. Fraktion F38 erhalten wurden. Die Bestimmung der Radioaktivität der Fraktionen erfolgte off-line. Die ermittelten Cerenkov-Chromatogramme sind in den Abb. 5.86.A bzw. 5.87.A abgebildet, die on-line ermittelten Base-Peak-Chromatogramme in Abb. 5.86.B bzw. 5.87.B. Trotz des sehr

steilen Gradienten (0-80 % B innerhalb von 40 min) konnten die in den Proben enthaltenen Peptide deutlich voneinander getrennt werden. Verglichen mit der TFA-sauren RP-HPLC führte die 2D-RP-HPLC (1. Dimension sauer, 2. Dimension alkalisch) zu einer enormen Erhöhung der Trennleistung.

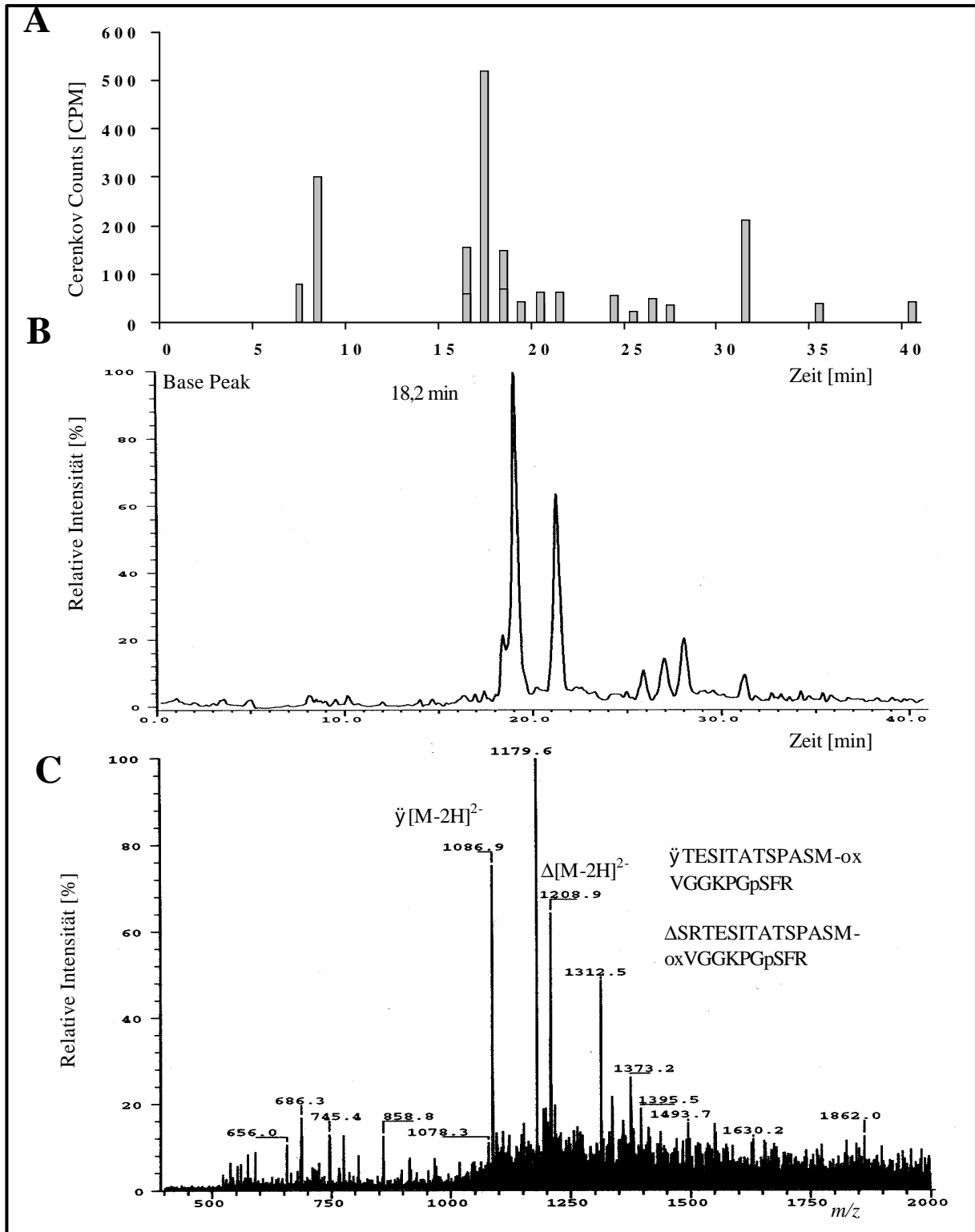


Abb. 5.86. μ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) von Fraktion F35, welche bei der TFA-sauren RP-HPLC-Trennung des tryptisch gespaltenen GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins ('in vitro' mit

PKC- ζ phosphoryliert) bei einer Retentionszeit von etwa 35 min fraktioniert wurde (Abb. 5.85). (A) Off-line-ermitteltes Cerenkov-Chromatogramm der gesammelten Fraktionen. (B) Negativ-Ionen- μ LC/ESI-MS-Base-Peak-Chromatogramm. (C) Über den BPC bei $R_t = 18,2$ min aufsummiertes negativ-Ionen-ESI-Massenspektrum mit Zuordnung der Phosphopeptide: T^{300} ESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR 320 : $[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1086,9; S^{298} RTESITATSPA-SM-oxVGGKPGpSFR 320 : $[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1208,9. Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm \times 300 μ m (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); Flussrate 4 μ l \cdot min $^{-1}$; Elutionsmittel: System A: 5 % ACN in Wasser, pH 10,5 (NH_3); System B: 80 % ACN in Wasser, pH 10,5 (NH_3); Gradient: 0-40 min 80 % B; Verbindungen und Probensplit: 75 μ m I.D. (365 μ m O.D.) f.s.-Kapillaren; Sheath-Flüssigkeit: 1 μ l \cdot min $^{-1}$ MeOH (Spritzenpumpe) zugemischt über T-Stück; Fraktionierung: aufteilen des Eluates über Titan-Mikro-T-Stück (3,3 μ l \cdot min $^{-1}$ fraktioniert, 1,7 μ l \cdot min $^{-1}$ on-line ins MS); ESI: negativ-Ionenmodus; +1 kV ESI-Spannung (Erdung über Titan-Mikro-T-Stück); Spray-Tips: unbeschichtete PicoTip (f.s. 75 μ m I.D., 360 μ m O.D., 30 \pm 2 μ m Spitze an der Öffnung); Q1-Scan im Bereich von 400-2000 m/z in 3 sec; Radioaktivitäten: Fraktionen 3 min im Cerenkov-Counter.

Abbildung 5.86.A zeigt das Cerenkov-Chromatogramm der Analyse von Fraktion F35, welche bei der RP-HPLC-Trennung des tryptisch gespaltenen GST-IRS-1 Nk -Fusionsproteins ('in vitro' mit PKC- ζ phosphoryliert) erhalten wurde (Abb. 5.85). Das intensive Signal bei $R_t = 18$ min lässt deutlich erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt [^{32}P]-haltige Peptide eluierten. Das entsprechende BPC-Signal konnte durch Überlagerung der Cerenkov-Spur (phosphorylierungsspezifische Markerspur) mit dem μ LC/ESI-MS-Base-Peak-Chromatogramm (Abb. 5.86.B) ermittelt werden. Die [^{32}P]-haltigen Phosphopeptide erzeugten im BPC bei R_t 19 min ebenfalls ein intensives Signal (1 min Verzögerung im Vergleich zum Cerenkov-Peak). Abbildung 5.86.C zeigt das über das BPC-Signal ($R_t = 19$ min) aufsummierte negativ-Ionen-ESI-Massenspektrum. Das einfach-Serin-phosphorylierte sowie Methionin-oxidierte Peptid T^{300} ESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR 320 (M_w 2177,0 Da) konnte anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimoleküliions bei m/z 1086,9 identifiziert werden. Des Weiteren konnte das entsprechende, einfach-fehlgeschnittene (N-terminal zusätzlich vorhandene Aminosäuren S und R) Serin-phosphorylierte sowie Methionin-oxidierte Peptid S^{298} RTESITATSPASMOxVGGK-PGpSFR 320 (M_w 2420,1 Da) anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimoleküliions bei m/z 1208,9 identifiziert werden. Die massenspektrometrische Detektion der Phosphopeptide war nur mit Hilfe der sehr empfindlichen Mikro-Spray-Anordnung in Kombination mit der alkalischen LC durchführbar. Die UV-Signale der heißen Fraktionen F35 und F38 waren gegenüber den restlichen UV-Signalen nur sehr wenig intensiv (Abb. 5.85). Die Phosphopeptide lagen daher nur sehr gering konzentriert vor. Durch das verwendete T-Stück wurden lediglich 1,7 μ l \cdot min $^{-1}$ des Säuleneluats ins MS-Gerät infundiert, der Rest (3,3 μ l \cdot min $^{-1}$) wurde fraktioniert. Zur Erlangung optimaler Spray-Bedingungen wurde der Mikro-Tip mit Hilfe einer xyz-Positionierungseinrichtung direkt vor dem MS-Orifice positioniert (Abb. 5.84). Die Empfindlichkeit bzw. die Effizienz des Elektrosprays konnte gegenüber der Standard-ESI-Quelle (Finnigan) erheblich verbessert werden. Für die erfolgreiche Analyse war neben der Mikro-Spray-Anordnung zusätzlich die alkalische LC verantwortlich. Durch die alkalische Elution konnten die in den untersuchten Fraktionen enthaltenen Peptide deutlich voneinander getrennt werden. Zudem wurde die Ionisierung der Phosphopeptide erheblich verbessert. Unter den alkalischen Bedingungen sind die Phosphopeptide weitgehend deprotoniert und weisen deshalb im negativ-Ionenmodus eine relativ hohe Oberflächenaktivität in den ESI-Tröpfchen auf. Gleichzeitig führten die Bedingungen dazu, dass die Ionisierung stark basischer, nicht-phosphorylierter Peptide erheblich unterdrückt wurde. Das hervorragende S/N-Verhältnis, welches im negativ-Ionen- μ ESI-Massenspektrum (Abb. 5.87.C) beobachtet werden konnte, bestätigte eindrucksvoll die

effiziente Ionisierung. Mit Hilfe eines TFA-sauren positiv-Ionen- μ LC/ESI-MS-Experimentes konnten die Phosphopeptide aufgrund der Unterdrückung der Phosphopeptidionen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

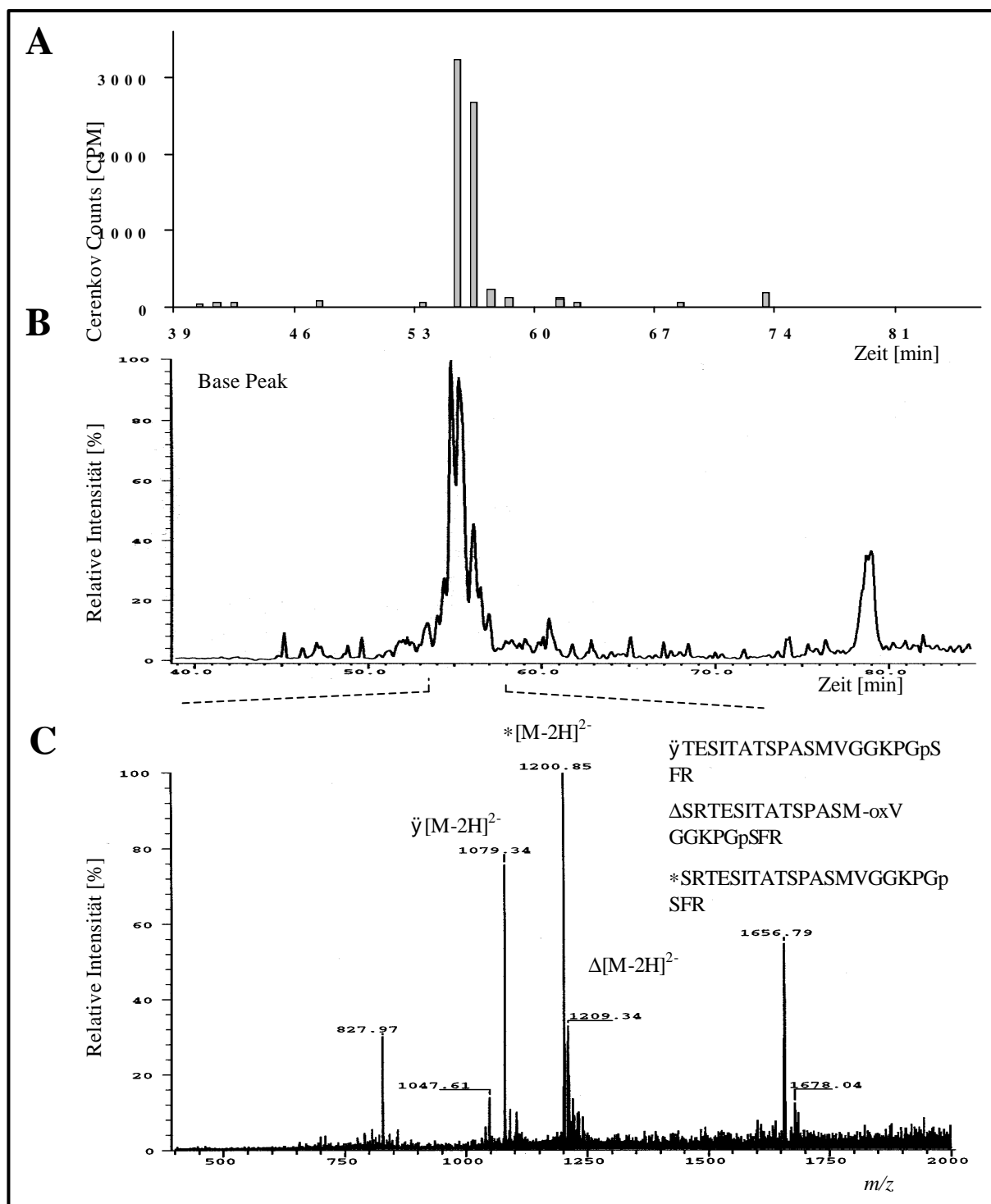


Abb. 5.87. μ LC/ESI-MS-Analyse (TSQ 700) von Fraktion F38, welche bei der TFA-sauren RP-HPLC-Trennung des tryptisch gespaltenen GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins ('in vitro' mit PKC- α phosphoryliert) bei einer Retentionszeit von etwa 38 min fraktioniert wurde (Abb. 5.85). (A) Off-line-ermitteltes Cerenkov-Chromatogramm der gesammelten Fraktionen. (B) Negativ-Ionen- μ LC/ESI-MS-Base-Peak-Chromatogramm. (C) Über den BPC ($R_t = 55,0$ min)

aufsummiertes negativ-Ionen-ESI-Massenspektrum mit Zuordnung der Phosphopeptide: T^{300} ESITATSPAS-MVGGKPGpSFR³²⁰: $[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1079,3; S^{298} RTESITATSPASMVG-GKPGpSFR³²⁰: $[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1200,9; S^{298} RTESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR³²⁰ bei m/z 1209,3 $[M-2H]^{2-}$. Bedingungen siehe Abb. 5.86. Die verspätete Retention der Peptide im Vergleich zu Abb. 5.86 erfolgte aufgrund von Druckproblemen während des μ LC/ESI-MS-Experimentes.

Abbildung 5.87.A zeigt das Cerenkov-Chromatogramm der Analyse von Fraktion F38, welche bei der RP-HPLC-Trennung des tryptisch gespaltenen GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins (*in vitro* mit PKC- ζ phosphoryliert) erhalten wurde (Abb. 5.85). Das intensive Signal bei R_t 55,0 min lässt deutlich erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt [³²P]-haltige Peptide eluierten. Die [³²P]-haltigen Phosphopeptide erzeugten im BPC bei $R_t = 55$ min ebenfalls ein intensives Signal (Abb. 5.87.B). Durch die Überlagerung der beiden Spuren konnten die Signale eindeutig einander zugeordnet werden. Abbildung 5.87.C zeigt das negativ-Ionen-ESI-Massenspektrum, welches über das BPC-Signal ($R_t = 55$ min) aufsummiert wurde. Das einfach-Serin-phosphorylierte sowie Methionin-oxidierte Peptid T^{300} ESITATSPASMVGG-KPGpSFR³²⁰ (M_w 2160,0 Da) konnte anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimoleküls bei m/z 1079,3 identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um das nicht Methionin-oxidierte Phosphopeptid, das in F35 identifiziert wurde. Des weiteren konnte das entsprechende, einfach-geknippte (N-terminal zusätzlich vorhandene Aminosäuren S und R) Serin-phosphorylierte Peptid S^{298} RTESITATSPASMVGGKPGpSFR³²⁰ (M_w 2403,1 Da) anhand seines $[M-2H]^{2-}$ -Quasimoleküls bei m/z 1200,9 identifiziert werden.

5.11.5. Detektion der tryptischen Phosphopeptide des *in vitro* mit PKC- β I umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins

5.11.5.1.LC-Trennung und Fraktionierung des tryptisch gespaltenen Fusionsproteins

Die Analyse der Phosphopeptide des tryptisch verdauten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins, welches *in vitro* mit PKC- β I phosphoryliert wurde, erfolgte entsprechend Kap. 5.11.4 (Analyse des *in vitro* mit PKC- ζ phosphorylierten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins).

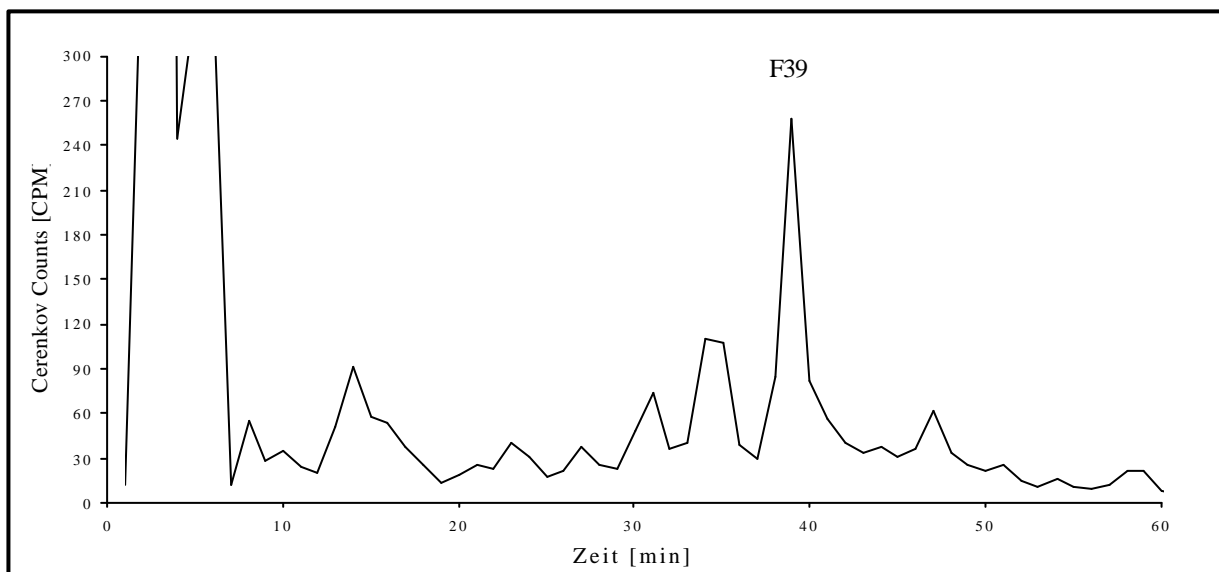


Abb. 5.88. Cerenkov-Chromatogramm (³²P-Spur) der tryptischen Peptide des im Gel verdauten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins, welches *in vitro* mit PKC- β I phosphoryliert wurde.

Zur Erstellung des Cerenkov-Chromatogramms wurde das Säuleneluat fraktioniert gesammelt (jeweils 1 min). Die Radioaktivitäten wurden off-line mit Hilfe eines Cerenkov-Counters bestimmt (jeweils 1 min). Fraktion F39 (intensives Signal im Cerenkov-Chromatogramm) wurde entsprechend seiner Elutionszeit ($R_t = 39$ min) gekennzeichnet. Bedingungen: C18 RP-Säule 10 cm x 1 mm I.D. (Pharmacia Biotech); Flussrate $200 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$; Elutionsmittel: System A: 0,05 % TFA in Wasser; System B: 80 % ACN, 0,05 % TFA in Wasser; Gradient: 0-10 min 0 % B, 10-60 min 40 % B, 60-90 min 100 % B.

Abbildung 5.88 zeigt das Cerenkov-Chromatogramm, welches bei der RP-HPLC-Trennung des tryptisch im Gel gespaltenen GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins erhalten wurde. Vor der enzymatischen Spaltung wurde das Fusionsprotein in Anwesenheit von [$g\text{-}^{32}\text{P}$]ATP 'in vitro' durch PKC- β I phosphoryliert. Das Signal bei $R_t = 39$ min lässt deutlich zu erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt phosphorylierte Peptide eluierten. Für die weiteren Analysen wurden die Fraktionen F39 und F40 gemischt und entsprechend Kap. 5.11.4 mit Hilfe eines $\mu\text{LC/ESI-MS}$ -Experimentes analysiert.

5.11.5.2. $\mu\text{LC/MikroESI-MS}$ -Analyse und Fraktionierung der Phosphopeptide

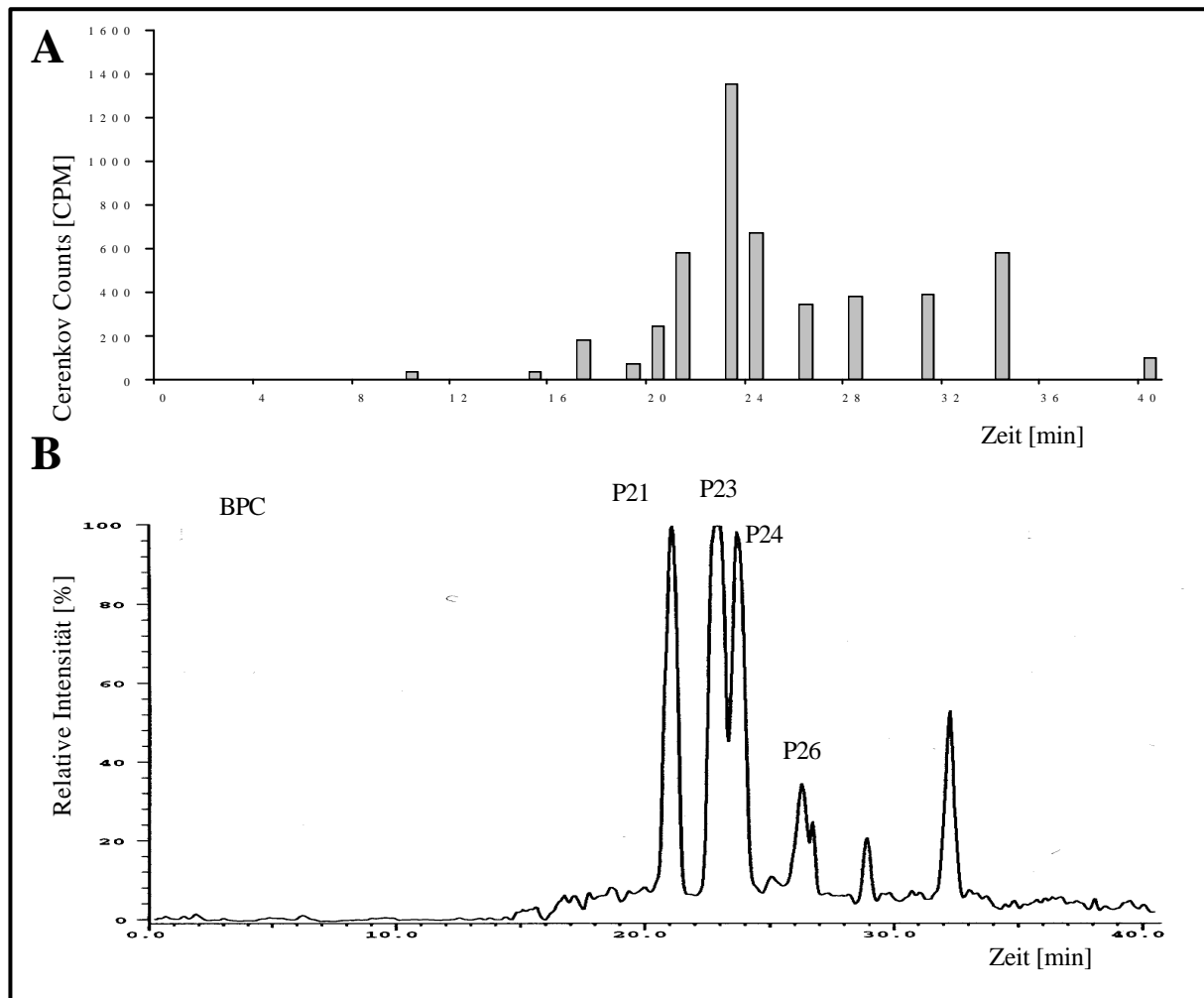


Abb. 5.89. $\mu\text{LC/ESI-MS}$ -Analyse (TSQ 700) von Fraktion F39, welche bei der TFA-sauren RP-HPLC-Trennung des tryptisch gespaltenen GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins ('in vitro' mit PKC- β I phosphoryliert) bei einer Retentionszeit von etwa 39 min fraktioniert wurde (Abb. 5.88). (A) Off-line-ermitteltes Cerenkov-Chromatogramm der gesammelten Fraktionen. (B)

Negativ-Ionen- μ LC/ESI-MS-Base-Peak-Chromatogramm. Die radioaktiven Signale wurden entsprechend ihren Retentionszeiten als P21, P23, P24 sowie P26 bezeichnet. Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μ m (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); Flussrate 4 μ l \cdot min $^{-1}$; Elutionsmittel: System A: 5 % ACN in Wasser, pH 10,5 (NH_3); System B: 80 % ACN in Wasser, pH 10,5 (NH_3); Gradient: 0-40 min 80 % B; Verbindungen und Probensplit: 75 μ m I.D. (365 μ m O.D.) f.s.-Kapillaren; Sheath-Flüssigkeit: 1 μ l \cdot min $^{-1}$ MeOH (Spritzenpumpe) zugemischt über T-Stück; Fraktionierung: aufteilen des Eluates über Titan-Mikro-T-Stück (3,3 μ l \cdot min $^{-1}$ fraktioniert, 1,7 μ l \cdot min $^{-1}$ on-line ins MS); ESI: negativ-Ionenmodus; +1 kV ESI-Spannung (Erdung über Titan-Mikro-T-Stück); Spray-Tips: unbeschichtete PicoTip (f.s. 75 μ m I.D., 360 μ m O.D., 30 \pm 2 μ m Spitze an der Öffnung); Q1-Scan im Bereich von 400-2000 m/z in 3 sec; Radioaktivitäten: Fraktionen 3 min im Cerenkov-Counter.

Abbildung 5.89.A zeigt das Cerenkov-Chromatogramm der Analyse von Fraktion F39 welche bei der RP-HPLC-Trennung des tryptisch gespaltenen GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins (*in vitro* mit PKC- β I phosphoryliert) erhalten wurde (Abb. 5.88). Die intensiven Signale im Retentionszeitbereich zwischen 20 und 26 min lassen deutlich erkennen, dass zu diesen Zeitpunkten [³²P]-haltige Peptide eluierten. Die [³²P]-haltigen Phosphopeptide erzeugten im BPC bei den identischen Retentionszeiten ebenfalls intensive Signale (Abb. 5.89.B). Die Signale konnten durch die Überlagerung der beiden Spuren eindeutig einander zugeordnet werden. Die radioaktiven Signale wurden entsprechend ihren Retentionszeiten als P21, P23, P24 sowie P26 bezeichnet. Abbildung 5.90 zeigt die negativ-Ionen-ESI-Massenspektren, welche über die BPC-Signale von P21, P23, P24 und P26 aufsummiert wurden. Das einfach-phosphorylierte sowie Methionin-oxidierte Peptid T³⁰⁰ESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR³²⁰ konnte anhand seines [M-2H]²⁻-Quasimolekülions bei m/z 1086,9 (P21) und das entsprechende nicht Methionin-oxidierte Phosphopeptid durch sein [M-2H]²⁻-Quasimolekülion bei m/z 1079,3 (P23) identifiziert werden. Die beiden entsprechenden einfach-geknippten Phosphopeptide S²⁹⁸RTESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR³²⁰ und S²⁹⁸RTESITATSPASMVGGKPGpSFR³²⁰ wurden durch ihre [M-2H]²⁻-Quasimolekülionen bei m/z 1209,3 bzw. m/z 1200,9 (P23, P24 und P26) identifiziert. Es konnten somit die identischen Phosphopeptide, welche schon bei der Analyse des PKC- ζ phosphorylierten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins gefunden wurden (Kap. 5.11.4), detektiert werden. Betrachtet man die Elutionsabfolge der Phosphopeptide so fällt auf, dass zuerst die korrekt geschnittenen Phosphopeptide (T³⁰⁰-R³²⁰) eluierten. Das Methionin-oxidierte Phosphopeptid (R_t = 21 min) eluierte aufgrund seiner höheren Polarität vor dem entsprechenden nicht-oxidierten Phosphopeptid (R_t = 23 min). Die einfach-geknippten Phosphopeptide (S²⁹⁸-R³²⁰) eluierten zu einem späteren Zeitpunkt. Zuerst eluierte ebenfalls das Methionin-oxidierte Phosphopeptid (R_t = 24 min), dann das entsprechende nicht Methionin-oxidierte (R_t = 26 min). Betrachtet man die Intensitäten der Phosphopeptidionen, so ist klar zu erkennen, dass das Phosphopeptid P23 T³⁰⁰ESITATSPASMVGGKPGpSFR³²⁰ (M_w 2160,0 Da) sowohl im *Base-Peak*-Chromatogramm (Abb. 5.89.B) als auch im Cerenkov-Chromatogramm das intensivste Signal erzeugte (Abb. 5.89.A). Die S/N-Verhältnisse der [M-2H]²⁻-Phosphopeptidion (ESI-Massenspektren, Abb. 5.90) wurden ebenfalls verglichen. Das höchste S/N-Verhältnis (etwa 90) hatte dabei das Phosphopeptid in Fraktion P23. In Tabelle 5.14 sind die beobachteten absoluten und relativen Intensitäten der ermittelten [M-2H]²⁻-Phosphopeptidionen aufgelistet. Die relativen Intensitäten der [M-2H]²⁻-Phosphopeptidionen entsprechen sehr genau den Signal-Intensitäten, die diese im *Base-Peak*-Chromatogramm erzeugten (Abb. 5.89.B). Insgesamt wurde die Analyse durch das Auftreten unvollständiger bzw. unkorrekter enzymatischer Umsetzung und durch Modifikationen (Oxidation von Methionin) erheblich erschwert. Die Phosphorylierungsstelle findet sich somit nicht in einem

einzelnen Peptid wieder, sondern verteilt sich auf mehrere Peptide. Bei den vorliegenden Experimenten konnten dennoch die unterschiedlich gespaltenen und/oder modifizierten Phosphopeptide, welche alle einer einzigen Proteinphosphorylierung zuzuordnen sind, detektiert werden. Dies unterstreicht eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit der hier entwickelten analytischen Methode.

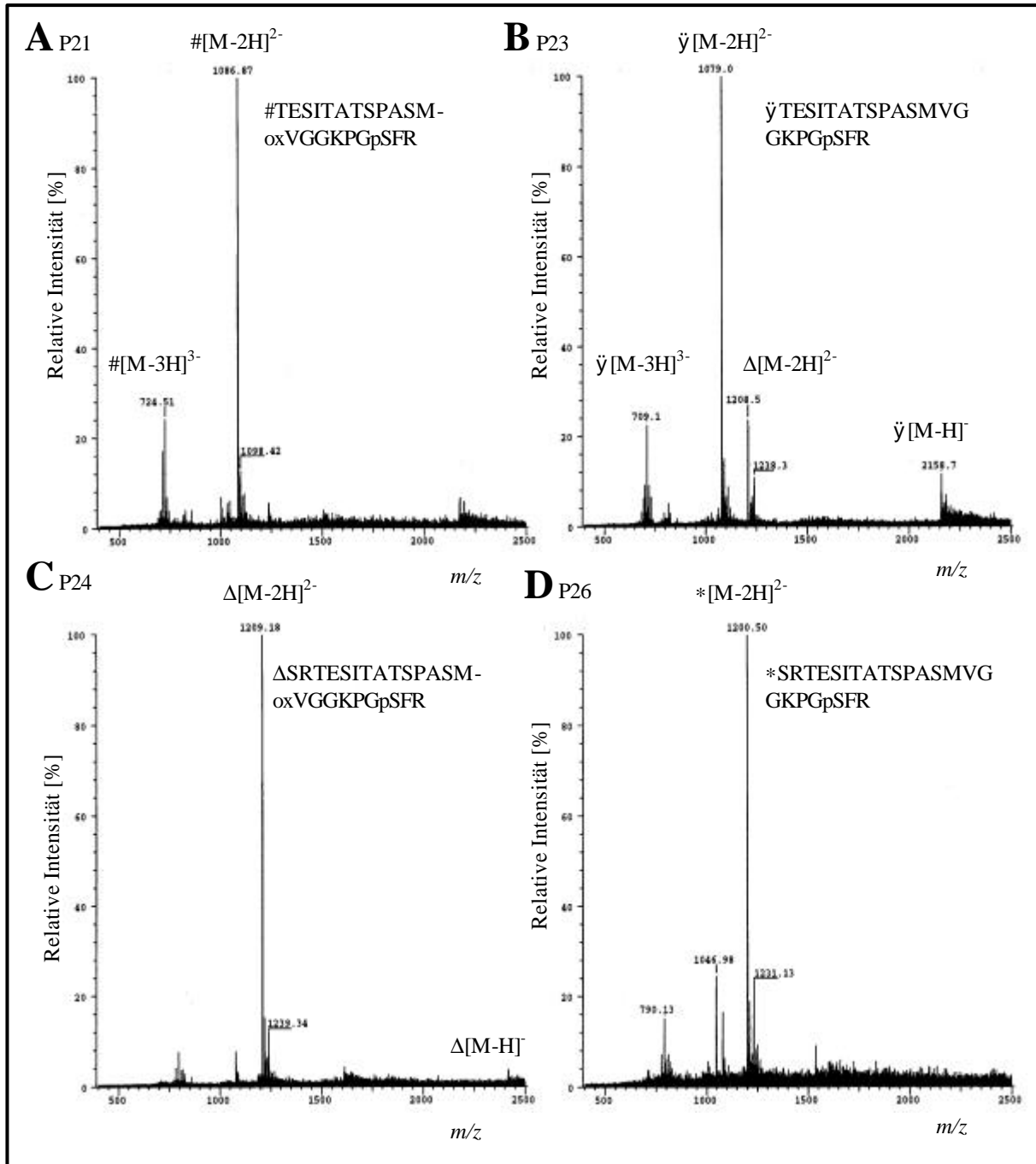


Abb. 5.90. Über die BPC-Signale (Abb. 5.89) P21 (A) P23 (B) P24 (C) und P26 (D) aufsummierte negativ-Ionen- μ LC/ESI-Massenspektren (TSQ 700) der Phosphopeptide von Fraktion F39, die bei der TFA-sauren RP-HPLC-Trennung des tryptisch gespaltenen GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins ('in vitro' mit PKC- β I phosphoryliert) bei einer Retentionszeit von etwa 39 min fraktioniert wurde Zuordnung der Phosphopeptide: T³⁰⁰ESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR³²⁰: $\#[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1086,9; T³⁰⁰ESITATSPASMVGKPGpSFR³²⁰:

$\ddot{y}[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1079,3; $S^{298}RTESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR^{320}$: $*[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1209,3; $S^{298}RTESITATSPASMVGGKPGpSFR^{320}$: $D[M-2H]^{2-}$ bei m/z 1200,9. Bedingungen: TSK Gel Super-ODS 120 mm x 300 μ m (C_{18}) RP-Kapillarsäule (Grom, Herrenberg); Flussrate 4 μ l \cdot min $^{-1}$; Elutionsmittel: System A: 5 % ACN in Wasser, pH 10,5 (NH_3); System B: 80 % ACN in Wasser, pH 10,5 (NH_3); Gradient: 0-40 min 80 % B; Verbindungen und Probensplit: 75 μ m I.D. (365 μ m O.D.) f.s.-Kapillaren; Sheath-Flüssigkeit: 1 μ l \cdot min $^{-1}$ MeOH (Spritzenpumpe) zugemischt über T-Stück; Fraktionierung: aufteilen des Eluates über Titan-Mikro-T-Stück (3,3 μ l \cdot min $^{-1}$ fraktioniert, 1,7 μ l \cdot min $^{-1}$ on-line ins MS); ESI: negativ-Ionenmodus; +1 kV ESI-Spannung (Erdung über Titan-Mikro-T-Stück); Spray-Tips: unbeschichtete PicoTip (f.s. 75 μ m I.D., 360 μ m O.D., 30 \pm 2 μ m Spitze an der Öffnung); Q1-Scan im Bereich von 400-2000 m/z in 3 sec; Radioaktivitäten: Fraktionen 3 min im Cerenkov-Counter.

Tab. 5.14. Intensitäten der $[M-2H]^{2-}$ -Phosphopeptidionen aus Abb. 5.90. Die absoluten Intensitäten wurden aufsummiert und daraus die relativen Intensitäten der einzelnen Phosphopeptide berechnet.

R_t [min]	Peptidsequenzen	m/z $[M-2H]^{2-}$	absolute Intensität	relative Intensität [%]
21	$T^{300}ESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR^{320}$	1086,9	$1,5 \cdot 10^8$	25,3
23	$T^{300}ESITATSPASMV-GGKPGpSFR^{320}$	1079,0	$2,1 \cdot 10^8$	35,5
24	$S^{298}RTESITATSPASM-oxVGGKPGpSFR^{320}$	1209,2	$1,6 \cdot 10^8$	27,0
26	$S^{298}RTESITATSPASMVGKPGpSFR^{320}$	1200,5	$0,72 \cdot 10^8$	12,2

5.11.6. Off-line-NanoES-MS³-Analyse der tryptischen Phosphopeptide des 'in vitro' mit PKC- β I umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins mittels Ionenfallen-MS

Zur genauen Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle wurden die Phosphopeptide unter CID-Bedingungen fragmentiert. Die off-line-NanoES-MS²- bzw. -NanoES-MS³-Analysen wurden mit einem Ionenfallen-MS (Esquire3000+, Firma Bruker-Daltonics in Bremen) durchgeführt. Für die MS-Experimente wurden die Phosphopeptid-haltigen Fraktionen P21 und P23 jeweils in 3 μ l 50 % MeOH, 5 % Ameisensäure (v/v) gelöst.

5.11.6.1. Sequenzierung mit dem Ionenfallen-Massenspektrometer

In den folgenden Experimenten wurden die in Fraktion P23 und P21 (Abb. 5.89) detektierten Phosphopeptide mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker-Daltonics, Bremen) sequenziert. Bei den positiv-Ionen-off-line-NanoES-MS³-Experimenten wurden die entsprechenden $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Molekülonen zuerst in der Ionenfalle isoliert und dann durch Anlegen eines Spannungs-Offsets fragmentiert. Aufgrund der β -Eliminierung von Phosphorsäure kam es zur Bildung intensiver $[M-H_3PO_4+2H]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmention (49 Th Abstand zum isolierten Elternion). In einem zweiten Schritt wurden diese Fragmentionen wiederum in der Ionenfalle isoliert und ein weiteres mal fragmentiert. Unter Berücksichtigung des infolge der Gasphasenphosphorylierung gebildeten Dehydroalanins (69

Da) konnte die Position der Phosphorylierungsstelle schließlich anhand der resultierenden b- und y-Fragmentationen bestimmt werden.

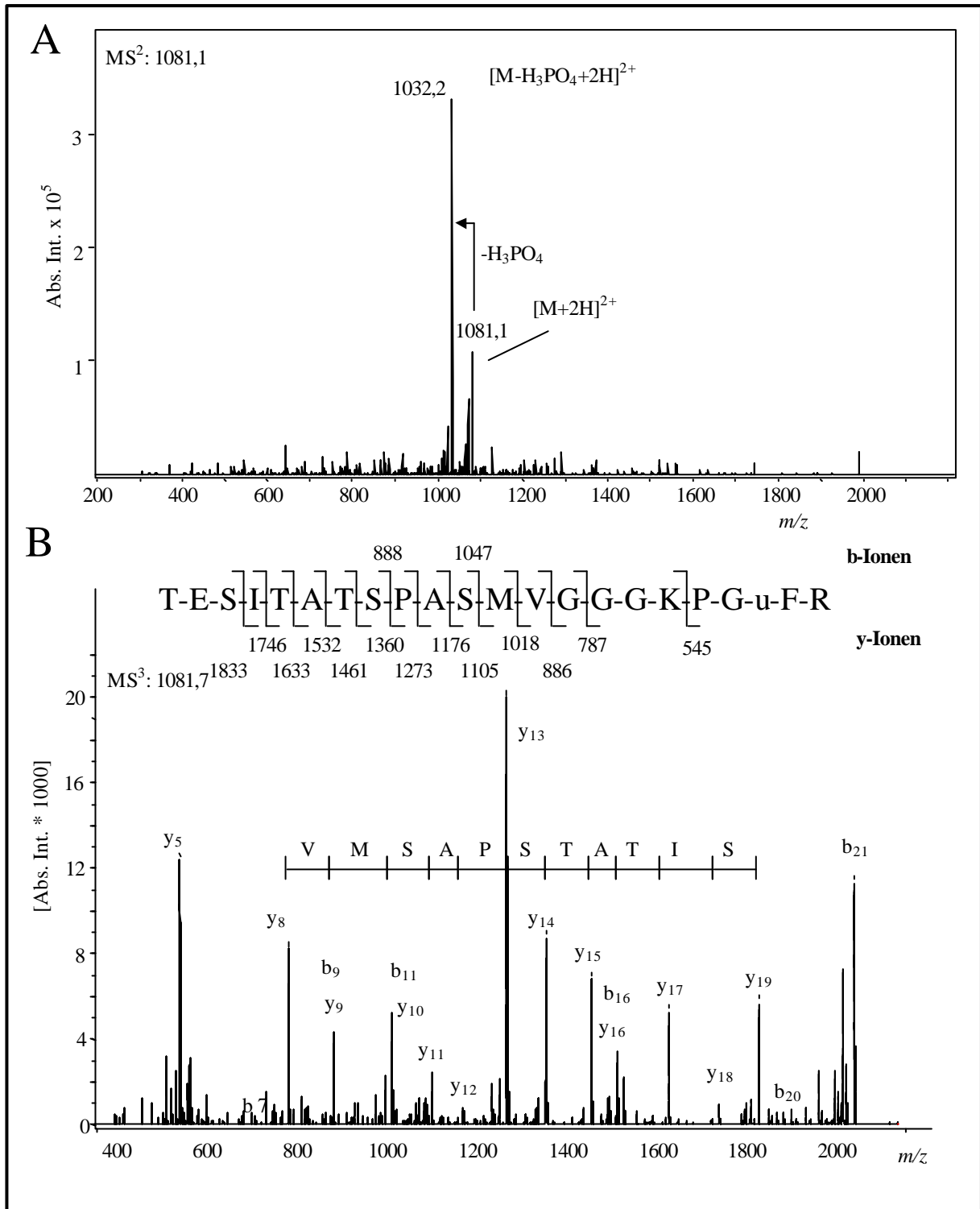


Abb. 5.91. Positiv-Ionen-off-line-NanoES-IT-MS³-Experiment (Esquire3000+ Ionenfallen-MS) zur Lokalisierung der phosphorylierten Aminosäure des Peptids T³⁰⁰ESITA-TSPASMVGGKPGpSFR³²⁰ (Peak P23, Abb. 5.89). (A) MS²-Experiment auf m/z 1081,3 ([M+2H]²⁺-Quasimolekülion). (B) MS³-Experiment auf m/z 1032,2 ([M-H₃PO₄+2H]²⁺-Neutralverlust-Fragmention). Die b- und y-Fragmentationen wurden gekennzeichnet. Sequenz

des Gasphasen-dephosphorylierten Peptids: $T^{300}ESITATSPASMVGGKPGuFR^{320}$; u: Dehydroalanin (C_3H_3NO , 69 Da). Für die Analyse wurde die Probe in $3 \mu\text{l}$ 50 % ACN, 5 % Ameisensäure (v/v) gelöst.

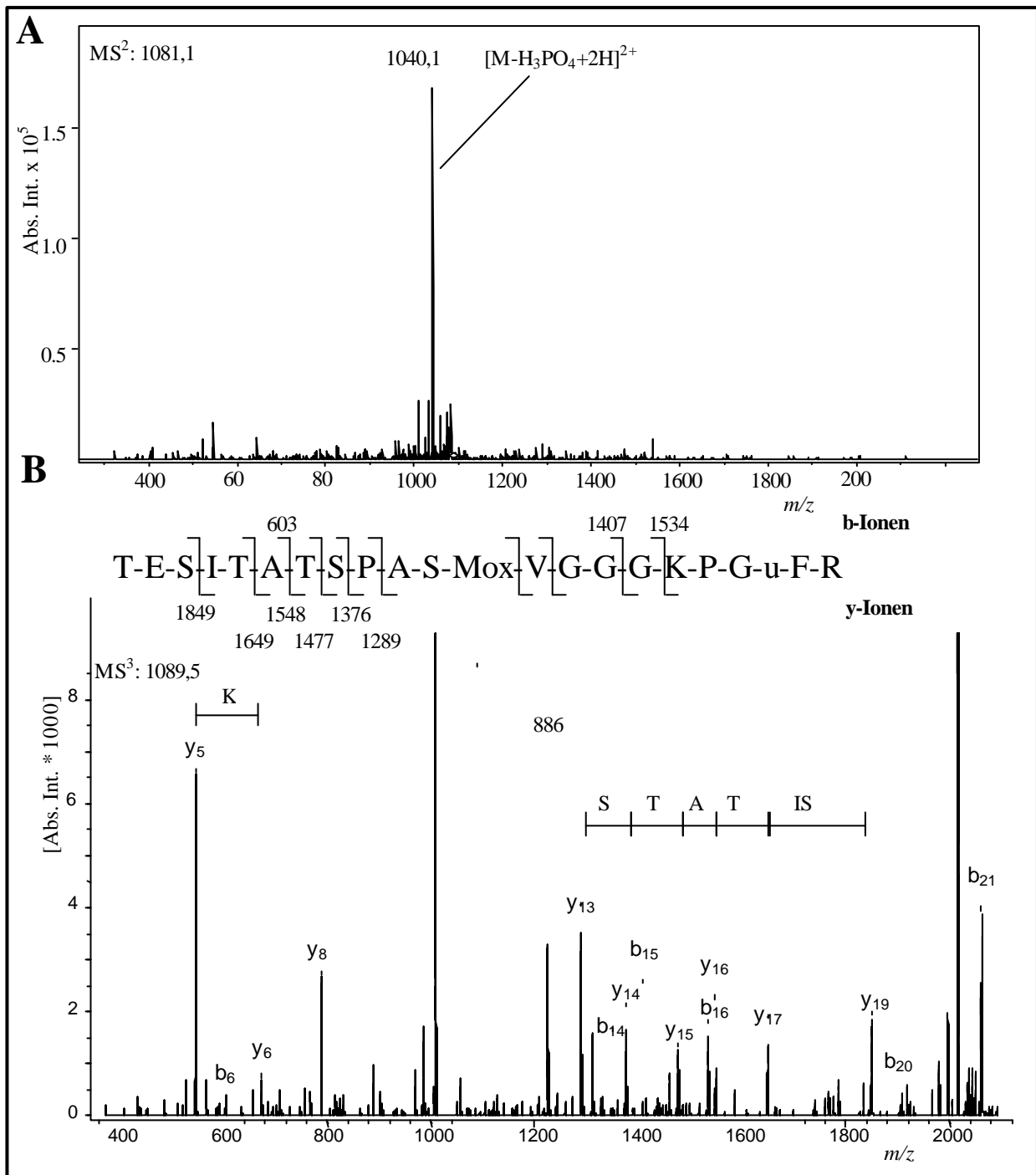


Abb. 5.92. Positiv-Ionen-off-line-NanoES-IT-MS³-Experiment (Esquire3000+ Ionenfallen-MS) zur Lokalisierung der phosphorylierten Aminosäure des Peptids $T^{300}ESITATSPASMoxVGGKPGpSFR^{320}$ (Peak P21, Abb. 5.89). (A) MS²-Experiment auf m/z 1089,5 ($[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülion). (B) MS³-Experiment auf m/z 1040,2 ($[M-H_3PO_4+2H]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentation). Die b- und y-Fragmentationen wurden gekennzeichnet. Sequenz des Gasphasen-dephosphorylierten Peptids: $T^{300}ESITATSPASMoxVGGKPGuFR^{320}$; u:

Dehydroalanin (C_3H_3NO , 69 Da). Für die Analyse wurde die Probe in 3 μ l 50 % ACN, 5 % Ameisensäure (v/v) gelöst.

In Abbildung 5.91 und 5.92 sind die *off-line*-NanoES-MS²- und -MS³-Spektren zu sehen, welche bei der Sequenzanalyse der beiden Phosphopeptide T³⁰⁰ESITATSPA-SMVGGKPGpSFR³²⁰ ([M+2H]²⁺ bei m/z 1081,3, Fraktion P23) und T³⁰⁰ESITATSPASMOxVGGKPGpSFR³²⁰ ([M+2H]²⁺ bei m/z 1089,5, Fraktion P21) aufgezeichnet wurden (Esquire300+ Ionenfallen-MS). Die entsprechenden y- und b-Typ-Fragmentationen sind ebenfalls abgebildet. Bei der Analyse von Fraktion P23 (Abb. 5.89) wurde das [M+2H]²⁺-Quasimolekülion bei m/z 1081,3 zunächst in der Ionenfalle isoliert und anschließend mit Hilfe eines Spannungs-Offsets (Resonanzfrequenz-Anregung) fragmentiert (MS², Abb. 5.91.A). Aufgrund der β -Eliminierung der Phosphatgruppe bildete sich das intensive [M-H₃PO₄+2H]²⁺-Neutralverlust-Fragmentation bei m/z 1032,2 (Abb. 5.91.A). Infolge der Eliminierung der Phosphatgruppe (H₃PO₄) wurde der Phosphoserinrest in einen Dehydroalaninrest (C₃H₃NO, 69 Da) umgewandelt. Das Neutralverlust-Fragmentation wurde wiederum in der Falle isoliert und einem weiteren CID unterzogen (MS³, Abb. 5.91.B). Bei der kollisionsaktivierten Fragmentierung des Gasphasen-dephosphorylierten Peptidions konnte eine nahezu vollständige y-Typ-Fragmentationenserie beobachtet werden. Die MS³-Sequenzierung des entsprechenden Methionin-oxidierten Phosphopeptids (Fraktion P21) erfolgte entsprechend (Abb. 5.92). Bei den MS³-Ionenfallen-Experimenten (Abb. 5.91 und 5.92) konnte im Vergleich zu den MS²-Triple-Quad-Experimenten (Daten nicht gezeigt) eine vollständigere und intensivere Fragmentationbildung beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der gebildeten Dehydroalaninrestes konnte die Position der Phosphorylierungsstelle an Serinrest 318 (Position in IRS-1) lokalisiert werden.

5.11.6.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das GTS-IRS-1^{Nk}-Fusionsprotein wurde bei der *in vitro*-Umsetzung mit PKC- β I und PKC- ζ jeweils an Serinrest 318 (Position in IRS-1) phosphoryliert.

6. Diskussion

6.1. Verdau im Gel

Die moderne Proteom-Forschung basiert zu einem großen Teil auf der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen [6,7]. Bei dem Ausgangsmaterial handelt es sich in der Regel um komplex zusammengesetzte Proteinmischungen (Zellen, Gewebe usw.), die vor ihrer Analyse zunächst aufgetrennt werden müssen. Nach wie vor ist die SDS-PAGE das effektivste Verfahren zur Trennung komplexer Proteinmischungen. Zur Identifizierung und Charakterisierung der Proteine müssen diese aus der Gelmatrix entfernt werden. Ganze Proteine lassen sich nur sehr schlecht aus dem Gel isolieren, wogegen Peptide sehr leicht eluiert werden können [178]. Deshalb spaltet man die Proteine zunächst mit Hilfe spezifischer Proteasen im Gel und eluiert anschließend die resultierenden Peptide aus der Gelmatrix [36,136-139,159]. Die Peptidmassen werden danach mittels ESI- oder MALDI-MS bestimmt (Kap. 2.1 u. 2.3) und die Proteine mit Hilfe moderner Computeralgorithmen basierend auf Protein- bzw. DNA-Sequenzdatenbanken identifiziert bzw. charakterisiert (Kap. 2.4). Bei der MS-basierenden Identifizierung und Charakterisierung im Gel verdauter Proteine ist das S/N-Verhältnis besonders wichtig [179]. Für empfindliche Analysen müssen die Proteine optimal verdaut, die Peptide quantitativ aus dem Gel isoliert und der chemische Untergrund niedrig gehalten werden [179]. Die in dieser Arbeit entwickelte im Gel-Verdaumethode wurde mittels *'in vivo'*- ^{32}P -radioaktiv markierter HIR- β -UE überprüft (Kap. 5.1.1). Zur Minimierung des chemischen Untergrundes wurden die Proteinbanden entsprechend Cohen und Chait sehr eng ausgeschnitten [178]. Zur Vermeidung von Keratin-Verunreinigungen wurde mit Einweghandschuhen gearbeitet [542,545]. Durch das ausgiebige Spülen der in etwa 1 mm³ große Würfel zerschnittenen Gelstücke (erster Schritt des im Gel-Verdaus) verringerte sich die in den Gelstückchen enthaltene Radioaktivität um durchschnittlich 51,1 % (Kap. 4.3.2.3). Dies ist nicht auf einen hohen Proteinverlust, sondern auf das Auswaschen niedermolekularer Bestandteile, unter anderem von Salzen (auch nicht umgesetztes ^{32}P Orthophosphat) SDS und CBB zurückzuführen. Nach Rosenfeld *et al.* müssen insbesondere CBB und SDS vollständig entfernt werden, da diese ansonsten die enzymatische Spaltung beeinträchtigen [190]. Beim zweiten Schritt des im Gel-Verdaus (Kap. 4.3.2.3) wurden die Proteine reduziert (DTT) und alkyliert (4-Vinylpyridin). Trotz ausgiebigen Spülens verringerte sich die Radioaktivität nur um durchschnittlich 15,2 % (Abb. 5.1.B). Proteine, die Disulfidbrücken enthalten, müssen vor ihrer enzymatischen Spaltung reduziert werden, da sich ansonsten über Disulfidbrücken verbundene komplexe Peptidfragmente bilden. Zudem verringert sich die Peptidausbeute, da nicht alle Bereiche des Proteins für die Protease zugänglich sind [165]. Die reduzierten Cysteinreste wurden mit 4-Vinylpyridin alkyliert (Abb. 5.2). Nicht-modifizierte Cysteinreste sind stark nukleophil und können durch ein Vielzahl von Reagenzien modifiziert werden (u.a. nicht-umgesetztes Acrylamid, Oxidation zum Sulfoxid oder zur Sulfonsäure, Tab. 2.2) [165]. Beim im Gel-Verdau einschließlich Reduktion und Alkylierung (4-Vinylpyridin) konnten Moritz *et al.* [176] und Tempst *et al.* [165], im Vergleich zum im Gel-Verdau ohne Reduktion und Alkylierung, nicht nur mehr sondern auch intensivere Signale im UV-Chromatogramm beobachten. Dies konnte bei der LC/ESI-MS-Untersuchung der tryptisch im Gel gespaltenen *'in vivo'*-Mutante der HIR- β -UE anhand der zahlreichen und intensiven Peaks im *on-line*-UV-Chromatogramm bestätigt werden (Abb. 5.4, Kap. 5.1.4). In den entsprechenden ESI-Massenspektren konnten zudem viele pyridylethylierte, cysteinhaltige tryptische Peptide detektiert werden (Tab. 5.1). Die Alkylierung mit 4-Vinylpyridin hat aber auch wichtige massenspektrometrische Vorteile. Pyridylethylerte Cysteinreste können aufgrund ihres stark basischen Charakters eine positive Ladung aufnehmen. Die pyridylethylerten, cysteinhaltigen Peptide bilden deshalb bei der positiv-

Ionen-ESI-MS bevorzugt zweifach-geladene Molekülonen aus [187]. Beim CID können diese im Vergleich zu den einfach-geladenen Molekülonen sehr viel effizienter fragmentiert werden (Kap. 2.4.4). Beim dritten Schritt des im Gel-Verdau wurden die Proteine enzymatisch gespalten (Kap. 4.3.2.3). Wie die Untersuchungen von Hellman *et al.* zeigten, können beim im Gel-Verdau 30-50 % der gesamten Peptide verloren werden, wenn die Gelstücke vor der Zugabe des proteasehaltigen Verdau-puffers nur teilweise dehydratisiert werden [182]. Da die Protease nur sehr langsam per Diffusion in die Gelmatrix gelangt, wurden die Gelstücke vor der Zugabe der Proteaselösung zunächst vollständig in der Vakuumzentrifuge dehydratisiert [190] und dann die trockenen Gelstückchen entsprechend Li *et al.* mit Proteaselösung vollständig rehydratisiert [573]. Zur Verhinderung der Autoprotolyse der Protease erfolgte die Rehydratisierung der Gelstücke etwa 20 min lang bei 4°C (Eisbad). Überschüssige Proteaselösung wurde anschließend entfernt und soviel proteasefreier Verdau-puffer zugegeben, dass die Gelstückchen mit Verdau-puffer vollständig bedeckt waren. Das Enzym-zu-Substrat-Verhältnis sollte optimal bemessen werden. Wird zu viel Protease verwendet, kommt es nach Fernandez *et al.* zu unspezifischen Schnitten; wird zu wenig Protease verwendet erfolgt partieller Verdau [189]. Die Proteasemenge wurde pro mm³-Gelstück eingesetzt (25 ng- μ l⁻¹ Protease im Verdau-puffer). Als Verdau-puffer wurde eine Lösung bestehend aus 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ (pH 8,0), 10 % ACN eingesetzt [181]. Gegenüber NH₄HCO₃ hat Tris-HCl den Vorteil, dass es eine höhere Pufferkapazität besitzt. Während des Verdau können somit stets optimale pH-Bedingungen gewährleistet werden. Die Ca-Ionen wurden zur Aktivierung des Trypsins zugesetzt. Die Verwendung von Trypsin hat mehrere Vorteile. Trypsin ist eine aggressive Protease, welche extrem spezifisch C-terminal von Lysin- und Argininresten schneidet [574]. Bei tryptischen Spaltungen erhält man deshalb hauptsächlich 800-2500 Da große Peptide, welche C-terminal basische Aminosäurenreste (K oder R) tragen. Tryptische Peptide können deshalb sehr gut positive Ladungen stabilisieren und erzeugen bei der positiv-Ionen ESI-MS vorwiegend zweifach-geladene Molekülonen, welche beim Niederenergie-CID sehr effizient fragmentiert werden können und hauptsächlich einfach geladene b- oder y-Typ-Fragmentationen ergeben [191]. Der Verdau erfolgte 16 Stunden lang bei einer Temperatur von 37°C. Während des Verdau verringerte sich die Radioaktivität um durchschnittlich 17,9 % (Abb. 5.1.C). Die Abnahme der Radioaktivität war nicht auf einen Peptidverlust, sondern auf die relativ kurze Halbwertszeit des [³²P]-Isotop von nur 14 Tagen zurückzuführen. Im letzten Schritt wurden die Peptide aus dem Gel isoliert. Zur Elution wurden Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität verwendet. Der letzte Elutionsschritt wurde zusätzlich im Ultraschallbad durchgeführt (Kap. 4.3.2.3) [575]. Im Durchschnitt konnten 85,4 % der Radioaktivität aus dem Gel eluiert werden (Abb. 5.3). Haynes *et al.* konnten bei ihren im Gel-Verdau-Experimenten 88 % der S³⁵-markierten Peptide aus dem Gel isolieren [179]. Bei großen Proteinmengen können etwa 70-90 % der theoretisch berechneten Verdauausbeuten erreicht werden [180]. Die ermittelte Ausbeute von 85,4 % stellt somit einen sehr hohen Wert dar, da bei den vorliegenden Experimenten nur eine äußerst geringe Proteinmenge eingesetzt wurde (Kap. 5.1.1).

6.1.2. Im Gel-Verdau und μ LC/ESI-MS-Peptid-Mapping der HIR-b-UE

Die Effizienz der entwickelten im Gel-Verdaumethode wurde mit Hilfe eines μ LC/ESI-MS-Experimentes überprüft (Kap. 5.1.4). Die mutierte HIR- β -UE (Y1146/50/51 gegen F, M_w ca. 69 kDa) wurde dazu aus HEK-293 Zellen isoliert und gelelektrophoretisch aufgereinigt (Abb. 5.4.A). Nach dem im Gel-Verdau wurden die resultierenden Peptide mit Hilfe eines *on-line*- μ LC(UV)/ESI-MS-Experimentes untersucht (Abb. 5.4). Anhand der intensiven Signale in den UV- und BP-Chromatogrammen war deutlich zu erkennen, dass sich bei der Spaltung

zahlreiche tryptische Peptide bildeten. Die eingesetzte Proteinmenge wurde, basierend auf den beobachteten UV-Signalintensitäten, auf etwa 20-40 pmol (ca. 1,2-2,5 µg) geschätzt. Bei dem Peptid-*Mapping* konnten insgesamt 41 tryptische Peptide identifiziert werden (Tab. 5.1), darunter auch die Peptide, welche die mutierten Aminosäurenreste (Y1146/50/51F) enthielten (Abb. 5.5.B). Den LC-Elutionspuffern wurde zur Vermeidung der Unterdrückung der Peptidionen entsprechend Arnott *et al.*, sowie Yates *et al.* nur sehr wenig TFA (Ionenpaar-Reagenz) zugesetzt [174,226]. Durch die Verwendung von *Sheath*-Gas und *Sheath*-Flüssigkeit konnten während der gesamten Gradientenelution sehr stabile ESI-Bedingungen gewährleistet werden, zudem war die Empfindlichkeit der ESI-Quelle aufgrund der eingestellten Flussrate maximal [197]. Da bei der Analyse ein relativ großer *m/z*-Bereich abgescannt wurde (*m/z* 400-2500 in 3,5 sec), verringerte sich die Empfindlichkeit zwar etwas, jedoch konnten somit aber auch größere Peptide detektiert werden (Tab. 5.1). Die identifizierten Peptide deckten insgesamt 75 % der Proteinsequenz ab (Abb. 5.6). Scheler *et al.* konnten bei ihrem MALDI-MS-basierenden Peptid-*Mapping* ähnliche Werte erzielen (70-90 % Sequenzabdeckung), jedoch nur bei ausreichend großer Proteinmenge [180]. Bei dem vorliegenden LC/ESI-MS-Experiment wurden zahlreiche Peptide detektiert, welche nicht mit den *in silico* erzeugten Peptiden übereinstimmten. Zum einen wurde beim *in silico*-Verdau lediglich eine verpasste Schnittstelle zugelassen. Zum anderen sollte nach Retmal *et al.* berücksichtigt werden, dass Trypsin nicht schneidet, wenn C-terminal auf Lysin oder Arginin ein Prolinrest folgt [575]. Mögliche Modifikationen wie die Oxidation von Methioninresten oder die Alkylierung von Cysteinresten durch Acrylamid usw. sollten ebenso berücksichtigt werden wie eventuell auftretende posttranslationale Modifikationen. Nach Swiderek *et al.* können sich aufgrund unspezifischer Spaltungen zudem nicht nachvollziehbare Peptidfragmente bilden [186]. Außerdem können insbesondere kleine und hydrophile Peptide nicht detektiert werden, da sie bei der chromatographischen Trennung von der RP-Säule nicht zurückgehalten werden können und deshalb mit dem Injektionspeak eluieren. Coeluiierende Salze und Detergentien unterdrücken in der Regel die Ionisierung dieser Peptide so stark, dass diese nicht detektiert werden können. Umgekehrt kann es vorkommen, dass große und hydrophobe Peptide überhaupt nicht gelöst werden oder irreversibel an die RP-Säule binden und deshalb ebenfalls nicht detektierbar werden können [541]. Prinzipiell hat ein RP-LC/ESI-MS-Experiment aber den Vorteil, dass die einzelnen Komponenten in einem Schritt entsalzt, getrennt und aufkonzentriert werden [176,576-578]. Die moderne Kapillarsäulenteknik ermöglicht dabei enorm empfindliche Analysen. Wie Reid *et al.* zeigen konnten, erhöht sich bei einer 7-fachen Verringerung des Säuleninnendurchmessers (0,3 mm gegenüber 2,1 mm) die Empfindlichkeit um das 25-80fache, wobei zusätzlich auch das konzentrationsabhängige Verhalten der ESI zum Tragen kommt (Kap. 2.1.5.2) [201]. Bei dem vorliegenden Experiment konnten die einzelnen Peptide trotz des relativ langen Gradienten nicht vollständig voneinander getrennt werden, so dass in der Regel mehrere Peptide coeluierten (Abb. 5.5). Aufgrund der Coelution kam es teilweise zur Unterdrückung schwach ionisierender Peptide durch gut ionisierende Peptide, so dass nicht alle vorhandenen Peptide detektiert werden konnten (Kap. 2.1.4.2). Mit der entwickelten im Gel-Verdaumethode steht somit ein wichtiger Bestandteil für die Identifizierung und Charakterisierung von Gel-getrennten Proteinen zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass selbst äußerst geringe Proteinmengen noch hoch effizient verdaut werden können. Die Methode kann deshalb auch zur Analyse Silbergefärbter SDS-PAGE-getrennter Proteine angewendet werden.

6.2. Mikro-Techniken zur Aufreinigung und Konzentration von Peptiden

In der Proteom-Analytik müssen sehr viele Proteine innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes untersucht werden. Die eingesetzten Analyseverfahren müssen deshalb für einen hohen Probendurchsatz (*high throughput*) geeignet sein. MALDI und ESI sind zwar sehr schonende und sensitive Ionisierungsverfahren, jedoch haben beide Verfahren auch den Nachteil, dass sie gegenüber Verunreinigungen wie Salzen und Detergentien sehr empfindlich sind. Insbesondere beim Nanospray-Verfahren kann es vorkommen, dass die Detektion der in der Analysenprobe enthaltenen Peptide durch ein hohes chemisches Rauschen verhindert wird (siehe Kap. 5.3.1, Abb. 5.12) [191]. Für die MALDI- und NanoES-MS-basierende Identifizierung und Charakterisierung femtomolarer Mengen im Gel verdauter Proteine wurden im Laufe der letzten Jahre deshalb unterschiedlichste miniaturisierte Probenvorbereitungsmethoden entwickelt (Kap. 2.4.5). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mikro-Tip-Technik entwickelt, welche sowohl zur RP-Entsalzung von Peptiden als auch zur IMAC-Konzentration phosphorylierter Peptide eingesetzt werden kann (Kap. 5.2). Die Mikro-Tips können sehr einfach und kostengünstig hergestellt werden. Außerdem ist die Handhabung der Mikro-Tips sehr sicher, ein Probenverlust durch Verstopfung der Tips kann ausgeschlossen werden. Über den Gasdruck in der Insulinspritze kann die Beladung und die Elution der Peptide zudem sehr fein reguliert werden. Eine uneffiziente Entsalzung aufgrund zu kurzer Kontaktzeiten, wie sie bei der Methode nach Wilm *et al.* [104,181,232,235] beobachtet wird, kann deshalb vermieden werden. Durch die Verwendung von Fritten können die Mikro-Tips mit unterschiedlichsten Chromatographie-Materialien befüllt werden, ohne dass eine Durchmischung der einzelnen Schichten erfolgt. Somit könnten ebenso IMAC/RP- als auch Ionenaustauscher/RP-Tips hergestellt werden.

6.2.1. RP-Mikro-Tips

Die RP-Mikro-Tips wurden sandwichartig mit POROS 20 R2 und POROS Oligo R3 befüllt (Abb. 5.7). POROS R20 ist ein klassisches RP-Material, welches für die Aufreinigung von Peptiden aus Proteinverdau eingesetzt wird. Oligo R3 wird eigentlich zur Aufreinigung von Oligonukleotiden eingesetzt, eignet sich deshalb aber auch besonders gut zur Aufreinigung stark polarer und saurer Peptide (u.a. von Phosphopeptiden). Die Effizienz der Mikro-Tip-Entsalzung wurde mit Hilfe der Kapillarzonenelektrophorese überprüft. Für das untersuchte HSP ($6 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) konnte mit zunehmendem RP-Bettvolumen eine höhere Wiederfindungsrate beobachtet werden (Abb. 5.9). Bei den $5 \mu\text{l}$ Mikro-Tips wurden lediglich 11,9 % der eingesetzten Peptidmenge verloren. Zur weiteren Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Mikro-Tips wurden diese zur Entsalzung eines tryptischen Lösungsverdau von β -Casein (20 pmol) eingesetzt (Abb. 5.10). Bei der Entsalzung wurde keines der Peptide vollständig verloren, zudem konnte basierend auf den beobachteten Peakflächen eine Wiederfindungsrate von mehr als 90 % ermittelt werden. Aufgrund der entfernten Pufferbestandteile konnte bei der entsalzten Probe außerdem eine verbesserte Trennung der Einzelkomponenten beobachtet werden (Erhöhung der Trennleistung).

Sind in einem Labor Kapillar-LC-Analysen oder entsprechende Geräte vorhanden, so sollten aus chromatographischer Sicht die säulenchromatographischen Trennungen aber stets den Mikro-Tips vorgezogen werden. Durch die dichtere Packung sowie die längere Anordnung kann bei den LC-Säulen eine wesentlich bessere Wechselwirkung zwischen den Analyten und der festen Phase erreicht werden. Durch eine Gradientenelution kann die Effizienz der Auftrennung noch zusätzlich gesteigert werden (Abb. 5.4). Die Mikro-Tips ermöglichen im Vergleich dazu zwar eine raschere, jedoch auch eine sehr unzureichende Trennung der einzelnen Komponenten. Bei den NanoES-MS- oder MALDI-MS-Analysen hat dies zur

Folge, dass es stets zu Unterdrückungseffekten durch coeluiierende Peptide kommt (Kap. 2.1.4.2). Alternativ dazu kann die Elution aber auch stufenweise mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität erfolgen (fraktionierte Elution). Insgesamt beschränkt sich der Einsatz der Mikro-Tips somit hauptsächlich auf die schnelle MALDI- und NanoES-MS-basierende Proteinidentifizierung. Im Falle einer Charakterisierung komplexer Proteine sollte aber stets eine säulenchromatographische Trennung (*on-* oder *off-line*) der enzymatisch erzeugten Peptide erfolgen.

6.2.2. IMAC-Mikro-Tips

Die Herstellung der IMAC-Mikro-Tips erfolgte entsprechend den RP-Mikro-Tips (Abb. 5.7, Kap. 4.3.5). Zur Aktivierung wurden die mit POROS MC 20 Material befüllten IMAC-Mikro-Tips mit Ga^{3+} -Ionen beladen. Die Effizienz der IMAC-Mikro-Tips wurde ebenfalls mittels Kapillarzonenoelektrophorese überprüft (Abb. 5.11). Für das untersuchte HSP konnte einschließlich nachfolgender RP-Mikro-Tip-Aufreinigung eine Wiederfindungsrate von 57 % der eingesetzten Peptidmenge beobachtet werden. Aufgrund der Möglichkeit IMAC-Kapillarsäulen selber herstellen zu können (Kap. 5.7) wurde die weitere Etablierung der IMAC-Mikro-Tips auf diesem Stand abgeschlossen. Die IMAC-Kapillarsäulen-Experimente zeigten deutlich, dass die Effizienz der Phosphopeptidaufreinigung sehr stark von der Beladungsdauer abhängt. Gegenüber den IMAC-Tips sind die IMAC-Kapillarsäulen weitaus effizienter, da sie aufgrund der dichteren Packung und der längeren Anordnung eine sehr effektive Wechselwirkung zwischen den Phosphopeptiden und dem Metallchelate ermöglichen.

6.3. NanoES-MS und NanoES-MS/MS basierende Proteinidentifizierung

Die enormen Fortschritte im Bereich der modernen Proteinanalytik erfolgten zum einen aufgrund der Entwicklung der 1D- und 2D-Gelelektrophorese, zum anderen durch die Entwicklung der massenspektrometrischen Peptid- und Protein-Analyseverfahren [5,36,136-139,159,206]. Mit Hilfe der Massenspektrometrie können innerhalb kürzester Zeit die Massen und die Sequenzen von Peptiden sehr genau und sehr sensitiv bestimmt werden. Die massenspektrometrischen Daten werden dann mittels Computeralgorithmen analysiert und die Proteine basierend auf Sequenzdatenbanken identifiziert und charakterisiert [36,206,226]. Beim Peptidmassen-*Mapping* werden die Massen, der bei einem Proteinverdau mit einer spezifischen Protease gebildeten Peptide, massenspektrometrisch bestimmt und damit das Protein in einer Datenbank identifiziert (*fingerprint* oder *mass mapping*) [160-164]. Die MS/MS-basierende Proteinidentifizierung beruht im Gegensatz dazu auf der Erzeugung sequenzspezifischer Tandem-MS/MS-Daten enzymatisch erzeugter Peptide. Sowohl das Fragmentationmuster als auch die Sequenzinformation eines Tandem-Massenspektrums stellen sehr spezifische Informationen dar und können deshalb auch zur computerunterstützten Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen eingesetzt werden [206,210].

In den vorliegenden Experimenten wurde die computerunterstützte Proteinidentifizierung (Kap. 5.3) am Beispiel der nicht-phosphorylierten HIR-Kinasedomäne, ein 276 Aminosäuren umfassender Sequenzbereich (I984-F1259) innerhalb der HIR- β -UE, untersucht. Das Protein wurde mittels SDS-PAGE (CBB-Färbung) gereinigt und tryptisch im Gel verdaut (einschließlich Reduktion und Alkylierung). Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels NanoES-MS. Zunächst wurde auf eine Entsalzung des Verdauextraktes verzichtet. Aufgrund des hohen chemischen Untergrundes konnte lediglich ein stark verrauschtes NanoES-Massenspektrum mit wenigen Peptidionensignalen im unteren m/z -Bereich ($< 750 m/z$) beobachtet werden (Abb. 5.12). Durch die anschließende Mikro-Tip-Entsalzung reduzierte sich der chemische Untergrund sehr stark, so dass ein 10-fach höheres S/N-

Verhältnis beobachtet werden konnte (Kap. 5.2, Abb. 5.13.A). Das manuelle Peptidmassen-*Mapping* (Vergleich der ermittelten und theoretisch berechneten Peptidmassen) ergab eine Sequenzabdeckung von 80,1 % (Tab. 5.2, Abb. 5.14). Zum einen verhinderte die eingeschränkte Auflösung und Massengenauigkeit des Triple-Quad-MS die eindeutige Zuordnung der detektierten Peptidmassen, zum anderen wurde bei der Erstellung des theoretischen Verdaus (*in silico*-Verdau) lediglich eine verpasste Schnittstelle der Protease zugelassen. Außerdem wurden variable Modifikationen wie die Acrylamid-Alkylierung von Cysteinresten oder die Oxidation von Methioninresten nicht berücksichtigt (Tab. 2.2). Die theoretisch erreichbare Sequenzabdeckung lag somit sicherlich bei weit über 80,1 %.

6.3.1. Proteinidentifizierung mittels Peptid-Mapping

Bei dem Peptid-*Mapping* wurden die ermittelten monoisotopischen Massen der $[M+H]^+$ -Peptidionen mittels ProFound, Mascot Search, PepIdent und MS-Fit ausgewertet (Kap. 5.3.3.1). Das untersuchte Protein konnte mit allen vier Programmen korrekt identifiziert werden (Tab. 5.3). Bei PepIdent und MS-Fit wurde das Protein lediglich als HIR- β -UE bzw. humaner Insulinrezeptor identifiziert, ProFound und Mascot Search ermöglichten eine eindeutige Identifizierung als die Tyrosinkinasedomäne des humanen Insulinrezeptors. Bei Mascot Search konnten 21 (84 %), bei ProFound 20 (80 %), der insgesamt 25 eingetragenen Peptidmassen den entsprechenden theoretisch berechneten Peptidmassen zugeordnet werden. Die höchste Zahl gemappter Peptide konnte bei PepIdent und MS-Fit beobachtet werden (22 Peptide, 88 %), jedoch wurden hier fälschlicherweise einige Peptide der gesamten β -Untereinheit des Insulinrezeptors zugeordnet. Mit modernen MALDI-TOF-, QqTOF- und FTICR-Geräten [39,40] können die Peptidmassen mit einer Genauigkeit von $< \pm 10$ ppm bestimmt werden, so dass fehlerhafte Zuordnungen nahezu gänzlich ausgeschlossen werden können [153]. Zur Erhöhung der Signifikanz einer auf einem Peptid-*Mapping* basierenden Proteinidentifizierung ist neben der Massengenauigkeit auch die Sensitivität bei der Peptidmassenbestimmung entscheidend. Sowohl MALDI- als auch NanoES-MS haben den Nachteil, dass bei der Analyse kompletter Proteinverdaus Signalunterdrückungen auftreten, welche die Detektion von Peptiden verhindern können. Diese Effekte können durch eine vorgeschaltete RP-chromatographische-Trennung des Proteinverdaus aber weitgehendst vermieden werden. Außerdem sollten Modifikationen, unter anderem auch diejenigen, welche infolge des im Gel-Verdaus auftreten können, sowie unspezifische Spaltungen der Protease optional bei der Computeranalyse berücksichtigt werden.

Von allen Programmen war ProFound das interessanteste, da hier neben den aufgelisteten Kandidaten zusätzlich Massen-Fehlerkartierungen und Grafiken der Sequenzabdeckung erhalten werden konnten (Abb. 5.15 und Abb. 5.16). Das untersuchte Protein wurde als nicht-phosphorylierte HIR-Kinasedomäne identifiziert. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass es sich bei dem Protein um die phosphorylierte Form der HIR-Kinasedomäne handelt war 47-fach geringer (Abb. 5.15.A und Abb. 5.15.B). Die Sequenzabdeckung betrug 43 % (Abb. 5.16.A, mittleres Diagramm). Nach Zhang und Chait können bei *bona fide*-Identifizierungen sehr häufig benachbarte Peptide eines Sequenzbereichs bzw. Peptide mit gleichen terminalen Enden und/oder Überlappungen beobachtet werden [579]. Die Beobachtung mehrerer überlappender Peptide innerhalb zusammenhängender Sequenzbereiche unterstreicht somit die Korrektheit der Identifizierung (Abb. 5.16.A). Zusätzlich kann die Korrektheit der Identifizierung auch anhand der Abweichung zwischen den bestimmten und den berechneten Peptidmassen überprüft werden (Fehlerkartierung Abb. 5.16.A und B, rechte Diagramme). Anhand der Verteilung der Fehler der gemappten Peptidmassen (sehr enger Bereich um + 2 Da) war klar zu erkennen, dass die Identifizierung korrekt war. Das Massenspektrometer bzw. der entsprechende Quadrupol war somit zwar um etwa 1 Da zu hoch kalibriert, andere

systematische Fehler der Peptidmassenbestimmung konnten jedoch ausgeschlossen werden. Im Vergleich dazu verteilen sich bei falsch identifizierten Proteinen die Fehler der ermittelten Peptidmassen unsystematisch, in den Histogrammen wird deshalb eine einheitliche Verteilung der Massenfehler beobachtet (Abb. 5.16.B rechtes Diagramm).

Insgesamt erlaubt die Methode des Peptid-*Mapping* somit eine sehr rasche und zuverlässig Identifizierung von Proteinen. Nach Arnott *et al.* sollten mindestens 5 Peptidmassen vorhanden sein, wobei die Signifikanz der Identifizierung mit steigender Anzahl ermittelter Peptidmassen deutlich zunimmt [545]. Probleme ergeben sich im allgemeinen dann, wenn das untersuchte Protein entweder viele posttranslationale Modifikationen enthält oder in vielen Isoformen vorkommt oder eine Proteinmischung vorliegt [545].

6.3.2. Proteinidentifizierung mittels Fragmentionendaten

Bei der MS/MS-basierenden Proteinidentifizierung werden enzymatisch erzeugte Peptidionen mit Hilfe der Tandem-MS/MS fragmentiert und die Proteine anhand der resultierenden Tochterionenspektren identifiziert [210,211]. Ein Tandem-Massenspektrum eines Peptidions enthält ein für eine gegebene Aminosäuresequenz völlig einzigartiges Fragmentionemuster (Kap. 2.4.4). Im vorliegenden Experiment konnte die HIR-Kinasedomäne mittels eines CID-Experimentes, welches von einem einzigen Peptidion aufgenommen wurde sowohl mit SEQUEST als auch mit MS/MS Ion Search identifiziert werden (Kap. 5.3.4) Da nur ein einziges Peptid untersucht wurde, konnte das Protein nicht als HIR-Kinasedomäne identifiziert werden (Vgl. Kap. 6.3.2); hierzu hätten mehrere Peptide sequenziert werden müssen. Mit den zur Verfügung stehenden computerunterstützten Rechenalgorithmen können die Fragmentionenspektren sehr rasch analysiert werden, so dass selbst über das Internet das Ergebnis der Proteinidentifizierung in der Regel schon nach wenigen Sekunden vorliegt.

Für den Erfolg einer Proteinidentifizierung ist hauptsächlich die Qualität der ermittelten Tochterionenspektren verantwortlich. Wie Ducret *et al.* zeigen konnten reicht die Qualität der MS/MS-Spektren für die SEQUEST-Analyse aus, wenn das S/N-Verhältnis des Peptidions im MS-Scan ≥ 10 ist [580]. Bei einem Triple-Quad-MS hängt die Qualität der MS/MS-Spektren unter anderem davon ab, wie viel Energie bei der Kollision auf den jeweiligen Ladungszustand der Peptide übertragen wird [580,581]. Da kleine Peptide beim CID nur sehr wenig Fragmentionen ergeben ist der Informationsgehalt ihrer MS/MS-Spektren im Vergleich zu größeren Peptiden deutlich geringer und unspezifischer. Die eindeutige Identifizierung kleiner Peptide erfordert deshalb qualitativ gute Spektren und setzt somit voraus, dass eine ausreichend große Probenmenge vorliegt [580]. Wie Ducret *et al.* zeigen konnten, erhöht sich mit zunehmender Peptid- bzw. Proteinmenge die Qualität der MS/MS-basierenden Identifizierung [580]. Die Vorteile der Fragmentionenanalyse sind zum einen, dass auch komplexe Proteinmischungen analysiert werden können, zum anderen, dass sequenzspezifische Informationen erhalten werden [206]. Besonders die Ionenfallen-MS-Geräte der neuesten Generation ermöglichen die empfindliche (femtomolarer Bereich), rasche und hoch selektive *on-line-nanoLC-MS/MS*-Analyse komplexer Proteinverdau (*shotgun identification of proteins in mixtures*) [36]. Vorhandene Proteinmodifikationen können dabei nicht nur detektiert sondern gleichzeitig auch lokalisiert werden [36] (Kap. 5.6.8, Abb. 5.43).

6.4. Analyse von Phosphopeptiden mit Hilfe der Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken

Die klassischen Methoden (Western-Blot, radioaktiver Edman-Abbau, 2-D TLC und Aminosäureanalyse, Kap. 2.5), welche zur Detektion von Proteinphosphorylierungen eingesetzt werden, werden heutzutage vermehrt durch massenspektrometrische Verfahren ersetzt. Der Großteil der MS-basierenden Verfahren beruht dabei auf der massenspektrometrischen Erzeugung phosphorylierungsspezifischer Markerionen [346,364,366,367]. Im negativen Ionenmodus können pSer-, pThr- und pTyr-haltige Phosphopeptide entweder durch Skimmer-CID [346,360,363,364,366] oder Vorläuferionen-Scantechnik [366,367,370] anhand des m/z 79-Fragmentions detektiert werden. Mit Hilfe der Neutralverlust-Scantechnik können pSer- und pThr-haltige Peptide im positiven Ionenmodus anhand ihres Phosphatverlustes detektiert werden [346,347,363,364]. Die eigentliche Identifizierung der Phosphorylierungsstellen erfolgt dann in der Regel mittels Tandem-MS/MS [348] (Kap. 2.5.3.1). Dennoch ist die Analyse von Proteinphosphorylierungen auch heute noch eines der schwierigsten Probleme der Bioanalytik [144]. Die Analyse der Proteinphosphorylierungen wird insbesondere durch die niedrige Phosphorylierungsstöchiometrie, die geringe Phosphoproteinmenge (insbesondere im Bereich der Signaltransduktion [144]) und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Phosphopeptide erschwert.

Aufgrund seiner linearen Anordnung eignet sich ein Triple-Quad-MS besonders gut zur Untersuchung von Proteinphosphorylierungen (Kap. 2.2.5). Mit Hilfe verschiedener Scantechniken werden unterschiedliche phosphorylierungsspezifische Markerionen erzeugt, anhand derer die Phosphopeptide detektiert werden können (Kap. 2.5.3.3). Im positiven Ionenmodus setzt man die Neutralverlust-Scantechnik, im negativen Ionenmodus die Vorläuferionen-Scantechniken ein. Mit Hilfe der Tochterionen-Scantechniken können die Phosphopeptide dann sequenziert werden. Die Empfindlichkeit der Scanverfahren hängen somit direkt von der Effizienz ab, mit welcher die spezifischen Markerionen gebildet werden. Die Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken wurden deshalb in Kap. 5.4 eingehender untersucht. Beide Techniken beruhen zwar auf der Kollisionszellen-basierenden Erzeugung spezifischer Markerionen, unterscheiden sich aber im Ablauf des Scanverfahrens, der Ionisierungspolarität und den erzeugten Markerionen (Kap. 2.5.3.3.3 und 2.5.3.3.4).

Als erste konnten Biemann und Scoble, bei ihren LSIMS-Untersuchungen von Phosphopeptiden, über die CID-abhängige Bildung phosphorylierungsspezifischer Fragmentionen berichten [321]. Die unterschiedlichen, genau definierten Fragmentionen können sowohl zur Identifizierung der Phosphopeptide als auch zur Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen in den Peptiden herangezogen werden [320]. Biemann und Scoble konnten zeigen, dass beim positiv-Ionen-CID einfach-protonierter Phosphopeptid-Molekülonen ein H_3PO_4 -Neutralverlust (98 Da) erfolgt, welcher von einem HPO_3 -Neutralverlust (80 Da) begleitet wird [321]. Die beiden Neutralverlust-Reaktionen konnten bei der ESI-Tochterionen-Analyse des Serin-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Quasimolekülonen ebenfalls beobachtet werden (Kap. 5.4.1, Abb. 5.20). Die positiv-Ionen-Neutralverlust-Scantechnik kann deshalb zur Detektion von Phosphopeptiden eingesetzt werden [320,363]. Der H_3PO_4 -Neutralverlust beträgt bei einem einfach-geladenen Phosphopeptidion 98 Da, bei einem mehrfach-geladenen Phosphopeptidion je nach Ladungszustand $98/z$ Da (z Ladungen) [84]. Da beim Niederenergie-CID mehrfach-geladene Peptidionen erheblich leichter fragmentieren (Bildung intensiver Fragmentionen) wie einfach-geladene Peptidionen (Kap. 2.4.4), wurden bei den Tochterionenexperimenten die zweifach-geladenen Phosphopeptid-Quasimolekülonen fragmentiert [348]. Infolge des Neutralverlustes bildeten sich die $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ - und $[M+2H-HPO_3]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentionen bei

m/z 772,9 und m/z 781,3. Biemann und Scoble konnten ebenfalls über das Auftreten von Phosphoserin- und Phosphotyrosin-spezifischen Immonium-Ionen bei m/z 140 und m/z 216 berichten [321]. Aufgrund der in diesem m/z -Bereich ebenfalls vorkommenden zahlreichen anderen Fragment- und Immonium-Ionen, sowie der unzureichenden Massenauflösung des Triple-Quad-MS, welche für die spezifische Detektion dieser Ionen nicht ausreicht, wurden die beiden Immonium-Ionen in der vorliegenden Arbeit nicht als phosphorylierungsspezifische Markerionen herangezogen. Biemann und Scoble berichteten ebenfalls über das Auftreten eines H_3PO_4 - und HPO_3 -Neutralverlustes (98 Da bzw. 80 Da) beim negativ-Ionen-CID einfach-geladener Phosphopeptid-Molekülonen [321]. Bei der ESI-MS konnten Lehmann *et al.* zeigen, dass der Verlust von H_3PO_4 im Produktionenspektrum des $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ions dominiert, wogegen dieser beim $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Ion nur untergeordnet auftritt [346]. Bei der kollisionsaktivierten Fragmentierung des Tyrosin-phosphorylierten $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -pp60c-src-Quasimolekülonen konnte nur ein schwaches $[\text{M}-2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2-}$ -Neutralverlust-Fragmentation (m/z 721,4) beobachtet werden (Kap. 5.4.3, Abb. 5.23), ein HPO_3 -Neutralverlust wurde überhaupt nicht beobachtet. Intensive $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentationen (m/z 79 und m/z 97), welche sich entsprechend Biemann und Scoble [321] bzw. Lehmann *et al.* [346] beim negativ-Ionen-CID hauptsächlich bilden, konnten dagegen beobachtet werden (Abb. 5.23).

6.4.1. Die Neutralverlust-Scantchnik

Bei der Untersuchung des $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -HSP-Molekülonen (Abb. 5.21) konnte für den Kollisions-*Offset*-abhängigen H_3PO_4 - und HPO_3 -Neutralverlust jeweils ein symmetrischer Intensitätsverlauf (Maximum bei etwa -25 V) beobachtet werden, wobei der H_3PO_4 -Verlust etwa 10-fach intensiver wie der HPO_3 -Verlust war (Abb. 5.21). Die relativ geringe erforderliche Kollisionsenergie und der Intensitätsverlauf der Neutralverlust-Fragmentationen sind typisch für Reaktionen, die eine niedrige Aktivierungsenergie benötigen. Nach Hunter und Games handelt es sich bei dem Neutralverlust des Phosphatrestes um eine Umlagerungs-Reaktion, welche über einen sterisch bevorzugten 5- oder 6-Zentren-Übergangszustand verläuft [363]. Dies konnte durch die H-D-Austausch-Experimente, welche von Lehmann *et al.* durchgeführt wurden bestätigt werden [346]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beim H_3PO_4 -Neutralverlust aus Serin- und Threonin-haltigen Phosphopeptiden ein 6-Zentren Übergangszustand (Abb. 2.16) durchlaufen wird, bei welchem das C_α -Wasserstoffatom des Serin- oder Threoninrestes auf die protonierte Phosphatgruppe übertragen wird [346]. Infolge der Spaltung der C-O-Bindung und der Übertragung eines Wasserstoffs auf die Phosphatgruppe resultiert insgesamt ein Verlust von H_3PO_4 (98 Da). Aufgrund der Spaltung der O-P-Bindung erfolgt in einem geringeren Ausmaß ebenso ein HPO_3 -Verlust (80 Da) [346]. Aufgrund des bevorzugten Übergangszustandes ist bei optimal eingestellter Kollisions-*Offset*-Spannung der H_3PO_4 -Verlust etwa 50-fach höher wie der HPO_3 -Verlust [346]. Insgesamt erfolgt der H_3PO_4 -Neutralverlust also nicht aufgrund eines aufeinanderfolgenden Verlustes von HPO_3 und H_2O , vielmehr bildet sich das Fragmentation aus dem intakten Molekülon. Basierend auf ihren Experimenten nehmen DeGnore und Qin an, dass sich infolge der β -Eliminierung von H_3PO_4 beim Phosphoserin ein Dehydroalaninrest, beim Phosphothreonin ein Dehydroamino-2-buttersäurerest bildet [348]. Den Autoren zufolge scheinen sich die Mechanismen der beiden Neutralverlust-Reaktionen zu unterscheiden (Abb. 5.20). Erst vor kurzem konnten Reid *et al.* in ihren Experimenten zeigen, dass protonierte Serine und O-Phosphoserine sowie die entsprechenden N-Acetyl-Derivate aufgrund von Seitenkettenverlusten unter Einbezug von Nachbargruppen Aziridin- und Oxazolin-Produktionen bilden (3- bzw. 5-Ringe) und nicht, wie von DeGnore und Qin beschrieben ein Dehydroalaninrest [582]. Bei Phosphotyrosin verhindert der aromatische Ring die Ausbildung des energetisch bevorzugten 6-Zentren-Übergangszustandes, so dass es zu keiner β -

Eliminierung entsprechend den Phosphoserin-haltigen Peptiden kommt [363]. Dennoch kann auch bei Phosphotyrosinen in der Regel ein Neutralverlust von 98 Da beobachtet werden. Man nimmt an, dass es sich hierbei aber um einen aufeinanderfolgenden Verlust von HPO_3 (80 Da) und H_2O (18 Da) handelt [347,348]. Mit zunehmenden Kollisions-*Offset*-Werten konnte eine Verringerung der Intensität der $[\text{M}+2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2+}$ - und $[\text{M}+2\text{H}-\text{HPO}_3]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentionen, aufgrund der stärker ausgeprägten Fragmentierung entlang des Peptidrückgrates beobachtet werden. Durch die Erhöhung der Stossenergie nimmt die Ausbeute der Neutralverlust-Fragmentionen zwar zu, jedoch zerfallen die primär erzeugten Fragmentionen aufgrund erneuter Anregung in weitere Fragmentionen [347,39]. Im gleichen Ausmaß, wie die Intensität der Molekül- und Fragmentionen abnimmt, nimmt der Untergrund des Produktionenspektrums deshalb zu [39]. Bei Anwendung der NanoES-MS [103,104] kann durch die Mittelwertbildung über eine große Anzahl wiederholter Scans das S/N-Verhältnis aber deutlich verbessert werden [39]. Besonders hervorragend eignen sich Ionenfallen-Massenspektrometer für die Neutralverlust-Analyse [348,349]. Bei einem Ionenfallen-MS erfolgt die Kollisionsaktivierung nicht in einer Kollisionszelle (q2) sondern in der Falle selbst. In einer Ionenfalle können die gebildeten Fragmentionen nicht zu Folgezerfällen angeregt werden, da diese aus dem Resonanz-Anregungs-Frequenzbereich herausfallen [145]. In den Ionenfallen-Tochterionenspektren von Phosphopeptiden dominiert deshalb in der Regel das $[\text{M}+2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2+}$ -Fragmention (Abb. 5.92 und 5.93, Kap. 5.11.6.2). Gegenüber einem Triple-Quad-MS hat eine Ionenfalle aber den Nachteil, dass keine größeren *m/z*-Bereiche abgescannt werden können. Bei relativ kleinen Serin- und Threonin-phosphorylierten Peptiden (10-15 Aminosäurereste) stellt der Verlust von Phosphorsäure die effektivste Fragmentierungsreaktion dar (Abb. 5.22). Bei größeren Phosphopeptiden wird bei der Neutralverlust-Analyse aber meistens ein schlechteres S/N-Verhältnis beobachtet, da sich die Moleküle durch intraionische Wechselwirkungen stabilisieren [348]. Durch die Erhöhung des CID-Offsets kann die Intensität des Neutralverlust zwar verbessert werden, jedoch werden dadurch aber auch höher geladene Peptidionen aufgrund ihres niedrigen Anregungspotentials relativ stark fragmentiert. Damit nimmt das Risiko zu, dass nicht-phosphorylierte Peptide ebenfalls Fragmente im Abstand von -98/z Da zum Molekülion bilden und dadurch ein Signal im Neutralverlust-Spektrum erzeugen. Bei Neutralverlust-Analysen kann deshalb in der Reihe 98 Da, 98/2 Da, 98/3 Da ein abnehmendes S/N-Verhältnis beobachtet werden [347]. Erst vor kurzem konnten Lehmann *et al.* darüber berichten, dass kleinere Phosphopeptide (aus Elastase-Verdau) bei der Neutralverlust-Analyse höhere Intensitäten der $[\text{M}+2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Ionen ergeben und damit eine sensitivere Analyse ermöglichen [347].

6.4.2. Die Vorläuferionen-Scantechnik

Bei diesen Experimenten wurde das Tyrosin-phosphorylierte pp60c-src Peptid mit Hilfe eines Tochterionen-Experimentes im negativen Ionenmodus untersucht (Kap. 5.4.3, Abb. 5.23 und 5.24). Entsprechend den Resultaten von Biemann und Scoble sowie Lehmann *et al.* konnten ebenfalls intensive $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Fragmentionen (*m/z* 79 und *m/z* 97) sowie weniger intensive $[\text{M}-2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2-}$ -Neutralverlust-Fragmentionen (*m/z* 721,4) beobachtet werden [321,346]. Um die Abhängigkeit der phosphorylierungsspezifischen Fragmentierungsreaktionen vom Kollisions-*Offset* untersuchen zu können, wurde das $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -pp60c-src-Quasimolekülion (*m/z* 770,8) in q2 fragmentiert. Nach Lehmann *et al.* können zwei Typen phosphorylierungsspezifischer Fragmentierungsreaktionen unterschieden werden, welche sich deutlich in ihren Kollisions-*Offset*-Diagrammen unterscheiden. Zum einen der H_3PO_4 -Neutralverlust (98 Da), zum anderen die Bildung der $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ - und $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentionen (*m/z* 97 bzw. 79). Gegenüber dem Neutralverlust liegt der Bildung der $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ - und $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentionen keine Vorläufer-Produktions-Beziehung zugrunde. Die Bildung dieser

Fragmentionen erfolgt erst bei deutlich höheren *Offset*-Werten (Abb. 5.24). Man nimmt deshalb an, dass eine direkte Spaltung der C-O- bzw. P-O-Phosphoesterbindung stattfindet [346]. Bei höheren *Offset*-Werten nimmt die Intensität der m/z 97-Fragmentionen aufgrund eines zunehmenden zusätzlichen Neutralverlustes von Wasser (18 Da) ab. Das $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmention (m/z 79) kann infolge einer Sauerstoffabspaltung zwar zu $[\text{PO}_2]^-$ (m/z 63) zerfallen, jedoch erfordert diese Reaktion deutlich mehr Energie. In den vorliegenden Experimenten konnte die Bildung von $[\text{PO}_2]^-$ -Fragmentionen nicht beobachtet werden. Im Vergleich zu den positiv-Ionen-Experimenten (Abb. 5.21) konnte zudem nur ein sehr schwacher H_3PO_4 -Neutralverlust beobachtet werden (Abb. 5.24). Bei zweifach-negativ geladenen Molekülonen erfordert der Verlust von Phosphorsäure, dass beide Ladungen am Peptidrückgrat des $[\text{M}-2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2-}$ -Fragmentions verbleiben. Bei einem zweifach negativ geladenen Phosphopeptidion wirkt die Phosphatgruppe stabilisierend auf die negativen Ladungen. Basierend auf den Untersuchungen von Lehmann *et al.* kann man annehmen, dass eine negative Ladung dabei sogar vollständig an der Phosphatgruppe lokalisiert ist [346]. Durch den Neutralverlust der Phosphatgruppe müssen beide Ladungen nun vollständig entlang des Peptidrückgrates des Fragmentions stabilisiert werden. Besonders bei tryptisch erzeugten Peptiden sind dafür in der Regel nicht genügend saure Aminosäurereste vorhanden. Im Vergleich hierzu können die $[\text{M}+2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2+}$ -Fragmentionen, welche beim positiv-Ionen-Neutralverlust tryptischer Phosphopeptide gebildet werden, die Ladungen erheblich besser stabilisieren (N- und C-Terminus sind basisch). Der intensivere positiv-Ionen-Neutralverlust ist somit ein Folge des stabilisierenden Einflusses, den die gebildeten Peptid-Fragmentionen auf die vorhandenen Ladungen ausüben [346].

Wie Carr *et al.* zeigen konnten, kann die Sensitivität der m/z 79-basierenden NanoES-Vorläuferionen-Scantechnik durch die Verwendung einer alkalischen Spraylösung erheblich verbessert werden [367]. Aus diesem Grund wurde der Einfluss saurer und alkalischer Bedingungen auf die Bildung der $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ - und $[\text{PO}_3]^-$ -Fragmentionen und der $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Phosphopeptidionen genauer untersucht (Abb. 5.25 und 5.26). Die Intensität des m/z 79-Fragmentions war unter alkalischen Bedingungen etwa 5-fach höher im Vergleich zu den sauren Bedingungen. Beim m/z 97-Fragmention konnte sogar ein 6-fach höherer Unterschied beobachtet werden (Abb. 5.26). Die phosphorylierungsspezifischen Fragmentionen bildeten sich somit wie von Carr *et al.* beobachtet unter alkalischen Bedingungen erheblich besser [367]. Die pH-Bedingungen haben aber keinen direkten Einfluss auf die Fragmentierungsreaktion. Da sich beim ESI-Prozess desolvatisierte Gasphasenionen bilden, können im Massenspektrometer selbst keine Lösungsmittelleffekte mehr auftreten. Somit verläuft die Fragmentierung der Gasphasenionen in der Reaktionszelle unabhängig von den Spraybedingungen. Die Fragmentierung wird lediglich von der Natur und dem Druck des Stossgases, dem Kollisions-*Offset*, der Raumladungsdichte und der Zusammensetzung der Peptide beeinflusst. Somit kommt als Ursache für die erhöhte Fragmentionenausbeute nur der Elektrospray-Prozesses selbst in Betracht, da dieser direkt durch die pH-Bedingungen beeinflusst wird. Unter alkalischen Bedingungen konnte ohne Kollisionsaktivierung eine etwa 3,5-fach höhere Intensität der $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ -Phosphopeptid-Quasimolekülonen beobachtet werden wie unter sauren Bedingungen (Abb. 5.25). Somit standen unter den alkalischen Bedingungen deutlich mehr Phosphopeptid-Molekülonen für die Kollisionsaktivierung zur Verfügung. Die effizientere Ionisierung der Phosphopeptide erfolgte aufgrund der erhöhten Oberflächenaktivität der Phosphopeptidionen in den ESI-Tröpfchen und der veränderten Ladung der Peptidionen. Die $[\text{PO}_3]^-$ -Vorläuferionen-Scantechnik wird im negativen Ionenmodus durchgeführt. Bei Verwendung einer sauren Spraylösung kommt es zum Auftreten eines *Wrong-Way-Round*-Effektes, welcher eine starke Unterdrückung der ES-Ionen (etwa 80 %) bewirkt (Kap. 2.1.4.3) [88-90]. Die Gasphasenionenbildung hängt außerdem sehr stark vom hydrophoben Charakter der Ionen ab. Die Wahrscheinlichkeit ein

Peptidion an der Oberfläche eines geladenen Tröpfchens anzutreffen nimmt mit zunehmender Hydrophobie des Peptidions zu, damit auch dessen Tendenz ein Gasphasenion auszubilden (größere Oberflächenaktivität in den ESI-Tröpfchen). Bei Phosphopeptiden haben die Phosphatreste deshalb einen sehr großen Einfluss auf die Effizienz der Ionenbildung. Bei ESI-MS-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich bei der Anhäufung vieler Phosphatreste, bzw. bei Anwesenheit eines Phosphatrestes in einem kleinen Peptid, die Oberflächenaktivität dieser Peptidionen so stark verringert, dass diese im positiven Ionenmodus nicht mehr detektiert werden können [51,91]. Im Vergleich zu nicht-phosphorylierten Peptiden verringert sich der pK_s -Wert bei Phosphopeptiden aufgrund des sauren Charakters der Phosphatreste. Unter alkalischen Bedingungen liegen die sauren Reste stark deprotoniert, die basischen Reste nahezu ungeladen vor [5]. Unter alkalischen Spraybedingungen nimmt somit bei der negativ-Ionen-ESI-MS von Phosphopeptiden die Tendenz zur Ausbildung ein oder mehrfach-negativ-geladener $[M-nH]^{n-}$ -Gasphasenionen zu, da hier die negativen Ladungen im Vergleich zu den basischen Peptidionen besser stabilisiert werden können. Dieser Effekt kann so stark sein, dass die Ionisierung basischer Peptide durch stark ionisierende Phosphopeptide fast vollständig unterdrückt wird.

Bei den Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken handelt es sich somit um empfindliche und selektive Verfahren, welche hervorragend zum Phosphopeptid-*Screening* eingesetzt werden können. Beide Methoden haben den Vorteil, dass die Phosphopeptide weder radioaktiv markiert noch mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert oder auf andere Weise behandelt werden müssen (Kap. 2.5.1 und 2.5.2). Aufgrund der extrem hohen Selektivität können die Scantechniken auch zur Untersuchung komplex zusammengesetzter Proben eingesetzt werden. Durch die hohe Selektivität erhöht sich im Vergleich zu einem Einzel-Quad-Übersichtsspektrum das S/N-Verhältnis deutlich [372]. Damit verbessert sich nicht nur die Empfindlichkeit, gleichzeitig verringert sich auch die Gefahr, dass isobare, nicht-phosphorylierte Peptide falsch positiv identifiziert werden. Die relativ kurze Analysenzeit, insbesondere im Vergleich zum konventionellen Edman-Abbau ist ein weiterer Vorteil. Die Scantechniken haben jedoch auch Nachteile. Zum einen erhält man keine direkte Information über die exakte Position der Phosphorylierungen. Die Phosphopeptide müssen deshalb in einem zusätzlichen Tochterionenexperiment sequenziert werden. Die Vorläuferionen-Analyse ist dabei besonders problematisch, da hier der pH-Wert der Spraylösung sauer eingestellt werden muss. Ebenfalls nachteilig erweist sich die Einstellung der erforderlichen MS-Parameter. Das *Tuning* des MS-Gerätes ist relativ kompliziert und erfordert ein tieferes Verständnis eines Triple-Quad-MS. Besonders bei der Neutralverlust-Analyse ist die Wahl der richtigen *Offset*-Spannung für eine erfolgreiche Analyse entscheidend. Da sich bei einer Neutralverlust-Reaktion die optimalen *Offset*-Werte nur auf einen sehr engen Bereich beschränken (Abb. 5.21) kann es sehr leicht vorkommen, dass die Phosphopeptide entweder unzureichend aktiviert werden und der H_3PO_4 -Neutralverlust deshalb ausbleibt oder der *Offset* zu hoch gewählt wird und dadurch das Neutralverlust-Fragmentation ebenfalls fragmentiert. Außerdem hat die Neutralverlust-Scantechnik den Nachteil, dass immer nur ein Ladungszustand untersucht werden kann (Verlust von 98 Da oder 49 Da aus $[M+H]^+$ - bzw. $[M+2H]^{2+}$ -Phosphopeptid-Molekülonen). Bei der Vorläuferionen-Analyse werden alle Ladungszustände gleichzeitig erfasst, so dass sich die Wahrscheinlichkeit, dass bei der eingestellten *Offset*-Spannung ein Markerion erzeugt wird, erhöht. Aus Abb. 5.24.B geht klar hervor, dass bei der Vorläuferionen-Analyse die *Offset*-Spannung so hoch wie möglich eingestellt werden sollte. Bei Phosphopeptiden stellt die Neutralverlust-Reaktion zwar die ausgeprägteste kollisionsaktivierte Fragmentierungsreaktion dar, jedoch kommt es infolge der positiven Ionisierung zu den nachteiligen Signalunterdrückungen der Phosphopeptidionen. Wie Lehmann *et al.* zeigen konnten, lassen einige Probleme der Neutralverlust-Analyse durch die Verwendung von Elastase (anstelle von Trypsin) verringern [347]. Aufgrund der negativ-

Ionisierung hat die Vorläuferionen-Analyse den Vorteil, dass mit alkalischen Spraylösungen gearbeitet werden kann, so dass sich insbesondere die Ionisierung phosphorylierter Peptide verbessert und eine weitaus höhere Sensitivität im Vergleich zur Neutralverlust-Scantechnik erzielt werden kann (Abb. 5.25).

Dennoch können auch bei der Vorläuferionen-Analyse komplexer Mischungen Unterdrückungseffekte auftreten, insbesondere bei gering konzentrierten Phosphopeptiden. Zur Verringerung der Komplexität einer Proben sollte diese deshalb stets mittels RP-HPLC getrennt werden. Wie schon oben erwähnt wurde, können die Phosphopeptide infolge der Kollisionsaktivierung auch Brüche entlang ihres Peptidrückgrates erfahren. Bei der nachfolgenden Kollisionsaktivierung der phosphorylierten Fragmentionen können diese wiederum phosphorylierungsspezifischen Markerionen bilden und dadurch Signale im Vorläuferionen-Spektrum erzeugen. Damit werden bei der Datenauswertung Phosphopeptide unter Umständen falsch erkannt. Dies sollte besonders beim Einsatz der NanoES-Technik berücksichtigt werden, da hier aufgrund der langen Spektren-Akkumulation selbst äußerst schwach konzentrierte Peptidionen detektiert werden. Gegenüber der Neutralverlust-Analyse kann die Vorläuferionen-Analyse diesbezüglich aber als weniger kritisch eingestuft werden, da hier die Phosphopeptide infolge des hohen Kollisions-*Offsets* sehr stark fragmentiert werden und sich deshalb kaum größere Bruchstücke bilden.

6.5. *Positiv-Ionen-NanoES-MS/MS und -MS/MS/MS phosphorylierter Peptide*

Zur Detektion der Phosphopeptide werden die zuvor beschriebenen Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken eingesetzt. Die Ermittlung der exakten Position der phosphorylierten Aminosäurereste erfolgt mittels positiv-Ionen-MS/MS-Experimenten (Kap. 2.5.3.1) [321]. Bei der Kollisionsaktivierung von Peptiden (MS/MS) bilden sich infolge direkter Bindungsspaltungen entlang des Peptidrückgrates Fragmentionen (Kap. 2.4.4). Verbleibt bei der Fragmentierung die Ladung am N-terminalen Ende, so bilden sich x_n^- , y_n^- und z_n^- -Ionen; verbleibt die Ladung am C-terminalen Ende, so werden a_n^- , b_n^- und c_n^- -Ionen gebildet (Abb. 2.14, Kap. 2.4.4). Aufgrund der basischen C-terminalen Aminosäurereste (Lysin oder Arginin), eignen sich tryptische Peptide besonders gut für Sequenzierungsexperimente. Wie bei der Untersuchung der Neutralverlust- und Vorläuferionen-Analyse phosphorylierter Peptide beobachtet werden konnte, haben die Phosphatreste einen erheblichen Einfluss auf die Bildung der Fragmentionen und wurden deshalb experimentell untersucht (Kap. 5.5). Als Modellpeptid wurde phosphoryliertes (Tyrosinrest) und nicht-phosphoryliertes pp60c-src-Peptidfragment eingesetzt. Die Tochterionenspektren der $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülionen wurden jeweils unter identischen CID-Bedingungen aufgenommen (Abb. 5.28 und 5.30). Bei dem phosphorylierten Peptid konnte die Tyrosinphosphorylierung anhand des 243 Da großen Abstandes zwischen den y_7^- und y_8^- -Fragmentionen bzw. den b_6^- und b_7^- -Fragmentionen lokalisiert werden (Abb. 5.28) [363]. Beim nicht-phosphorylierten Peptid konnte dagegen ein 163 Da großer Abstand (Tyrosinrest) zwischen den entsprechenden Fragmentionen ermittelt werden (Abb. 5.30). Im Vergleich zu dem nicht-phosphorylierten Peptid waren im Tochterionenspektrum des phosphorylierten Peptids deutlich weniger, als auch weniger intensive Fragmentionen enthalten (Abb. 5.29 u. 5.31). Nach Yates *et al.* beobachtet man bei der Sequenzierung phosphorylierter Peptide ein schlechteres S/N-Verhältnis. Die Phosphopeptide sind nur schwach basisch und liegen zudem nur gering konzentriert vor [247]. Außerdem bilden sich bei phosphorylierten Peptiden die $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülionen unter sauren Bedingungen im Vergleich zu den nicht-phosphorylierten Peptiden erheblich schlechter, so dass insgesamt weniger Molekülionen für die Kollisionsaktivierung zur Verfügung stehen (siehe Kap. 6.4). Im Falle des Tyrosin-phosphorylierten Peptids konnte ein ausgeprägter $H_3PO_4^-$ bzw. HPO_3^-

Neutralverlust (49 bzw. 40 Da, bei $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülonen) nicht beobachtet werden [303,348]. Bei der MS^3 -Sequenzierung des Serin-phosphorylierten Peptids war dagegen ein intensiver Neutralverlust zu beobachten (Kap. 5.5.2, Abb. 5.32, s.u.). Infolge eines H_3PO_4 -Neutralverlustes werden in den CID-Spektren die b- und y-Fragmentionen sehr oft von $y_n-H_3PO_4$ - bzw. $b_n-H_3PO_4$ -Satellitenpeaks (bzw. HPO_3) begleitet [144,360,367]. Im vorliegenden Experiment wurde jedoch nur ein einziger Satellitenpeak beobachtet (Abb. 5.28). Wie zuvor erwähnt, lassen sich bei einem Ionenfallen-CID aufgrund nicht vorhandener Folgezerfälle sehr intensive Neutralverlust-Fragmentionen beobachten [348,349] (Kap. 5.11). Beim CID in einer rf-only-Quadrupolzelle werden im Vergleich dazu sehr intensive Folgezerfälle beobachtet. Aufgrund der relativ langen Aufenthaltsdauer der Ionen in einer q2-Kollisionszelle (mehrere Millisekunden) können primär erzeugte Fragmentionen in weiteren Folgezerfällen fragmentiert werden. Die Intensität der signifikanten Ionen nimmt beim q2-CID deshalb ab, der Untergrund des Spektrums bzw. das Rauschen gleichzeitig stark zu. Bei der Sequenzierung von Phosphopeptiden kann dieses Verhalten auf sehr elegante Weise ausgenutzt werden. Indem ein höherer CID-Offset eingestellt wird, erfolgt automatisch eine Gasphasendephosphorylierung der Phosphopeptidionen. Durch erneute Kollisionsanregung können die gebildeten Neutralverlust-Fragmentionen ebenfalls zerfallen. Somit werden intensive Fragmentionen gebildet, anhand derer die Phosphopeptide unter Berücksichtigung der Gasphasendephosphorylierten Aminosäuren interpretiert werden können (siehe Kap. 5.11.6). Alternativ wäre ebenfalls eine Sequenzierung im negativen Ionenmodus vorstellbar. Die ersten Experimente hierzu wurden in unserem Labor schon durchgeführt. Insbesondere bei der negativ-Ionen-on-line-LC-MS/MS-Analyse unter alkalischen Bedingungen lässt sich dabei ein großes analytisches Potential erkennen (Daten nicht gezeigt).

Durch die Anordnung der Quadrupole können mit einem Triple-Quad-MS auch MS^3 -Experimente durchgeführt werden (Kap. 2.2.3, Abb. 2.7). Die erste Fragmentierung erfolgt dabei im Skimmer-Bereich (API-CID [223]), die zweite Fragmentierung in der Kollisionszelle (q2). In den vorliegenden ESI-MS-Experimenten wurde das Hitzeschockpeptid bei einem hohen Skimmer-Potential einer Kollisionsaktivierung unterzogen (API-CID). Unter diesen Bedingungen wurde das $[M+2H]^{2+}$ -HSP-Quasimolekülion (m/z 821,3) dabei einer H_3PO_4 -Neutralverlust-Reaktion unterzogen. Das resultierende $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmention wurde anschließend in Q1 isoliert und in q2 fragmentiert (Abb. 5.32). Infolge der Gasphasendephosphorylierung bildete sich aus dem Phosphoserinrest entsprechend De Gnore und Qin bzw. Reid *et al.* ein Dehydroalanin- (69,1 Da) bzw. ein Aziridinrest [348,582]. Unter Berücksichtigung des entstandenen Dehydroalanin- bzw. Aziridinrestes konnte somit zwar die Position der Phosphorylierung ermittelt werden, jedoch war eine relativ große Phosphopeptidmenge erforderlich. Zudem hat das Verfahren den Nachteil, dass beim API-CID keine Ionen isoliert werden können. Diesbezüglich ist die Ionenfalle dem Triple-Quad-MS eindeutig überlegen [348,349]. Außerdem lässt sich bei einer Ionenfalle aufgrund der Abwesenheit von Folgezerfällen sowie der Möglichkeit Ionen über einen längeren Zeitraum zu speichern eine weitaus höhere Empfindlichkeit beobachten (niedriger femtomolarer Bereich, Kap. 5.11). Des Weiteren hat die Ionenfalle den Vorteil, dass die in der Falle erzeugten Fragmentionen wiederum isoliert und mehrfach weiterfragmentiert werden können (bis MS^{11}).

6.6. Analyse eines tryptischen β -Caseinverdaus mittels NanoES-MS

Da es sich bei β -Casein um ein gut untersuchtes und hoch phosphoryliertes Protein handelt [341,342], wurde dieses als Modellprotein zur Überprüfung der NanoES-MS-basierenden phosphorylierungs-spezifischen Scantechniken eingesetzt (Kap. 5.6). Das β -Casein wurde tryptisch in Lösung gespalten und bei den Analysen in verdünnter Form eingesetzt (5 pmol absolut), so dass eine Entsalzung der Probe nicht erforderlich war (Kap.5.6). In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Marino *et al.* [341], Petrilli *et al.* [342] sowie Liao *et al.* [309] und Neubauer *et al.* [235] konnten mit Hilfe der durchgeführten Scantechniken die beiden tryptischen Phosphopeptide des β -Caseins eindeutig bestimmt werden (Tab. 5.4). Im positiven Ionenmodus konnte das einfach-Serin-phosphorylierte Peptid F⁴⁸QpS^{EE}QQTEDELQDK⁶³ sowohl im Übersichtsspektrum (Abb. 5.36) als auch bei der Neutralverlust-Analyse auf 49 Da anhand seines [M+2H]²⁺-Quasimolekülions bei m/z 1031,8 detektiert werden (Abb. 5.37). Das 4-fach phosphorylierte Peptid R¹⁶ELEELNVPGEIV-EpSLpSpSpSEESITR⁴⁰ konnte unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden. Aufgrund der vier vorhandenen Phosphatreste verringerte sich die Ionisierungseffizienz des Peptids wahrscheinlich so stark, dass sich keine Molekülionen ausbilden konnten. Bei der Neutralverlust-Analyse konnten von diesem Phosphopeptid deshalb ebenfalls keine Signale beobachtet werden (siehe Kap. 6.4.2). Im negativen Ionenmodus konnten die beiden Phosphopeptide dagegen schon in den Übersichtsspektren detektiert werden. Durch den Polaritätswechsel kam es zur Änderung der Ladungsverteilung in den NanoES-Tröpfchen und der Oberflächenaktivitäten der einzelnen Analytionen. Aufgrund des *Wong-Way-Round*-Effektes (Kap. 2.1.4.3) verringerte sich infolge des Polaritätswechsels das beobachtete S/N-Verhältnis, außerdem konnte eine Änderung der Signalintensitäten der Peptidionen beobachtet werden. Tendenziell wurde eine Unterdrückung stark basischer Peptidionen, bei gleichzeitig verbesserter Ionisierung saurer Peptide, insbesondere von Phosphopeptiden, beobachtet. Der pH-Wert der Spraylösung hatte einen besonders starken Einfluß auf die m/z 79-Vorläuferionen-Spektren (Abb. 5.39 und 5.41). Unter sauren Bedingungen dominierte im Vorläuferionen-Spektrum das [M-2H]²⁻-Signal des einfach-phosphorylierten Peptids bei m/z 1029,9, wogegen das Signal des vierfach-phosphorylierten Peptids nur sehr niedrig war (Abb. 5.39). Unter alkalischen Bedingungen dominierte dagegen das [M-2H]²⁻-Signal des vierfach-phosphorylierten Peptids (Abb. 5.41). Nach der Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung war kein *Wrong-Way-Round*-Effekt mehr vorhanden [88-90]. Die Oberflächenaktivität des vierfach-phosphorylierten Peptids erhöhte sich besonders stark und bewirkte dadurch die stark verbesserte Ionisierung. Das deutlich basischere einfach-phosphorylierte Peptid hat unter den alkalischen Bedingungen eine erheblich geringere Oberflächenaktivität und ionisierte deshalb weniger effektiv (Abb. 5.41) [256,367].

In einem zusätzlichen Experiment wurde das einfach-phosphorylierte Peptid mittels Tandem-MS/MS im positiven Ionenmodus sequenziert. Anhand des Tandem-Massenspektrums konnte das β -Casein sowohl mit Mascot als auch mit SEQUEST identifiziert werden, wobei auch die Position der Phosphorylierung eindeutig bestimmt werden konnte (Kap. 5.6.8).

Die NanoES-MS-Analyse der tryptischen Phosphopeptide des β -Caseins erforderte somit keine chromatographische Vorreinigung des Proteinverdaus. Nur bei der Vorläuferionen-Analyse war die Detektion beider tryptischer Phosphopeptide möglich. Die Identifizierung zeigte deutlich, dass die Methode auch zur Analyse unbekannter Phosphoproteine angewendet werden kann. Einschränkend muss aber erwähnt werden, dass der Phosphorylierungsgrad beim β -Caseins 100 % beträgt. Die Analyse von Proteinen mit einer geringen Phosphorylierungsstöchiometrie gestaltet sich dementsprechend schwieriger. Zudem ist besonders bei größeren Phosphoproteinen eine chromatographische Vorfraktionierung anzuraten [235] (siehe Kap. 5.9.2). Aufgrund der langen zur Verfügung stehenden Messzeit

hat die NanoES-MS-Technik [103,104] den Vorteil, dass die MS-Parameter während der Analyse optimiert werden können. Durch die Möglichkeit viele einzelne Scans zu akkumulieren kann selbst bei schwach konzentrierten Proben ein hohes S/N-Verhältnis erzielt werden [39]. Wie schon Carr *et al.* [367] zeigen konnten, kann die Ionisierungseffizienz der Phosphopeptide durch Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung erheblich verbessert werden und ermöglicht dadurch eine Steigerung der Sensitivität bis in den unteren femtomolaren Bereich. Aufgrund einer fehlenden phosphorylierungsspezifischen Markerionenspur bleibt bei den Analysen aber stets unklar, ob alle vorhandenen Phosphopeptide bei der Analyse erfasst wurden. Durch die Spaltung des Phosphoproteins mit unterschiedlichen Enzymen könnte dieses Problem aber vermieden werden, setzt aber voraus, dass genügend Protein vorhanden ist [235]. Problematisch bleibt auch die MS/MS-Sequenzierung der Phosphopeptide. Besonders bei gering konzentrierten Phosphopeptiden ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Intensität der Phosphopeptid-Molekülonen zur Generierung verlässlicher Tochterionenspektren nicht ausreicht [315]. Zur Sequenzierung sollte deshalb ein Ionenfallen-MS-Gerät eingesetzt werden, da hier die Ionen über einen längeren Zeitraum gespeichert werden können und aussagekräftigere MS³-Sequenzierungen durchgeführt werden können (Kap. 5.11).

6.7. *On-line-μIMAC/ESI-MS- und off-line-μIMAC-NanoES-MS-Analyse von Phosphopeptiden*

Bei Phosphopeptid-Analysen kann die Selektivität sowohl massenspektrometrisch (Neutralverlust-, Vorläuferionen-Scantechniken, API-CID) als auch chromatographisch verbessert werden. Bei der Chromatographie macht man sich dabei die hohe Bindungsaffinität von phosphorylierten Peptiden und Fe³⁺- bzw. Ga³⁺-Ionen zunutze (Kap. 2.5.3.2). In den vorliegenden Experimenten wurde, entsprechend Watts *et al.* [338], eine mit einem aktivierten Metallchelate gefüllte fused silica Kapillarsäule (250 μm I.D.) verwendet (Kap. 5.7). Die μIMAC-Säule wurde *off-line* in Kombination mit der NanoES-MS und *on-line* in Kombination mit der ESI-MS zur selektiven Detektion von Phosphopeptiden eingesetzt (Kap. 5.7). Bei dem *off-line*-Experiment wurde tryptisch in Lösung verdautes β-Casein untersucht, bei dem *on-line*-Experiment wurden dem β-Caseinverdau zusätzlich synthetische Phosphopeptide beigemischt. Besonders bei der *on-line*-μIMAC/ESI-MS-Analyse konnte die Selektivität, mit welcher die Phosphopeptide von der μIMAC-Säule zurückgehalten werden, eindrucksvoll demonstriert werden (Abb. 5.48). Unter den alkalischen Bedingungen eluierten sämtliche in der Probe enthaltenen Phosphopeptide und konnten anhand ihrer zweifach bzw. dreifach positiv geladenen Molekülonensignale im ESI-Massenspektrum nachgewiesen werden. Durch den *Wrong-Way-Round*-Effekt (alkalische Lösung, positiver Ionenmodus) konnte nur ein relativ niedriges S/N-Verhältnis beobachtet werden. Das S/N-Verhältnis kann entweder durch negativ-Ionen-ESI-MS oder durch positiv-Ionen-ESI-MS nach RP-Entsalzung (saure Elution) erhöht werden [338,340,317]. Die seit kurzem kommerziell erhältlichen, alkali-stabilen RP-Materialien (z.B. Zorbax-Extend) ermöglichen aber auch eine der μIMAC-Anreicherung nachgeschaltete RP-LC/ESI-MS-Analyse. Dies ist besonders interessant, da sich das Verfahren *on-line* durchführen lässt. Bei gleichzeitiger Verbesserung der Ionisierung der Phosphopeptide können die Komponenten dabei gereinigt und getrennt werden (vgl. Kap. 6.4). Bei der *off-line*-Analyse konnte das 4-fach phosphorylierte tryptische β-Caseinpeptid nicht detektiert werden. Aufgrund nahezu identischer IMAC-Bedingungen ist dafür aber nicht die IMAC-Anreicherung, sondern sind vielmehr die in Kap. 6.4 und 6.5 diskutierten Ionisierungs- und Unterdrückungseffekte während der NanoES-MS-Analyse verantwortlich. Insgesamt haben die *on*- und *off-line*-Verfahren ihre individuellen Vorteile. Das *on-line*-Verfahren ermöglicht, insbesondere bei direkt nachgeschalteter NanoLC-Entsalzung, die

Analyse hoch komplexer Phosphopeptid-Mischungen einschließlich CID-Fragmentierung. Die Phosphorylierungsstöchiometrie der zu untersuchenden Phosphoproteine muss dazu aber hoch genug sein ($> 10\%$). Mit Hilfe des *off-line*-Verfahrens können zwar nur weniger komplexe Proben untersucht werden, jedoch können auch Proteine mit niedriger Phosphorylierungsstöchiometrie ($< 10\%$) oder sehr geringe Mengen von Phosphopeptiden untersucht werden [317].

Die IMAC-Technik hat aber auch einige Nachteile. Zhou *et al.* konnten zeigen, dass die Selektivität der Ga^{3+} - und Fe^{3+} -Metallionen sehr stark vom Phosphorylierungsgrad der Peptide abhängt [254]. Je nach verwendetem Metallion kann es deshalb vorkommen, dass Phosphopeptide nur unzureichend binden und deshalb nicht detektiert werden. Außerdem können die immobilisierten Metallionen auch saure und Lysin-haltige Peptide binden [352, 353]. Die IMAC-angereicherten Peptide sollten deshalb stets auf ihren Phosphatgehalt überprüft werden (phosphorylierungsspezifische MS-Scantechniken, CID-Sequenzierung, Umsetzung mit alkalischer Phosphatase (Kap. 2.5)). Des Weiteren kann es vorkommen, dass Phosphopeptide irreversibel an die Metallionen binden und selbst unter stark alkalischen Bedingungen nicht eluiert werden können. Ebenso kann es vorkommen, dass die Phosphopeptide bei der IMAC-Beladung unter den essigsauren Bedingungen nicht gelöst werden. Zudem können die von der IMAC-Säule eluierten Phosphopeptide bei der anschließenden Trocknung irreversibel an Gefäßwände und Oberflächen adsorbieren (insbesondere Metalloberflächen). Kleine und hydrophile Phosphopeptide können bei der nachfolgenden RP-chromatographischen Reinigung beim Probenbeladungsschritt durcheluieren, wogegen große und hydrophobe Peptide eventuell ungelöst zurückbleiben können [315]. Größter Nachteil der IMAC-Technik ist aber das Fehlen einer phosphorylierungsspezifischen Markerspur. Somit bleibt bei IMAC-basierenden Phosphopeptid-Analysen stets unklar, ob alle vorhandenen Phosphopeptide erfasst wurden. Außerdem können bei *'in vivo'*-Experimenten, im Gegensatz zu den API-CID-Techniken (Kap. 5.8), die Einflüsse unterschiedlicher Bedingungen auf die Proteinphosphorylierung (basal/stimuliert) nicht semiquantitativ miteinander verglichen werden.

6.8. Detektion von Phosphopeptiden mit Hilfe des API-CID

In Kapitel 6.4 und 6.5 wurde gezeigt, dass mit Hilfe der Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken Phosphopeptide äußerst empfindlich und hoch spezifisch detektiert werden können. Chait *et al.*, später auch Van Dongen *et al.*, konnten bei ihren Untersuchungen zeigen, dass Peptide beim CID innerhalb der Hochdruckregion zwischen Skimmer und dem ersten Massenanalysator (*in source*- bzw. Skimmer- oder API-CID) nahezu dieselben Fragmentierungsmuster ergeben, wie beim Niederenergie-Kollisionszellen-CID [119,125]. Bei ihren Untersuchungen von Phosphopeptiden konnten Huddleston *et al.* dann zeigen, dass das phosphorylierungsspezifische $[\text{PO}_3]^-$ -Markerion (m/z 79), welches auch bei der Kollisionszellen-basierenden Vorläuferionen-Analyse von Phosphopeptiden eingesetzt wird (Kap. 6.4.2), ebenfalls unter negativ-Ionen-API-CID-Bedingungen erzeugt werden kann [360]. Im Vergleich zu den Kollisionszellen-basierenden Scantechniken hat das API-CID-Verfahren aber den großen Vorteil, dass eine *on-line*-LC/ESI-Kopplung möglich ist. Somit kann bei einem LC/ESI-API-CID-Experiment (m/z 79) eine einem Cerenkov-Chromatogramm vergleichbare phosphorylierungsspezifische $[\text{PO}_3]^-$ -Markerionenspur generiert werden, anhand derer die Phosphopeptide detektiert werden können [360-364,367,391,583]. Das von Huddleston *et al.* entwickelte API-CID-Verfahren wurde schließlich von Jedrzejewski und Lehmann elegant weiterentwickelt. Während eines LC/ESI-MS-Experimentes konnten mit Hilfe einer programmierten Hybrid-Scan-Routine (Polaritäts- und *Offset*-Wechsel) innerhalb eines MS-Scans, sowohl m/z 79-Markerionen generiert (hohes

negativ-Ionen-Skimmer-Potential), als auch die intakten Phosphopeptid-Molekülonen (niedriges positiv-Ionen-Skimmer-Potential) bestimmt werden [364]. Aufgrund der TFA-sauren RP-Chromatographie haben die erwähnten phosphorylierungsspezifischen API-CID-Verfahren [360-364,367,391] jedoch den Nachteil, dass es zum Auftreten von *Wrong-Way-Round*-Effekten kommt.

Basierend auf den bekannten LC/ESI-API-CID-MS-Verfahren (saure Elution) wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Hybrid-Scan-Routine entwickelt (Kap. 4.3.10.5, Abb. 5.50) und zur Analyse eines tryptischen Verdaus von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem β -Casein (200 pmol) angewendet (Kap. 5.8.1.3 u. 5.8.1.4). Der für die optimale Erzeugung der $[\text{PO}_3^-]$ -Markerionen erforderliche API-CID-*Offset* wurde mit Hilfe synthetischer Phosphopeptide ermittelt (Abb. 5.49). Interessanter Weise konnte sowohl bei dem Serin- als auch bei dem Tyrosin-phosphorylierten Peptid für das ebenfalls aufgezeichnete $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ -Markerionen (m/z 97) eine höhere Intensität im Vergleich zum $[\text{PO}_3^-]$ -Markerion beobachtet werden. Die Verwendung von TFA als LC-Ionenpaarreagenz verhinderte jedoch die Anwendung des m/z 97-Markerions zur Detektion von Phosphopeptiden, da sich infolge der Kollisionsaktivierung $[\text{C}_2\text{F}_3\text{O}^-]$ -Fragmentionen, ebenfalls bei m/z 97 bildeten. Anhand der bei dem $\mu\text{LC/ESI-API-CID-MS-Hybrid-Scan-Experiment}$ aufgezeichneten m/z 79-Markerionenspur konnten bei der phosphorylierten β -Caseinprobe zwei Phosphopeptide detektiert werden (Abb. 5.51 und 5.52, Tab. 5.7), wogegen bei der nicht-phosphorylierten Probe keine Phosphopeptide zu beobachten waren (Abb. 5.54 und 5.55). Dies unterstreicht eindrucksvoll die hohe Spezifität des Hybrid-Scan-Verfahrens bei der Detektion phosphorylierter Peptide. Anhand des beobachteten S/N-Verhältnisses kann abgeschätzt werden, dass 50-100 pmol des Proteinverdaus für die Analyse ausgereicht hätten. Im Vergleich zu den entsprechenden nicht-phosphorylierten Peptiden eluieren die phosphorylierten Peptide bei der LC schneller. Durch die anwesenden Phosphatreste werden die Peptide hydrophiler und eluieren deshalb früher von der RP-HPLC-Säule [256,363]. Bei dem vierfach-phosphorylierten Peptid war dieser Effekt besonders stark, da hier der Anteil der Phosphatgruppen in Relation zum Gesamtpeptid besonders hoch ist. Somit konnten die von Huddleston *et al.* [360] bzw. Lehmann *et al.* [364] entwickelten API-CID-Methoden erfolgreich zur Detektion der Phosphopeptide des β -Caseinverdaus angewendet werden.

Wie bei der Untersuchung der $[\text{PO}_3^-]$ -Vorläuferionen-Scantechnik (Kap. 5.4 und 5.6) gezeigt werden konnte, wird die Empfindlichkeit durch TFA-saure Bedingungen sehr stark einschränkt. Durch Verwendung einer alkalischen Spraylösung lässt sich dagegen die Empfindlichkeit deutlich verbessern (Kap. 6.4.2). Es stellte sich deshalb die Frage, welchen Einfluss alkalische Bedingungen auf:

1. die Bildung der phosphorylierungsspezifischen Markerionen beim API-CID,
2. die Ionisierung der Phosphopeptide und
3. das chromatographische Verhalten der Phosphopeptide haben.

Beim negativ-Ionen-API-CID werden infolge der Spaltung der Phosphoesterbindungen die phosphorylierungsspezifischen $[\text{PO}_3^-]$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ -Markerionen (m/z 79 bzw. m/z 97) gebildet (Abb. 5.56). Bei pH-Wert 10,3 und 40-90 V Q0-*Offset* konnte für beide Fragmentionen eine maximale Ausbeute beobachtet werden (Abb. 5.57). Die Verläufe der m/z 79- und m/z 97-Fragmentionen-Intensitäten, welche bei den Serin- und Tyrosin-phosphorylierten Peptiden beobachtet wurden, sprechen für einen identischen Fragmentierungsmechanismus. Der hohe *Offset*, welcher zur Erzeugung der Fragmentionen notwendig ist, weist deutlich auf eine direkte Spaltung der C-O-P-Phosphoesterbindungen hin (Abb. 5.57 und 5.58). Die m/z 97-Ionen werden durch Spaltung der C-O-Bindung, die m/z 79-Ionen durch Spaltung der O-P-Bindung gebildet [346,361,362,364]. Bei hohen API-CID-*Offset*-Werten war die Intensität der m/z 79-Ionen gegenüber den m/z 97-Ionen deutlich höher. Durch die starke Kollisionsanregung verlieren die primär gebildeten m/z 97-Ionen vermutlich

in einer Neutralverlustreaktion H_2O (18 Da) und bilden somit ebenfalls $[\text{PO}_3]^-$ -Ionen (Abb. 5.58). Unter alkalischen Bedingungen (pH 10,5) konnte eine 3-4-fach höhere Intensität der m/z 79-Fragmentionen (Abb. 5.58) im Vergleich zu den TFA-sauren Bedingungen beobachtet werden. Dies ist eindeutig auf die effizientere Bildung der Phosphopeptid-Molekülionen zurückzuführen (siehe Kap. 6.4.2). Durch die hervorragende Empfindlichkeit des Hybrid-Scan-Verfahrens konnten bei Verwendung des Standard ESI-*Interfaces* 125 $\text{fmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ Phosphopeptid, bei einem S/N-Verhältnis von etwa 3 (sowohl Fragment- als auch Molekülionen) detektiert werden (Abb. 5.60). Aufgrund der Abwesenheit der $[\text{C}_2\text{F}_3\text{O}]^-$ -Fragmentionen konnte außerdem, im Gegensatz zu den TFA-sauren Bedingungen, auch das $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Ion als Markerion eingesetzt werden (Abb. 5.59).

Abschließend wurde ein tryptischer β -Caseinverdau unter alkalischen LC-Bedingungen mit Hilfe des negativ-Ionen-API-CID-Experimentes untersucht (Kap. 5.8.2.3). Zuerst wurden dazu die intakten Peptid-Molekülionen mit Hilfe eines negativ-Ionen- $\mu\text{LC}/\text{ESI-MS}$ Experimentes (niedriger *Q0-Offset*) ermittelt (Abb. 5.61 bzw. 5.62). Danach wurden unter identischen chromatographischen Bedingungen die phosphorylierungsspezifischen Markerionenspurten mit Hilfe eines $\mu\text{LC}/\text{ESI-API-CID-MS}$ -Experimentes (hoher *Q0-Offset*) aufgezeichnet (Abb. 5.61). Mit Hilfe beider Experimente konnte sowohl das einfach-phosphorylierte tryptische β -Caseinfragment $\text{F}^{48}\text{QpSSEEQQTEDELQDK}^{63}$, das vierfach-phosphorylierte Fragment $\text{R}^{16}\text{ELEELN-VPGEIVEpSLpSpSpSEESITR}^{40}$, sowie das nicht fehlgeschnittene vierfach-phosphorylierte Fragment $\text{E}^{17}\text{LEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR}^{40}$ detektiert werden (Abb. 5.62). Aufgrund der effizienteren Ionisierung erzeugten die Phosphopeptide im Vergleich zu den übrigen Peptidionen deutlich intensivere Signale im RIC. Bei dem vierfach-phosphorylierten Peptid war dieser Effekt aufgrund der vier vorhandenen Phosphatreste besonders ausgeprägt. Aufgrund der alkalischen Bedingungen lagen die Phosphopeptide in stark deprotonierter Form vor [5,256]. Während der Chromatographie eluierten die Phosphopeptide deshalb weit vor allen anderen Peptiden (Abb. 5.61). Abschließend konnte am Beispiel des Serin-phosphorylierten Hitzeschock-Peptid-Fragmentes gezeigt werden, dass die entwickelte negativ-Ionen- $\mu\text{LC}/\text{ESI-API-CID-MS}$ -Hybrid-Scan-Routine die vollautomatische Detektion ($[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Markerionenspur) und Identifizierung von Phosphopeptiden ermöglicht (Kap. 5.8.2.5).

Die gezeigten Experimente demonstrieren deutlich das analytische Potential der alkalischen negativ-Ionen- $\mu\text{LC}/\text{ESI-API-CID-MS}$ -Methode. Im Vergleich zu den Kollisionszellen-basierenden Scantechniken (Kap. 5.4) sprechen dabei mehrere Aspekte für die bessere Leistungsfähigkeit des Skimmer-CID-Verfahrens. Zwar ermöglicht die Kopplung der NanoLC mit modernen MS-Geräten (IT-, QqTOF-MS) eine sehr empfindliche Detektion phosphorylierter Peptide (positiv-Ionen-LC/ESI-MS/MS-Analyse [298]), jedoch bleibt bei diesen Verfahren stets unklar, ob alle vorhandenen Phosphopeptide bei der Analyse erfasst wurden. Außerdem können isobare Peptide oder Signalunterdrückung durch coeluiierende Peptide sowie qualitativ schlechte Fragmentionenspektren dazu führen, dass bei der Analyse unvollständige oder falsche Informationen gewonnen werden. Bei API-CID-basierenden Methoden können diese Probleme vermieden werden, da hier durch die rasche Änderung des Kollisions-*Offset*-Potentials während eines LC/ESI-MS-Experimentes sowohl Informationen über die erzeugten modifikationsspezifischen Fragmentionen als auch über die intakten Molekülionen erhalten werden [363]. Dies ist bei einem Kollisionszellen-basierenden Verfahren nicht möglich. Die Zeit, welche zum Fluten und Abpumpen der Kollisionszelle mit Stossgas erforderlich ist, ist im Vergleich zu der chromatographischen Elutionszeit eines Peptids zu lange. Der API-CID hat zwar den Nachteil, dass alle vorhandenen Molekülionen gleichzeitig fragmentiert werden (einzelne Ionen können nicht isoliert werden [119]), jedoch erweist sich diese Charakteristik als besonders vorteilhaft. Beim q2-CID können die Ionen nur innerhalb eines sehr engen m/z -Bereichs selektiert und fragmentiert werden. In der Regel

isoliert man höher geladene Molekülionen (2-fach oder 3-fach geladene Molekülionen), da diese schon bei geringeren Kollisionsanregungspotentialen zerfallen. Da Druck und Zusammensetzung des Stossgases in der Kollisionszelle sehr homogen sind und zudem fest eingestellt werden, kann die q2-Fragmentierung lediglich über den Kollisions-*Offset* kontrolliert werden. Abhängig von ihrer Größe und Zusammensetzung zeigen Peptide aber ein sehr unterschiedliches Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten. In der Praxis werden deshalb Kollisionseinstellungen verwendet, welche mit Hilfe synthetischer Peptide experimentell ermittelt werden. In der Regel kann beim q2-CID deshalb eine mehr oder minder gute Fragmentierung beobachtet werden. Bei genauerer Betrachtung des API-CID lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. Da Druck und Zusammensetzung der Gasphase innerhalb des Skimmer-Bereichs sehr inhomogen sind (Luft- und Lösungsmittelmoleküle, Peptidionen) können beim API-CID (hoher Q0-*Offset*) deshalb alle vorhandenen unterschiedlich geladenen Peptid-Molekülionen mit Molekülen unterschiedlichster Größe und Geschwindigkeit kollidieren. Setzt man voraus, dass die Peptidionen eine genügend große mittlere freie Weglänge haben, welche zur Fragmentierung ausreicht, so ist für ein gegebenes Peptidion beim API-CID die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fragmentierung deutlich größer im Vergleich zum q2-CID. Diese physikalischen Verhältnisse spielen auch bei möglichen Folgezerfällen eine wichtige Rolle, da hier die primär gebildeten Fragmentionen (u.a. phosphorylierte Peptidionenfragmente) wiederum sehr effizient zerfallen können (Bildung von $[\text{PO}_3]^-$ - oder $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Ionen). Aufgrund der sehr starken, relativ breiten und unspezifischen Kollisionsaktivierung kann beim API-CID somit ein sehr effizientes Fragmentierungsverhalten beobachtet werden. Bei der Erzeugung der $[\text{PO}_3]^-$ - und $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ -Markerionen konnte dieser Effekt durch die alkalischen Spraybedingungen zusätzlich verstärkt werden. Bei der negativ-Ionen-ESI-MS wirken die Phosphatgruppen zwar stabilisierend auf die Phosphopeptid-Anionen, jedoch kommt es bei einer zu starken Anhäufung negativer Ladungen zu elektrostatischen Spannungen (Coulomb-Abstoßung), so dass die Phosphopeptide leichter fragmentieren können. Außerdem liegt, im Vergleich zu den auf TFA-sauren LC-Bedingungen basierenden API-CID-Verfahren [346,361,362,364], kein *Wrong-Way-Round*-Effekt vor, so dass die Ionisierung der Phosphopeptide unter den alkalischen Bedingungen sehr viel effizienter verläuft. Da bei der in Kap. 5.8.2.5 vorgestellten Hybrid-Scan-Methode gegenüber dem von Lehmann *et al.* [364] entwickelten Verfahren keine Messzeit durch ständige Polaritätswechsel verloren wurde, konnte eine zusätzliche Erhöhung der Sensitivität erreicht werden.

Aufgrund der direkten LC-Kopplung ergeben sich bei dem LC/ESI-API-CID-Verfahren weitere Vorteile gegenüber den *off-line*-NanoES-MS-basierenden Scantechniken. Die Peptidmischungen werden während der Chromatographie gleichzeitig getrennt, gereinigt und aufkonzentriert. Besonders bei Proteinen mit geringer Phosphorylierungsstöchiometrie verringert sich dadurch die Gefahr von Signalunterdrückungen durch coeluiierende Peptide [364]. Durch die starke Konzentration der einzelnen Komponenten nimmt die Konzentration der Analyten im Peakmaximum stark zu und führt damit zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit [92,101]. Reduziert man zusätzlich den Innendurchmesser der Trennsäulen und setzt dabei gleichzeitig eine Mikro-ESI-Quelle ein, so ist dieser Effekt besonders stark, da hier das konzentrationsabhängige Verhalten der ESI ebenfalls zum Tragen kommt [92,364]. Bei der diesjährigen ASMS-Konferenz in Orlando (Florida) konnten wir über eine neue negativ-Ionen- $\mu\text{LC}/\text{Micro-ESI-API-CID-MS}$ -Methode (alkalische Bedingungen, einschließlich Fraktionierung, Kap. 5.11) berichten, mit welcher wir die Phosphorylierungsstelle eines im Gel-verdauten Phosphoproteins (25 pmol, Phosphorylierungsstöchiometrie <5 %) identifizieren konnten (Daten werden nicht gezeigt). Die Methode zeichnet sich insbesondere durch die phosphorylierungsspezifische API-CID-Markerionenspur aus. Entsprechend einem Cerenkov-Chromatogramm können anhand der

Markerionenspur die Phosphopeptide spezifisch und hoch empfindlich detektiert werden ohne dass eine radioaktive Markierung erforderlich ist. Somit kann zu nahezu 100 % sichergestellt werden, dass bei der Analyse alle vorhandenen Phosphorylierungen erfasst werden. Zudem können bei unterschiedlichen zellulären Bedingungen (basal/stimuliert) die Phosphopeptid-Muster der einzelnen Spuren direkt miteinander verglichen werden und so die Funktion und der Einfluss bestimmter Phosphorylierungen genauer untersucht und verstanden werden.

6.9. *'In vivo'*-Phosphorylierung der HIR-b-UE und deren Einfluss auf die Substrat- und Autophosphorylierung

6.9.1. *Untersuchung des Einflusses der Serinreste 1177/78/82 des HIR auf die 'in vivo'*-Substrat- und Autophosphorylierung

Bei diesem Experiment sollte *'in vivo'* der Einfluss der Serinreste 1177/78/82 des humanen Insulinrezeptors auf dessen Autophosphorylierung untersucht werden. Aufgrund des Zellkultur-Ansatzes lag lediglich eine sehr geringe Proteinmenge vor, weshalb eine radioaktive Markierung mit [³²P] durchgeführt wurde (Kap. 5.9.1.1). Um den Einfluss der drei Serinreste untersuchen zu können wurden der radioaktiv markierte Wildtyp und die Mutante (Ser1177/78/82Ala) des Insulinrezeptors mit Hilfe eines [³²P]-RP-HPLC-Phosphopeptid-*Mapping* direkt miteinander verglichen. Für das [³²P]-RP-HPLC-Phosphopeptid-*Mapping* wurden die Proteine zunächst tryptisch im Gel gespalten. Aufgrund der geringen Proteinmenge konnten in den ermittelten RP-UV-Chromatogrammen kaum UV-Signale beobachtet werden (Abb. 5.65). Mit Hilfe der *off-line* erstellten [³²P]-Cerenkov-Chromatogrammen konnten die Phosphopeptide aber sehr sensitiv und selektiv detektiert werden (Abb. 5.66 u. 5.67). Bei den [³²P]-Cerenkov-Signalen handelt es sich um die tryptischen Phosphopeptide aus der regulatorischen Schleife, in welcher hauptsächlich der insulinstimulierte Phosphateinbau stattfindet (Kap. 2.6.3) [408]. Zum einen bewirkte die Insulinstimulierung beim Wildtyp eine 3-fache Zunahme der Phosphorylierungsstöchiometrie. Zum anderen trat bei $R = 29$ min ein neues Signal auf, welches nach White *et al.* dem tryptischen 2-fach Tyrosin-phosphorylierten Peptid aus der HIR-Tyrosinkinase-Domäne entspricht (Abb. 5.66) [408]. Anhand der ermittelten [³²P]-Cerenkov-Chromatogrammen konnte bei Insulinstimulierung kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Der Austausch der Serinreste hatte somit keinen Einfluss auf den [³²P]-Einbau innerhalb der regulatorischen Schleife (Abb. 5.67). Bei dem ebenfalls durchgeführten MALDI-TOF-Peptid-*Mapping* konnte eine Sequenzabdeckung der HIR- β -UE von 60,9 % erzielt werden (Abb. 5.69). Die massenspektrometrisch ermittelten Peptide, welche in der Literatur beschriebene Phosphorylierungen enthielten, wurden in Tab. 5.10 aufgelistet. Die Genauigkeit der Peptidmassenbestimmung war entsprechend den Experimenten von Schneider *et al.* hoch genug um isobare Peptide unterscheiden zu können [303]. Dennoch wurden nur sehr wenig Peptidionen gefunden, welche mit theoretisch berechneten Phosphopeptiden übereinstimmten. Dies hat mehrere Gründe. Zunächst konnte der Verlust stark phosphorylierter hydrophiler Peptide [145,315,347] während der RP-LC ausgeschlossen werden, da dies in den [³²P]-Cerenkov-Chromatogrammen zu sehen gewesen wäre. Bei ihren Experimenten konnten Roepstorff *et al.* zeigen, dass bei der positiv-Ionen-MALDI-MS die phosphorylierten Peptide im Vergleich zu nicht-phosphorylierten schlechter ionisieren [256]. Außerdem wird die Ionisierung der Phosphopeptide durch gut ionisierende Peptide unterdrückt [256]. Hauptgrund weshalb nur wenige Phosphopeptide detektiert werden konnten war aber sicherlich die niedrige Phosphorylierungsstöchiometrie die dazu führte, dass die Konzentration der Phosphopeptide äußerst gering war [315].

Aus den *'in vivo'*- ^{32}P -Markierungsexperimenten kann aufgrund der identischen Cerenkov-LC-Profile der hauptsächlich auftretenden tryptischen Phosphopeptide geschlossen werden, dass der Serinaustausch keinen Einfluss auf die Autophosphorylierungskaskade des HIR hatte. Beim Vergleich der Cerenkov-Spuren (HIR1177/78/82-Mutante und HIR-Wildtyp) war kein Verlust eines tryptischen Phosphopeptids erkennbar. Man kann deshalb annehmen, dass es sich bei den Serinresten 1177/78/82 nicht um Hauptphosphorylierungsstellen des HIR handelt. Die Autophosphorylierung der HIR1177/78/82-Mutante war zwar normal, jedoch konnte eine deutliche Abnahme sowohl der Tyrosinphosphorylierung von endogenem IRS-1 als auch der Aktivierung der PI3-Kinase festgestellt werden [558]. Die Abnahme der Kinaseaktivität konnte ebenfalls bei der *'in vitro'*-Phosphorylierung von rekombinatem IRS-1 beobachtet werden [558]. Somit kann es sich bei den Serinresten auch um untergeordnete Phosphorylierungsstellen handeln, die mit diesem experimentellen Ansatz nicht detektiert werden konnten. Die verschlechterte Signalkapazität der HIR1177/78/82-Mutante könnte die Folge eines verringerten Phosphattransfers zu seinem Substrat sein [558]. Insgesamt zeigen die Daten somit, dass bei der HIR1177/78/82-Mutante zwar eine veränderte Wechselwirkung mit den Substraten IRS-1, IRS-2 und SHC vorliegt, die Autophosphorylierungskapazität aber nicht eingeschränkt wird. Die Serinreste 1177/78/82 des HIR sind somit für die Autophosphorylierung des Rezeptors entbehrlich, für die Substratphosphorylierung aber notwendig [558].

6.9.2. *'In vivo'*-NanoES-MS-Vorläuferionen-Analyse der HIR-b-UE

Im vorhergehenden Kapitel wurde *'in vivo'* der Einfluss der Serinreste 1177/78/82 des humanen Insulinrezeptors auf dessen Autophosphorylierung untersucht. Wildtyp und mutierter Rezeptor wurden dazu unter basalen Bedingungen und nach Insulinstimulierung *'in vivo'* mit ^{32}P markiert und nach tryptischer Spaltung die Proteinphosphorylierung anhand der ^{32}P -RP-Cerenkov-Chromatogramme verglichen. Im vorliegenden Experiment (Kap. 5.9.2) wurden die enzymatisch erzeugten Phosphopeptide der β -UE des *'in vivo'*-insulinstimulierten HIR-Wildtyps ohne radioaktive Markierung mittels NanoES-MS-Vorläuferionen-Scantechnik (m/z 79, $[\text{PO}_3^-]$, Kap. 6.4.2) untersucht. Da es sich bei der β -UE des Insulinrezeptors um ein relativ großes Protein handelt, wurden die enzymatisch im Gel-erzeugten Peptide zur Vermeidung von Signalunterdrückungen (durch coeluiierende Peptide) mittels μRP -HPLC getrennt und fraktioniert (Abb. 5.71). Die enzymatische Spaltung erfolgte mit Lys-C. Im Vergleich zu Trypsin erhält man bei der Lys-C-Spaltung längere Peptidfragmente. Der relative Anteil der in Phosphopeptiden vorhandenen Phosphatreste nimmt bei größeren Peptiden ab, damit auch der Einfluss der Phosphatreste auf die ES-Ionisierung der Peptide. Mittels NanoES-MS/MS-Sequenzierung konnte die Proteinbande als die β -UE des HIR-WT identifiziert werden (Abb. 5.72 und 5.73). Trotz sehr niedriger Phosphorylierungsstöchiometrie konnten mit Hilfe der alkalischen m/z 79-Vorläuferionen-Analyse [366,367,370] zahlreiche Phosphopeptide detektiert werden (Abb. 5.74-5.76, Tab. 5.11), wobei festgestellt werden konnte, dass sich bei der Lys-C-Spaltung viele Peptide mit einer oder mehreren verpassten Schnittstellen bildeten. Die phosphorylierten Peptide eluierten aufgrund ihres hydrophileren Charakters, entsprechend den Beobachtungen von Roepstorff *et al.* [256] und Hunter *et al.* [363], vor den entsprechenden nicht-phosphorylierten Formen. Wie anhand der NanoES-MS-Übersichtsspektren zu sehen war, waren die einzelnen Fraktionen trotz LC-Trennung komplex zusammengesetzt. Da die Ionisierung der schwach konzentrierten Phosphopeptide durch hoch konzentrierte gut ionisierende Peptide unterdrückt wurde erschwerte sich die Detektion der Phosphopeptide zusätzlich [256,367,315]. Stark hydrophile Phosphopeptide konnten aufgrund der LC-Trennung nicht detektiert werden, da diese nicht von der RP-Säule zurückgehalten wurden [256,315,347]. In den einzelnen NanoES-

Massenspektren waren aufgrund der komplexen Zusammensetzung, verpasster Schnittstellen und Modifikationen relativ viele Ionensignale enthalten. Wie von Hunter *et al.* beschrieben [363], konnten etliche Signale aufgrund der großen Anzahl von vorhandenen isobaren Peptidmassen nicht eindeutig zugeordnet werden. Mit einem moderneren Triple-Quad-MS-Gerät hätten erheblich mehr Peptide identifiziert werden können, da diese Geräte neben einer höheren Empfindlichkeit auch über eine höhere Massengenauigkeit und Massenauflösung verfügen.

Zwar konnten mit Hilfe der Vorläuferionen-Scantechnik viele Phosphopeptide detektiert werden, dennoch sollte das Verfahren auch kritisch betrachtet werden, insbesondere gegenüber dem API-CID-basierenden Phosphopeptid-*Screening* (Kap. 5.8). Aufgrund des geringen Probenverbrauchs können bei der NanoES-MS über einen längeren Zeitraum hinweg viele einzelne MS-Scans akkumuliert werden. Damit kann selbst bei gering konzentrierten Proben ein gutes S/N-Verhältnis erzielt werden. Zudem können die Geräteparameter während der Analyse optimiert werden. Die manuelle Befüllung und das Zünden der Nanospraynadeln ist aber relativ zeitaufwendig, erfordert eine geübte Arbeitstechnik und stellt einen sehr schwer zu automatisierenden Prozess dar. Ebenfalls problematisch ist das *MS-Tuning*. Um eine hohe Empfindlichkeit erzielen zu können müssen die Geräteparameter sehr spezifisch eingestellt werden. Dies erfordert nicht nur ein tieferes Verständnis des Triple-Quad-MS sondern ist zudem auch sehr zeitaufwendig. Größte Nachteile sind aber die fehlende phosphorylierungsspezifische Markerionenspur anhand derer die Phosphopeptid-haltigen Fraktionen erkannt werden, sowie die stets komplexe Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen. Jede Fraktion muss deshalb separat auf ihren Phosphopeptidgehalt untersucht werden, wobei stets die erwähnten Unterdrückungseffekte auftreten. Die API-CID-Technik hat diesbezüglich klare Vorteile. Die neuesten Entwicklungen im Bereich der NanoLC ermöglichen heute den Einsatz von 75 μm I.D. Kapillarsäulen, welche bei Flussraten von ca. 200 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ betrieben werden können. Somit können geringste Probenmengen gleichzeitig gereinigt, getrennt und aufkonzentriert werden. Bei einem negativ-Ionen-NanoLC/ESI-API-CID-MS-Experiment, kann dadurch eine phosphorylierungsspezifische Markerionenspur generiert werden, anhand derer die Phosphopeptide extrem empfindlich detektiert werden können.

Die mittels m/z 79-Vorläuferionen-Analyse detektierten Phosphopeptide sind in Tab. 5.11 aufgelistet. Die Stimulierung mit Insulin führte zur Aktivierung der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase. Bei der Aktivierung des Insulinrezeptors werden mehrere Tyrosinreste innerhalb der β -UE in die Autophosphorylierungsreaktion miteinbezogen, unter anderem auch, wie White *et al.* zeigen konnten, die Tyrosinreste 1146/1150/1151 innerhalb der regulatorischen Schleife [408]. Bei den vorliegenden NanoES-MS-Untersuchungen wurden Peptide aus dem Bereich der regulatorischen Schleife gefunden, welche sowohl nicht-phosphoryliert (Abb. 5.76 und 5.77), einfach-Tyrosin-phosphoryliert (Abb. 5.76) und zweifach-Tyrosin-phosphoryliert waren (Abb. 5.75). Bei ihren Untersuchungen konnten White *et al.* [408] feststellen, dass bei *'in vivo'*-Insulinstimulierung die Tyr-1150-Domäne hauptsächlich zweifach-Tyrosin-phosphoryliert wird, wogegen die dreifach Tyrosin-phosphorylierte Form kaum zu beobachten war. Im Gegensatz dazu findet man bei *'in vitro'*-Insulinstimulierung hauptsächlich die dreifach-Tyrosin-phosphorylierte Form [408]. Die Tatsache, dass sich *'in vivo'*- und *'in vitro'*-Ergebnisse sehr häufig nicht entsprechen, konnte auch von Roepstorff *et al.* beobachtet werden [256]. Neben den zuvor beschriebenen Tyrosinresten wird die β -UE aber auch noch an den Tyrosinresten 1316/1322 innerhalb der C-terminalen Domäne sowie Y960 innerhalb der Juxtamembranregion autophosphoryliert [385,401-403]. Diese Tyrosinphosphorylierungen bzw. die entsprechenden Phosphopeptide konnten ebenfalls detektiert werden (Tab. 5.11). Somit konnten alle in der Literatur beschriebenen Tyrosin-Autophosphorylierungsstellen detektiert werden. Eine Sequenzierung

(CID) der Phosphopeptide konnte nicht erfolgen, da die Intensitäten der entsprechenden Peptidionen im positiven Ionenmodus zu gering waren. Des Weiteren konnten auch Phosphopeptide detektiert werden, welche in der Literatur beschriebene Serin- bzw. Threoninphosphorylierungen enthielten. Zum einen wurde ein einfach-phosphoryliertes Peptid, welches die beiden potentiell phosphorylierten Serinreste 1023/1025 enthält, gefunden [507]. Außerdem wurden zwei einfach-phosphorylierte Peptide gefunden, welche den potentiell phosphorylierten Threoninrest 1336 enthalten [510]. Eine genauere Lokalisierung dieser Phosphorylierungsstellen erfordert jedoch weitere Tandem-MS/MS-Experimente.

6.10. Untersuchung der 'in vitro'-Substratspezifität verschiedener PKC-Subtypen

Entsprechend ihren enzymatischen Eigenschaften werden die einzelnen Isoformen der PKC-Familie in klassische, neue und atypische PKCs eingeteilt (Kap. 2.6.11, Abb. 2.19). Pearson und Kemp [530] konnten zwar die allgemeine Phosphorylierungs-Konsensussequenz RXXS/TXRX (X ist eine beliebige Aminosäure) ermitteln, bei welchen die Serin- oder Threoninreste durch die PKCs phosphoryliert werden, jedoch zeigt jeder Subtyp dennoch eine individuelle Substratspezifität (Kap. 5.10). Um die Substratspezifitäten unterschiedlicher PKC-Subtypen 'in vitro' semiquantitativ untersuchen zu können wurde deshalb ein LC/ESI-MS-basierendes Verfahren entwickelt (Kap. 5.10). Als Substrat wurde das MARCKS-PSD-ständige Peptid K¹⁵⁴KRFSFKKSFKL¹⁶⁴ verwendet. Das basische Peptid enthält zwei Serinreste, welche 'in vitro' durch die PKC-Subtypen α , β , δ , ϵ , θ und ζ phosphoryliert werden [560,562]. Nach der 'in vitro'-Phosphorylierung mit unterschiedlichen PKC-Subtypen wurden die einzelnen Reaktionslösungen im positiven Ionenmodus mittels *on-line*-UV- μ LC/ESI-MS untersucht. Für den semiquantitativen Vergleich wurden die $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülonen der phosphorylierten bzw. nicht-phosphorylierten Spezies herangezogen. Es konnte ermittelt werden, dass die klassischen PKC-Subtypen α , β I, β II und der neue PKC-Subtyp θ das MARCKS-PSD-ständige Peptid sowohl an Serinrest 5 als auch an Serinrest 9 phosphorylieren, wobei bei allen vier Subtypen schon nach 30 min Reaktionsdauer ein Phosphorylierungsgrad von 100 % beobachtet werden konnte (Tab. 5.13, Abb. 5.80). Im Gegensatz dazu wurde das MARCKS-PSD-ständige Peptid von der atypischen PKC- ι nur an einem einzigen Serinrest phosphoryliert. Mit zunehmender Reaktionsdauer konnte dabei eine Zunahme der Phosphorylierung beobachtet werden. Nach 30 min waren 36 % der eingesetzten Peptidmenge, nach 90 min 56 % phosphoryliert (Abb. 5.81, Tab. 5.13). Mit Hilfe eines NanoES-MS/MS-Experimentes konnte die Position der Phosphorylierung an Serinrest 9 innerhalb der Sequenz des MARCKS-Peptids lokalisiert werden (Abb. 5.82). Aufgrund ihres hydrophileren Charakters eluierten die phosphorylierten Peptide im Vergleich zu dem nicht-phosphorylierten Peptid schneller von der Säule (Abb. 5.79 und 5.80) [315,5]. Bei allen PKC-Isoformen, mit Ausnahme der PKC- ι , war aufgrund des vollständigen Umsatzes eine Quantifizierung nicht erforderlich (Tab. 5.13). Bei der PKC- ι wurden entsprechend Resing *et al.* [304] die Intensitäten der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten $[M+2H]^{2+}$ -Quasimolekülonen aufsummiert und das relative Verhältnis dieser für den semiquantitativen Vergleich des Phosphorylierungsgrades herangezogen (Kap. 5.10.1.3). Da Peptide in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung ein unterschiedliches ESI-Verhalten zeigen, können die Intensitäten unterschiedlicher Peptidionen nicht direkt miteinander verglichen werden [39,304,303]. Wie Resing *et al.* und Carr *et al.* zeigen konnten, können die relativen Intensitäten dennoch für einen semiquantitativen Vergleich herangezogen werden [304,367]. Ausblickend wäre ein Einsatz der vorgestellten Methode zum vollautomatischen semiquantitativen *Screening* nach Proteinkinase-Konsensussequenzen vorstellbar. Die Proteinkinasen könnten dabei zuerst 'in vitro' mit einer synthetischen Peptidbibliothek

umgesetzt werden und anschließend die gesamte Peptidmischung mit Hilfe eines LC/ESI-MS- oder -MS/MS-Experimentes untersucht werden.

Mit Hilfe der LC/ESI-MS-Experimente konnte klar gezeigt werden, dass die atypische PKC-Isoform ι das MARCKS-PSD-ständige Peptid, im Vergleich zu den klassischen PKC-Subtypen α , β I, β II und dem neuen PKC-Subtyp θ , 'in vitro' unterschiedlich phosphoryliert. Obwohl im MARCKS-PSD-ständigen Peptid (KKRFS⁵FKKS⁹FKL) nur Ser⁵ innerhalb der für die PKC beschriebenen Konsensussequenz K/RXXS/TXR/K [530] liegt, wurde bei der Umsetzung mit PKC- ι nicht diese Aminosäure, sondern Ser⁹ phosphoryliert. Zudem verlief die Phosphorylierungsreaktion im Vergleich zu den anderen PKC-Isoformen deutlich langsamer. Die Aktivierung und die Substratspezifität der einzelnen PKC-Subtypen wird entscheidend von den strukturellen Unterschieden der PKC-Unterfamilien beeinflusst (Kap. 2.6.11). Der genaue Mechanismus der Aktivierung der PKC wurde bislang aber nur im Falle der PKC- β II untersucht [537]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der PKC insbesondere durch die Autophosphorylierung und die Phosphorylierung durch andere Proteinkinasen reguliert wird (Kap. 2.6.11). Um die Substratspezifität der PKC- ι aufklären zu können muss deshalb zunächst der Mechanismus der PKC- ι -Aktivierung genauer untersucht werden.

6.11. Identifizierung der Serinphosphorylierungsstellen von 'in vitro' mit PKC- β I und - ζ umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteinen

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es sich bei IRS-1 um ein direktes Substrat der PKC- ζ handelt und von diesem bei Insulinstimulierung phosphoryliert wird [488,489]. Zur Identifizierung der PKC-abhängigen IRS-1-Phosphorylierungsstelle wurde deshalb das rekombinante GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsprotein (Aminosäuren 265-522 des IRS-1) in einer 'in vitro'-Reaktion in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP mit den PKC-Isoformen β I und ζ umgesetzt (Kap. 5.11.1). Zur Detektion der Phosphorylierungsstelle wurde ein neues 2-D-RP-HPLC/Mikro-ESI/MS-Verfahren entwickelt (Kap. 5.11.3), mit dessen Hilfe eine Phosphorylierung an Serinrest 318 identifiziert werden konnte (Kap. 5.11.4).

Bei der tryptischen Spaltung größerer Proteine erhält man in der Regel eine große Anzahl unterschiedlicher Peptide. Dies erschwert insbesondere bei Phosphoproteinen mit geringer Phosphorylierungsstöchiometrie die Detektion der Phosphopeptide, da bei der TFA-sauren RP-HPLC sehr viele Peptide coeluieren. Dieser Effekt kann durch die Überladung der Chromatographie-Säule noch zusätzlich verstärkt werden. Bei der LC/ESI-MS wird die Ionisierung von Phosphopeptiden deshalb sehr häufig durch gut ionisierende hochkonzentrierte nicht-phosphorylierte Peptide unterdrückt. Durch die Anreicherung der Phosphopeptide mittels IMAC (Kap. 5.7) oder mittels 2-dimensionaler chromatographischer Trennung können diese Effekte aber vermieden werden. Die Beobachtung, dass sich die Detektion phosphorylierter Peptide unter alkalischen negativ-Ionen-ESI-MS-Bedingungen erheblich verbessern lässt (alkalischer API-CID, Kap. 5.8.2) führte deshalb zur Entwicklung eines neuen 2-D-RP-HPLC-Verfahrens. In der ersten Dimension wurden die tryptischen Peptide *off-line* unter TFA-sauren Bedingungen fraktioniert und die einzelnen Fraktionen anschließend in der zweiten Dimension mittels negativ-Ionen-RP-LC/ESI-MS unter alkalischen Bedingungen analysiert. Durch die Verwendung einer Säule mit großem Innendurchmesser konnte in der ersten Dimension eine relativ große Probenmenge aufgetragen werden (Abb. 5.85). Die phosphopeptidhaltigen Fraktionen wurden *off-line* anhand ihrer Cerenkov-Strahlung ermittelt (Abb. 5.85 und 5.88). In der zweiten Dimension wurden die Phosphopeptid-haltigen Fraktionen dann unter alkalischen Bedingungen mittels μ RP-LC/MikroESI-MS (Flussrate 4 μ l \cdot min⁻¹) untersucht. Das entwickelte μ LC/Mikro-ESI-

MS-Verfahren (Abb. 5.84) ermöglichte die gleichzeitige Fraktionierung eines Teils des LC-Eluates ($3,3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$), während der restliche Teil der MikroESI-Peptidmassenbestimmung zugeführt werden konnte. Trotz des raschen alkalischen RP-Gradienten konnten die unterschiedlich geschnittenen und modifizierten Phosphopeptide mit Hilfe der 2-D-RP-Technik nahezu vollständig voneinander aufgetrennt werden (Abb. 5.89 und 5.90). Die Sensitivität der ESI-MS-Bestimmung konnte durch die MikroESI-Quelle enorm verbessert werden (Abb. 5.90). Entsprechend Abian *et al.* erhöhte sich aufgrund der verwendeten μLC -Säule die maximale Proben-Peak-Konzentration [92]. Durch die unbeschichteten PicoTips ($30 \mu\text{m}$ I.D. an der Öffnung der Spitze) konnte zudem eine effizientere ES-Ionisierung erreicht werden. Wie Kebarle und Tang zeigen konnten, hängt die ESI sehr stark von der Bildung der Tröpfchen ab [50]. Mit abnehmender Flussrate kann nach Banks *et al.* eine erhöhte Ionisierungseffizienz beobachtet werden, da die Grösse der ESI-Tröpfchen ebenfalls abnimmt [101]. Aus Gleichung 2.8 (Kap. 2.1.6) geht hervor, dass sich bei niedrigeren Flussraten kleinere Tröpfchen am Taylor-Konus ausbilden [103]. Aufgrund des erniedrigten Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses erfolgt bei kleineren Tröpfchen eine verstärkte Desorption der Ionen in die Gasphase. Um aber mit abnehmenden Flussraten die Stabilität des Taylor-Konus gewährleisten zu können muss den Berechnungen von Wilm *et al.* zufolge gleichzeitig der Durchmesser der ESI-Kapillare verringert werden (Kap. 2.1.6) [103].

Die Phosphorylierungsstelle wurde entsprechend DeGnore und Quin mittels positiv-Ionen-*offline*-NanoES-Ionenfallen- MS^3 ermittelt (Kap. 5.11.6.2) [348]. Wie von DeGnore und Quin sowie Ogueta *et al.* beschrieben [348,349], konnten bei der Sequenzierung des Gasphasendephosphorylierten $[\text{M}+2\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^{2+}$ -Neutralverlust-Fragmentions ($\text{MS}/\text{MS}/\text{MS}$) nicht nur mehr, sondern auch intensivere Fragmentionen im Vergleich zum $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Phosphopeptidion (MS/MS) beobachtet werden (Abb. 5.91 und 5.92). Bei relativ niedrigen Kollisions-Anregungsbedingungen stellt der H_3PO_4 -Neutralverlust bei Serin-phosphorylierten Peptiden einen sehr ausgeprägten Fragmentierungsprozess dar [346,347]. Bei der Interpretation des MS^3 -Spektrums wurde die Entstehung des Dehydroalanin- bzw. Aziridinrestes (β -Eliminierung bzw. Phosphatverlust der Seitenkette) berücksichtigt [345,348,582]. Speziell bei der Sequenzierung von Peptidionen hat eine Ionenfalle gegenüber einem Triple-Quad-MS deutliche Vorteile. Zum einen weist eine Ionenfalle eine etwa 100-1000fach höhere Empfindlichkeit bei CID-Experimenten auf [39]. Bei einer Ionenfalle können die Ionen über einen relativ langen Zeitraum gespeichert und akkumuliert werden, so dass im Vergleich zu einer Kollisionszelle mehr Gasphasenionen für das MS/MS -Experiment zur Verfügung stehen. Außerdem hat die Ionenfalle den Vorteil, dass Folgezerfälle nicht auftreten können, da alle anderen Ionen, mit Ausnahme der isolierten, aus dem Resonanz-Anregungs-Frequenzbereich herausfallen. Bei einer Ionenfalle erhält man deshalb ein klareres Tochterionenspektrum mit wenigen aber intensiven Fragmentionen und einem niedrigen chemischen Rauschen. In Verbindung mit dem von Wilm und Mann entwickelten NanoES-MS-Verfahren [103] ist eine Ionenfalle deshalb ein ideales Werkzeug für die hochempfindliche Sequenzierung von Phosphopeptiden.

Ein Nachteil des vorgestellten Verfahrens ist die ^{32}P -Markierung, welche für die Detektion der Phosphopeptide erforderlich ist. Bei der diesjährigen ASMS-Konferenz in Orlando (Florida) konnten wir über eine neu entwickelte negativ-Ionen- $\mu\text{LC}/\text{Mikro-ESI-API-CID-MS}$ -Methode (alkalische Bedingungen, einschließlich Fraktionierung, Kap. 5.11) berichten, mit welcher wir die Phosphorylierungsstelle eines im Gel-verdauten Phosphoproteins (25 pmol , Phosphorylierungsstöchiometrie $<5 \%$) identifizieren konnten (Daten werden nicht gezeigt). Aufgrund der API-CID-erzeugten m/z 79-Markerionenpsur ($[\text{PO}_3]^-$) kann auf eine radioaktive Markierung der Phosphoproteine verzichtet werden. Somit steht eine radioaktivitätsfreie hochempfindliche Methode zur Analyse von Phosphoproteinen zur Verfügung. Verringert man zusätzlich den Innendurchmesser der Chromatographiesäule und

die Flussrate, können ebenso, wie bei den positiv-Ionen-*on-line*-Nano-LC/ESI-MS/MS-Methoden (Kap. 2.5.3.1) subpicomolare Mengen phosphorylierter Proteine untersucht werden. Gegenüber den IMAC- und den Nano-LC/ESI-MS/MS-basierenden Methoden (Kap. 2.5.3) hat das vorgestellte Verfahren den Vorteil, dass eine phosphorylierungsspezifische Markerspur erzeugt wird. Bei der Analyse kann deshalb ausgeschlossen werden, dass Phosphopeptide aufgrund von Coelution, Unterdrückung oder *Wrong-Way-Round*-Effekten übersehen werden. Zudem können anhand der Phosphopeptid-spezifischen Spuren die Phosphoproteine bei unterschiedlichen zellulären Bedingungen (Bsp. basal/stimuliert) direkt miteinander verglichen werden.

Neben der Erkrankung des Typ 2 Diabetes führt die Insulinresistenz auch zu physiologischen Veränderungen (Infektionen, Glucoseintoleranz, Bluthochdruck usw.). Die molekularen Mechanismen, welche die Insulin-Signalwirkung unter diesen Bedingungen modulieren können jedoch nur sehr schwer aufgeklärt werden. Zahlreiche Untersuchungen legen aber die Vermutung nahe, dass die Serinphosphorylierung des Insulinrezeptors und der IRS-Proteine eine Unterdrückung des Insulinsignals bewirken können. Die Identifizierung der physiologisch relevanten Phosphorylierungsstellen und die Untersuchung der damit verbundenen regulatorischen Effekte schreitet aber nur sehr langsam voran [584]. Bei der Insulinresistenz und dem Typ II Diabetes wird häufig eine erhöhte Serinphosphorylierung von IRS-1 [564] beobachtet, welche zur Unterdrückung der insulinstimulierten Autophosphorylierung des Insulinrezeptors, der PI3-Kinase-Aktivierung, der Glucoseaufnahme sowie weiteren insulinstimulierten biologischen Reaktionen führt [516,519,520,522,565-571]. In den vorliegenden Experimenten konnte klar gezeigt werden, dass bei der *in vitro*-Umsetzung des GTS-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteins mit der klassischen PKC-Isoform β I [530] und der atypischen PKC-Isoform ζ [530] der Serinrest 318 phosphoryliert wird (Kap. 5.11). Die ermittelte Phosphorylierungsstelle (KPGpS³¹⁸FR) liegt dabei innerhalb einer konventionellen Phosphorylierungs-Konsensussequenz der Proteinkinase C (R/KXXS/TXK/R) [510].

Ravichandran *et al.* konnten zeigen, dass endogenes IRS-1 mit endogenem PKC- ζ coimmunpräzipitiert und es sich bei IRS-1 damit um ein direktes Substrat der PKC- ζ handelt [488]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich bei Insulinstimulierung das Ausmaß der Zusammenlagerung verdoppelt und das IRS-1 durch die PKC- ζ stark Serin-phosphoryliert wird [488]. In intakten Zellen reichte die Überexpression von PKC- ζ aus, um die Serinphosphorylierung von IRS-1 zu erhöhen. Gleichzeitig war eine verringerte insulinstimulierte Tyrosinphosphorylierung von IRS-1, eine verringerte IRS-1/PI3-K-Wechselwirkung und eine verringerte PI3-K-Aktivierung zu beobachten. Kurze Zeit später konnten Liu *et al.* in ihren Untersuchungen zeigen, dass die insulinstimulierte PKC- ζ -vermittelte IRS-1-Phosphorylierung infolge der Dissoziation des IR/IRS-1-Komplexes einen negativ regulatorischen Effekt auf die Insulin-Signalwirkung ausübt [489].

Die in den vorliegenden Experimenten identifizierte PKC- ζ - und PKC- β I-abhängige IRS-1-Serinphosphorylierungsstelle bestätigt *in vitro* die von Ravichandran *et al.* und Liu *et al.* beobachtete IRS-1/PKC- ζ -Wechselwirkung [488,489]. Die Resultate von Lui *et al.* sind dabei besonders interessant, da sie darauf hinweisen, dass die PKC- ζ -induzierte IRS-1-Serinphosphorylierung einen Teil, eines durch Insulin induzierten negativen Kontrollmechanismus darstellt, welcher zur Dissoziation des IR/IRS-1-Komplexes und zur Beendigung des Insulinsignals führt [489]. Bereits in früheren Untersuchungen konnten Paz *et al.* zeigen, dass Reagenzien, welche eine Insulinresistenz bewirken (z.B. TNF α), von diesem Mechanismus Gebrauch machen, indem sie die Serinphosphorylierung der IRS-Proteine und die Dissoziation der IR/IRS-Komplexe stimulieren [567]. In ihren erst kürzlich veröffentlichten Untersuchungen konnten Aguirre *et al.* zeigen, dass die c-Jun N-terminale Kinase (Jnk) infolge Aktivierung mit TNF α zahlreiche zelluläre Proteine, darunter auch IRS-1

und IRS-2, Shc und Gab-1 phosphoryliert [517]. Dabei wird das IRS-1 durch die Jnk hauptsächlich an Serinrest 307 (IRS-Ratte) innerhalb des COOH-terminalen Bereichs der PTB-Domäne, phosphoryliert (Kap.2.6.5, Abb. 2.18) [517]. Auf molekularer Ebene ist der genaue Mechanismus der Unterdrückung von IRS-1 infolge der Ser307-Phosphorylierung noch unklar. Bei früheren Untersuchungen konnte aber gezeigt werden, dass sich die IR/IRS-1-Wechselwirkung durch die Serin/Threonin-Phosphorylierung von IRS-1 verschlechtert [567]. Mittels *yeast 3hybrid*-Experimenten konnten Aguirre *et al.* kürzlich zeigen, dass auch die IRS-1-Ser307-Phosphorylierung zum vollständigen Abbruch der IR/IRS-1-Wechselwirkung führt [585]. Basierend auf ihren Untersuchungen nehmen sie deshalb an, dass die Unterdrückung der PTB-Domänenfunktion infolge der Ser307-Phosphorylierung einen generellen Mechanismus der negativen Rückkopplung und heterologen Steuerung des Insulin-Signalweges im Bereich des IRS-1 darstellt [585]. Die Beobachtung, dass bei Insulinstimulierung die IRS-1-Funktion infolge der Phosphorylierung durch die PI3-K-abhängige PKC- ζ eingeschränkt wird und die Tatsache, dass sich Ser307 und Ser318 (TESITATS³⁰⁷PASMVGGKPGS³¹⁸FRVR) in direkter räumlicher Nähe befinden legt deshalb die Vermutung nahe, dass die IR/IRS-1-Wechselwirkung ebenso durch die PKC- ζ -induzierte Ser318-Phosphorylierung reguliert wird. Eine genauere Untersuchung dieses Mechanismus und der Funktion der PKC- ζ -abhängigen Ser318-IRS-1-Phosphorylierung erfordert jedoch weitere Experimente.

7. Zusammenfassung

Die durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen regulierte reversible Proteinphosphorylierung stellt einen wichtigen Mechanismus bei der Regulation von Enzymen dar. Aufgrund ihrer bedeutenden Funktion bei der Zellregulation überrascht es deshalb nicht, dass eine abnorme Proteinphosphorylierung die Ursache oder Folge vieler Erkrankungen darstellt, unter anderem auch des Typ 2 Diabetes (nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus). In den letzten Jahren rückte daher im Bereich der biomedizinischen Forschung die Untersuchung der Signaltransduktionswege verstärkt in den Vordergrund. Durch die Einführung der modernen Proteom-Forschung und die rasche Entwicklung der proteinbiochemischen Analyseverfahren können heutzutage die reversiblen Proteinphosphorylierungen mittels Chromatographie und Massenspektrometrie besser und detaillierter untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Proteom-analytische Methoden entwickelt und etabliert. Es wurde eine im Gel-Verdaumethode entwickelt und zur enzymatischen Spaltung SDS-PAGE-getrennter und Coomassie-gefärbter Proteine eingesetzt. Selbst bei geringen Mengen *'in vivo'*-isolierter Proteine (subpicomolarer Bereich) konnten Peptidausbeuten von 85,4 % der Theorie erzielt werden. Am Beispiel der mutierten β -Untereinheit des humanen Insulinrezeptors konnte mittels μ LC/ESI-MS-Peptid-*Mapping* eine Proteinsequenzabdeckung von 75 % erzielt werden, wobei auch die tryptischen Peptide, welche die mutierten Aminosäurenreste enthielten, eindeutig bestimmt werden konnten.

Zur schnellen Aufreinigung und Konzentration von Peptiden aus Proteinverdaus wurde eine neue Mikro-*Tip*-Technik entwickelt. Zur Entsalzung von Proteinverdaus wurden sandwichartig mit POROS R20 und POROS Oligo R3 gefüllte *Gel-Loader-Tips* hergestellt. Für die IMAC-Anreicherung von Phosphopeptiden wurden mit Metallchelate gefüllte *Gel-Loader-Tips* entwickelt. Bei Verwendung synthetischer Peptide konnte bei den RP-Mikro-*Tips* eine Wiederfindungsrate von 88,1 % und 57 % bei den IMAC-*Tips* ermittelt werden. Der Einsatz der RP-Mikro-*Tips* konnte zudem anhand der raschen und hoch effizienten Entsalzung eines tryptischen β -Caseinverdaus verdeutlicht werden.

Des Weiteren wurden die NanoES-MS und NanoES-MS/MS-basierenden (TSQ 700) Proteinidentifizierungsverfahren (Peptid-*Mapping* und Fragmentionenanalyse) am Beispiel der tryptisch im Gel verdauten Kinasedomäne des humanen Insulinrezeptors (RP-Mikro-*Tip*-Reinigung) untersucht und verglichen. Die untersuchte Proteinbande konnte bei den Datenbank-Analysen bei beiden Verfahren eindeutig als humaner Insulinrezeptor identifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden MS-basierende phosphorylierungsspezifische Analyseverfahren untersucht und entwickelt (TSQ 700). Für die spezifische Detektion von Phosphopeptiden wurden die Kollisionszellen-basierenden Neutralverlust- und Vorläuferionen-Scantechniken untersucht und mit Hilfe synthetischer Phosphopeptide die MS-Geräteeinstellungen optimiert. Im positiven Ionenmodus stellt bei Serin- und Threonin-phosphorylierten Peptiden der H_3PO_4 -Neutralverlust (98 Da, β -Eliminierung, über 5- oder 6-Zentren Übergangszustand) die intensivste Fragmentierungsreaktion dar, welcher von einem weniger intensiven HPO_3 -Neutralverlust (80 Da) begleitet wird. Im negativen Ionenmodus war nur ein sehr schwacher H_3PO_4 -Neutralverlust zu beobachten (niedriger CID-*Offset*). Bei höheren *Offset*-Potentialen (> 50 V) bildeten sich sehr intensive phosphorylierungsspezifische PO_3^- - und H_2PO_4^- -Fragmentationen (m/z 79 und 97). Der hohe *Offset*, welcher für die Erzeugung der m/z 79-Fragmentationen erforderlich ist, spricht dabei deutlich für eine direkte Spaltung der C-O-P-Phosphoesterbindung. Durch Erhöhung des pH-Wertes der Spraylösung konnte die Empfindlichkeit der Vorläuferionen-Analyse gegenüber den TFA-sauren

Bedingungen um das fünf- bis sechsfache gesteigert werden (Vermeidung von *Wrong-Way-Round*-Effekten).

Mit Hilfe von synthetischen Phosphopeptiden konnte gezeigt werden, dass die exakte Position einer Phosphorylierung innerhalb einer Peptidsequenz mittels positiv-Ionen-NanoES-MS/MS bestimmt werden kann. Des Weiteren wurde der Einsatz der MS³-Sequenzierung von Phosphopeptiden mit dem Triple-Quadrupol-MS vorgestellt.

Die phosphorylierungsspezifischen Scantechniken (*off-line*-NanoES-MS) wurden schließlich zur Identifizierung der Phosphorylierungen von β -Casein (tryptisch verdaut, < 5 pmol) eingesetzt. Durch die Detektion eines einfach- und eines vierfach-phosphorylierten tryptischen Peptids konnten alle Phosphorylierungsstellen (Ser 30/33/34/35/50) spezifisch und sensitiv bestimmt werden. Zudem konnte das einfach phosphorylierte Peptid mittels MS/MS sequenziert und damit die Position des Phosphatrestes an Ser50 nachgewiesen werden.

Bei den folgenden Experimenten wurde der Einsatz der μ IMAC zur Aufkonzentration von Phosphopeptiden untersucht. Mittels *off-line*- μ IMAC/NanoES-MS und *on-line*- μ IMAC/ES-MS konnten Phosphopeptide in komplexen Peptidmischungen sehr rasch und empfindlich (unterer picomolarer Bereich) detektiert werden.

Anschließend wurde zunächst ein in der Literatur beschriebenes, TFA-saures μ LC/ESI-API-CID-Hybrid-Scan-basierendes Verfahren (Erzeugung von [PO₃]⁻-Markerionen), zur Detektion von Phosphopeptiden etabliert und zur Analyse von 200 pmol tryptisch verdautem β -Casein (eine Probe phosphoryliert, eine Probe nicht-phosphoryliert) eingesetzt. In der phosphorylierten Probe konnten die Phosphopeptide dabei hoch spezifisch detektiert werden.

Basierend auf diesen Untersuchungen wurde eine neues Phosphopeptid-spezifisches API-CID-Verfahren (LC unter alkalischen Bedingungen) entwickelt, bei dem aufgrund der Abwesenheit von [C₂F₃O]⁻-Fragmentationen (m/z 97, TFA-Fragmention) zusätzlich zu [PO₃]⁻ (m/z 79) nun auch das [H₂PO₄]⁻-Markerion (m/z 97) eingesetzt werden konnte. Optimale Markerionenbildung konnte bei einem pH-Wert von 10,3 und einem Q0-*Offset* von 40-90 V beobachtet werden. Die bessere Ionisierung der Phosphopeptide (kein *Wrong-Way-Round*-Effekt, höhere Oberflächenaktivität der Phosphopeptidionen in den ESI-Tröpfchen) führte gegenüber den TFA-sauren Bedingungen zu einer drei- bis vierfachen Erhöhung der Markerionenintensitäten. Mit der Standard-ESI-Quelle konnten noch 125 fmol μ l⁻¹ eines synthetischen Phosphopeptids detektiert werden. Das alkalische μ LC-ESI-API-CID-Verfahren wurde danach zur Analyse von 50 pmol eines tryptischen β -Caseinverdaus eingesetzt. Durch die Detektion dreier tryptischer β -Caseinpeptidfragmente (ein einfach-phosphoryliertes mit pSer50 und zwei vierfach-phosphorylierte, darunter ein einfach- fehlgeschnittenes mit pSer30/32/33/34) konnten alle Phosphorylierungen des β -Casein bestimmt werden. Abschließend wurde eine vollautomatische Hybrid-Scan-Routine erstellt und zur Analyse eines synthetischen Serin-phosphorylierten Peptids eingesetzt. Dabei wurden in einem Experiment sowohl die spezifischen m/z 79- und 97-Markerionen als auch die intakten Molekülionen detektiert.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die chromatographischen und massenspektrometrischen Verfahren zur Analyse von *in vivo*-(Zellkultur) und *in vitro*-stammenden Phosphoproteinen aus dem Bereich der Insulin-Signaltransduktion angewendet. Der *in vivo*-Einfluss der Serinreste 1177/78/82 des humanen Insulinrezeptors auf dessen Autophosphorylierung wurde durch ein hoch sensitives tryptisches [³²P]-RP-HPLC-Phosphopeptid-*Mapping* untersucht. Die Cerenkov-Spuren der verdauten Wildtypen und der Mutanten (Ser1177/78/82Ala) waren sowohl unter basalen als auch unter insulinstimulierten Bedingungen identisch (subpicomolare Mengen eingesetzt). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Serinreste 1177/78/82 des HIR für die Autophosphorylierung des Rezeptors entbehrlich, für die Substratphosphorylierung aber notwendig sind.

Beim folgenden Experiment wurde die Phosphorylierung der β -UE des *'in vivo'*-insulinstimulierten HIR-Wildtyps mittels *m/z*-79-Vorläuferionen-Scantechnik (*off-line*-NanoES-MS, keine radioaktive Markierung) untersucht. Durch μ RP-HPLC-Fraktionierung wurde die im Gel mit Lys-C gespaltene HIR- β -UE aufgetrennt. Die untersuchte Proteinbande konnte mittels MS/MS-Analyse als β -UE des HIR identifiziert werden. Trotz niedriger Phosphorylierungsstöchiometrie konnten zahlreiche Tyrosin-, Serin- und Threonin-Phosphorylierungen bestimmt werden. Wie in der Literatur beschrieben, liegt die katalytische Tyr-1150-Domäne hauptsächlich zweifach-Tyrosin-phosphoryliert vor. Zusätzlich konnten auch Peptide aus dem Bereich der regulatorischen Schleife detektiert werden, die nicht-phosphoryliert bzw. einfach-Tyrosin-phosphoryliert vorlagen. Außerdem konnten Peptide mit Phosphorylierungen an Tyr 1316/1322 (C-terminale Domäne), Tyr 960 (Juxtamembranregion), Ser 1023/1025 und Thr 1336 ermittelt werden. Die zuvor etablierten und optimierten Verfahren konnten somit zur empfindlichen Detektion von Proteinphosphorylierungen *'in vivo'*-isolierter Proteine eingesetzt werden.

Die *'in vitro'*-Substratspezifität verschiedener PKC-Subtypen wurde mittels einer eigens entwickelten *on-line*-UV- μ LC/ESI-MS-Methode untersucht (semiquantitative Bestimmung des Phosphorylierungsgrades). Das MARCKS-PSD-ständige Peptid-Substrat wurde durch die PKC-Subtypen α , β I, β II und θ an Ser5 und Ser9 schon nach 30 min Reaktionsdauer zu 100% phosphoryliert. Die atypische PKC- τ phosphorylierte das Substrat nur an Ser9 (mittels NanoES-MS/MS lokalisiert). Nach 30 min waren 36 % und nach 90 min 56 % der eingesetzten Peptidmenge phosphoryliert.

Die Serinphosphorylierungen von *'in vitro'* mit PKC- β I und PKC- ζ umgesetzten GST-IRS-1^{Nk}-Fusionsproteinen wurden mit Hilfe eines neuen, ³²P-basierenden 2-D-RP-HPLC/Mikro-ESI/MS-Verfahrens ermittelt. Durch das entwickelte 2D-RP-HPLC-Verfahren (1. Dimension sauer, 2. Dimension alkalisch) konnten die tryptisch erzeugten Peptide sehr effizient aufgetrennt werden. Mit dieser neuen Trennmethode können selbst hoch komplexe Peptidmischungen sehr effizient aufgetrennt werden. Des Weiteren wurde eine Mikro-ESI-Quelle entwickelt, welche eine effizientere Ionisierung der Peptidionen sowie die simultane Fraktionierung der Peptide erlaubt. Die detektierten und fraktionierten Phosphopeptide wurden mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer sequenziert. Mittels *off-line*-NanoES-MS³ konnten die Phosphopeptide trotz der niedrigen Phosphorylierungsstöchiometrie (< 5 %) sequenziert werden. Die Position der Phosphorylierung konnte an Serinrest 318 (innerhalb der IRS-1-Sequenz) lokalisiert werden. Besonders die lokale Nähe der PKC- ζ -abhängigen Ser318-Phosphorylierung zu der erst kürzlich entdeckten TNF α -induzierten, Jnk-abhängigen Ser307-Phosphorylierung lässt vermuten, dass der Ser318-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der insulinabhängigen IR/IRS-1-Wechselwirkung zukommt.

Mit den entwickelten chromatographischen und MS-basierenden Verfahren leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag um die komplexen regulatorischen Signaltransduktions-Netzwerke, insbesondere die der Proteinphosphorylierung, besser untersuchen zu können. Die Proteine im Bereich der Insulin-Signaltransduktion können dadurch besser identifiziert und charakterisiert werden. Insbesondere im Falle des IRS-1 trägt die Aufklärung der regulatorisch äußerst wichtigen reversiblen Proteinphosphorylierung entscheidend zum Verständnis der Insulin-Signalwirkung und der Entstehung und zukünftigen Behandlung des Typ 2 Diabetes bei.

8. Literatur

- [1] H.R. Morris, M. Panico, M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A. Tyler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, 101, 623.
- [2] J.C. Dunphy, K.L. Busch, *Pept. Res.* **1988**, 1, 48.
- [3] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, 64.
- [4] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299.
- [5] J.A. Loo, *Bioconjug. Chem.* **1995**, 6, 644.
- [6] V.C. Wasinger, S.J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J.X. Yan, A.A. Gooley, M.R. Wilkins, M.W. Duncan, R. Harris, K.L. Williams, I. Humphery-Smith, *Electrophoresis* **1995**, 16, 1090.
- [7] M.R. Wilkins, C. Pasquali, R.D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J.C. Sanchez, J.X. Yan, A.A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K.L. Williams, D.F. Hochstrasser, *Biotechnology* **1996**, 14, 61.
- [8] R.G. Krishna, F. Wold, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1993**, 67, 265.
- [9] E.G. Krebs, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 439.
- [10] T. Hunter, *Cell* **1995**, 80, 225.
- [11] T. Pawson, *Nature* **1995**, 373, 573.
- [12] H. Schulman, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1995**, 5, 375.
- [13] T. Pawson and J.D. Scott, *Science* **1997**, 278, 2075.
- [14] P.T. Cohen, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22, 245.
- [15] T. Hunter, *Cell* **2000**, 100, 113.
- [16] M.J. Hubbard, P. Cohen, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, 18, 172.
- [17] T. Hunter, *Philosoph. Trans. Biol. Sci.* **1997**, 353, 583.
- [18] R. Strohman, *Biotechnology* **1994**, 12, 156.
- [19] M. Kellerer, R. Lammers, H.U. Häring, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **1999**, 107, 97.
- [20] M.F. White, *Diabetologia* **1997**, 40, 2.
- [21] K.L. Busch, *J. Mass Spectrom.* **1995**, 30, 233.
- [22] S.J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, 677.
- [23] J.G. Boyle, C.M. Whitehouse, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2084.
- [24] K.D. Henry, E.R. Williams, B.H. Wang, F.W. McLafferty, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 9075.
- [25] S.A. McLuckey, G.J. Van Berkel, D.E. Goeringer, G.L. Glish, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 737.
- [26] F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1193.
- [27] M. Dole, R.C. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240.
- [28] G.A. Clegg, M. Dole, *Biopolymers* **1971**, 10, 821.
- [29] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4451.
- [30] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4671.
- [31] C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 675.
- [32] S.K. Chowdhury, V. Katta, B.T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, 4, 81.
- [33] A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2642.
- [34] J.A. Loo, R.R. Ogorzalek Loo, K.J. Light, C.G. Edmonds, R.D. Smith, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 81.
- [35] R.F. Straub, R.D. Voyksner, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 578.
- [36] J.R. Yates III, *J. Mass Spectrom.* **1998**, 33, 1.
- [37] E.D. Lee, W. Muck, J.D. Henion and T.R. Covey, *J. Chromatogr.* **1988**, 458, 313.

- [38] W.M. Niessen, *J. Chromatogr.* **1998**, 794, 407.
- [39] W.D. Lehmann, *Massenspektrometrie in der Biochemie*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [40] R. Kellner, F. Lottspeich, H.E. Meyer, *Microcharacterization of proteins*, 2. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **1999**.
- [41] W.S. Hancock, *New methods in peptide mapping for the characterization of proteins*, 1. Auflage, CRC Press, Boca Raton, **1996**.
- [42] A.J. Link, *2-D proteome analysis protocols*, 1. Auflage, Humana Press Inc., Totowa, **1999**.
- [43] R.H. Angeletti, *Proteins: analysis and design*, 1. Auflage, Academic Press, San Diego, **1998**.
- [44] J.R. Chapman, *Protein and peptide analysis by mass spectrometry*, 1. Auflage, Humana Press Inc., Totowa, **1996**.
- [45] B.M. Dunn, M.W. Pennington, *Peptide analysis protocols*, 1. Auflage, Humana Press Inc., Totowa, **1994**.
- [46] B.J. Smith, *Protein sequencing protocols*, 1. Auflage, Humana Press Inc., Totowa, **1997**.
- [47] A.L. Burlingame, R.K. Boyd, S.J. Gaskell, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 599.
- [48] J.B. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 524.
- [49] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, 8, 37.
- [50] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 972.
- [51] P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 804.
- [52] R.B. Cole, *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 763.
- [53] L.B. Loeb, A.F. Kip, G.G. Hudson, W.H. Bennet, *Phys. Rev.* **1941**, 60, 714.
- [54] R.J. Pfeifer, C.D. Hendricks, *AIAA J.* **1968**, 6, 496.
- [55] R.B. Cole, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, John Wiley & Sons, New York, **1997**.
- [56] G.I. Taylor, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1964**, 280, 383.
- [57] A.T. Blades, M.G. Ikononou, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2109.
- [58] G.J. Van Berkel, F. Zhou, J.T. Aronson, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, 162, 55.
- [59] J. Fernandez de la Mora, I.G. Loscertales, *J. Fluid Mech.* **1994**, 260, 155.
- [60] J. Fernandez de la Mora, J. Navascues, F. Fernandez, J. Rosell-Llompart, *J. Aerosol. Sci.* **1990**, 21, 5673.
- [61] M.G. Ikononou, A.T. Blades, P. Kebarle, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, 2, 497.
- [62] R.B. Cole, A.K. Harrata, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 536.
- [63] F.M. Wampler, A.T. Blades, P. Kebarle, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 289.
- [64] G. Wang, R.B. Cole, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2892.
- [65] C.G. Enke, *Anal. Chem.* **1995**, 69, 4885.
- [66] Lord Rayleigh, *Philos. Mag.* **1882**, 14, 184.
- [67] A. Gomez, K. Tang, *Phys. Fluids* **1994**, 6, 404.
- [68] L.L. Mack, P. Kralik, A. Rheude, M. Dole, *J. Chem. Phys.* **1970**, 52, 4977.
- [69] G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütfering, F.W. Röllgen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1989**, 90, 139.
- [70] H. Nehring, S. Thiebe, L. Bütfering, F.W. Röllgen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1993**, 128, 123.
- [71] J.V. Iribarne and B.A. Thompson, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2287.
- [72] B.A. Thompson and J.V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4451.

- [73] J.B. Fenn, J. Rosell, T. Nohmi, F.J. Banks Jr., *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, A.P. Snyder (Hrsg.), American Chemical Society, Washington, **1995**, 60-80.
- [74] J. Fernandez de la Mora, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *406*, 93.
- [75] P.D. Schnier, D.S. Gross, E.R. Williams, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 1086.
- [76] H. Wang, K.B. Lim, R.F. Lawrence, W.N. Howald, J.A. Taylor, L.H. Ericsson, K.A. Walsh, M. Hackett, *Anal. Biochem.* **1997**, *250*, 162.
- [77] J.L. Jones, A.R. Dongre, A. Somogyi, V.H. Wysocki, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8368.
- [78] G.J. Van Berkel, S.A. McLuckey, G.L. Glish, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1586.
- [79] J.F. Anacleto, H. Perreault, R.K. Boyd, S. Pleasance, M.A. Quilliam, P.G. Sim, J.B. Howard, Y. Makarovskiy, A.L. Lafleur, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 214.
- [80] X. Xu, S.P. Nolan, R.B. Cole, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 119.
- [81] L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3654.
- [82] L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2709.
- [83] W.J. Griffith, *Nanospray mass spectrometry in protein and peptide chemistry*, In: *Proteomics in Functional Genomics (Protein Structure Analysis)*. P. Jollès, H. Jörnvall (Hrsg.) Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, **2000**, 69-79.
- [84] T.R. Covey, R.F. Bonner, B.I. Shushan, J. Henion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 249.
- [85] S. Zhou, K.D. Cook, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 961.
- [86] J.A. Loo, C.G. Edmonds, H.R. Udseth, R.D. Smith, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 693.
- [87] R.D. Smith, J.A. Loo, R.R. Orgozalek Loo, M. Busman, H.R. Udseth, *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 359.
- [88] M.A. Kelly, M.M. Vestling, C.C. Fenselau, P.B. Smith, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 1143.
- [89] B.A. Mansoori, D.A. Volmer, R.K. Boyd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1120.
- [90] D.B. Hager, N.J. Dovichi, J. Klassen, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3944.
- [91] M.H. Amad, N.B. Cech, G.S. Jackson, C.G. Enke, *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 784.
- [92] J. Abian, A.J. Oosterkamp, E. Gelpi, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 244
- [93] J.P. Chervet, M. Ursem, J.P. Salzmänn, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1507.
- [94] K.B. Tomer, M.A. Moseley, L.J. Deterding, C.E. Parker, *Mass Spectrom. Rev.* **1994**, *13*, 431.
- [95] G. Guetens, K. Van Cauwenberghe, G. De Boeck, R. Maes, U.R. Tjaden, J. van der Greef, M. Highley, A.T. van Oosterom, E.A. de Bruijn, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, 739, 139.
- [96] H. Purnell, *Gas Chromatography*, Wiley, New York, **1962**.
- [97] A.P. Bruins, *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 53.
- [98] G. Hopfgartner, K. Bean, R. Henry, J. Henion, *J. Chromatogr.* **1993**, *647*, 51.
- [99] G. Hopfgartner, T. Wachs, K. Bean, J. Henion, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 439.
- [100] J.F. Banks, *J. Chromatogr. A* **1997**, *786*, 67.
- [101] J.F. Banks, C.M. Whitehouse, *Methods Enzymol.* **1996**, *270*, 486.
- [102] R.D. Smith, J.A. Loo, C.G. Edmonds, C.J. Barinaga, H.R. Udseth, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 882.
- [103] M.S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167.
- [104] M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1.
- [105] R.A. Yost, R.K. Boyd, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 154.
- [106] W. Paul, H. Steinwedel, *Z. Naturforsch.* **1953**, *8a*, 448.

- [107] P.H. Dawson, *Quadrupole Mass Spectrometry and its Applications*, Elsevier, New York, **1976**.
- [108] H. Wolnik, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 991.
- [109] F.W. McLafferty, *Tandem Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience, New York, **1983**.
- [110] A.R. Dongrè, A. Somogyi, V.H. Wysocki, *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 339.
- [111] R.A. Yost, C.G. Enke, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2274.
- [112] R.A. Yost, C.G. Enke, *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1251.
- [113] D.F. Hunt, W.M. Bone, J. Shabanowitz, J. Rhodes, J.M. Ballard, *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1704.
- [114] D.F. Hunt, A.M. Buko, J.M. Ballard, J. Shabanowitz, A.B. Giordani, *Biomed. Mass Spectrom.* **1981**, *8*, 397.
- [115] K.R. Jennings, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1968**, *1*, 227.
- [116] W.F. Haddon, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4745.
- [117] R.N. Hayes, M.L. Gross, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 237.
- [118] J.C. Schwartz, A.P. Wade, C.G. Enke and R.G. Cooks, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1809.
- [119] V. Katta, S.K. Chowdhury, B.T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 174.
- [120] A.G. Harrison, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1663.
- [121] J.A. Loo, H.R. Udseth, R.D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 207.
- [122] R.D. Smith, J.A. Loo, C.J. Barinaga, C.G. Edmonds, H.R. Udseth, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, *1*, 53.
- [123] R.D. Smith, C.J. Barinaga, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 54.
- [124] J.A. Loo, C.G. Edmonds, H.R. Udseth, R.D. Smith, *Anal. Chim Acta* **1990**, *241*, 167.
- [125] W.D. van Dongen, J.I. van Wijk, B.N. Green, W. Heerma, J. Haverkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1712.
- [126] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1987**, *78*, 53.
- [127] W.T. Moore, *Methods Enzymol* **1997**, *289*, 520.
- [128] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151.
- [129] M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1989**, *92*, 231.
- [130] M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 70.
- [131] Karas, A. Ingendoh, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1989**, *18*, 841.
- [132] F. Hillenkamp, M. Karas, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 280.
- [133] R.J. Cotter, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1027.
- [134] M. Quadroni, P. James, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 664.
- [135] E.J. Zaluze, D.A. Gage, J.T. Watson, *Prot. Expr. Purific.* **1995**, *6*, 109.
- [136] S.D. Patterson, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1791.
- [137] M. Mann, G. Talbo, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 11.
- [138] P. Roepstorff, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 6.
- [139] C.E. Costello, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 22.
- [140] P. Roepstorff, *Proteomics in Functional Genomics*, P. Jolles, H. Jörmvall (Hrsg.) Birkhäuser Verlag, Basel, **2000**, 81.
- [141] M.R. Larsen, P. Roepstorff, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 677.
- [142] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850.
- [143] D.J. Pappin, *Methods Mol. Biol.* **1997**, *64*, 165.
- [144] R.S. Annan, S.A. Carr, *J. Prot. Chem.* **1997**, *16*, 391.
- [145] X. Zhang, C.J. Herring, P.R. Romano, J. Szczepanowska, H. Brzeska, A.G. Hinnebusch, J. Qin, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2050.
- [146] F. Hillenkamp, R. Kaufmann, R. Nitsche, E. Unsold, *Appl. Phys.* **1975**, *8*, 341.

- [147] R.C. Beavis, B.T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6873.
- [148] R.C. Beavis, B.T. Chait, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1836.
- [149] T.M. Billeci, J.T. Stults, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1709.
- [150] M. Karas, H. Ehring, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, M. Grehl, B. Krebs, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476.
- [151] R.W. Nelson, M.A. McLean, T.W. Hutchens, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1408.
- [152] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3281.
- [153] O.N. Jensen, A. Podtelejnikov, M. Mann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1371.
- [154] R.S. Brown, J.J. Lennon, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1998.
- [155] B.A. Mamyurin, V.J. Karatajev, D.V. Shmikk, V.A. Zagulin, *Sov. Phys. JETP* **1973**, *37*, 45.
- [156] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, E. Jaeger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 105.
- [157] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 9678.
- [158] B. Spengler, *Methods Mol. Biol.* **1996**, *61*, 43.
- [159] M. Mann, M. Wilm, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 219.
- [160] W.J. Henzel, T.M. Billeci, J.T. Stults, S.C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5011.
- [161] M. Mann, P. Hojrup, P. Roepstorff, *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 338.
- [162] D.J.C. Pappin, P. Hojrup, A.J. Bleasby, *Curr. Biol.* **1993**, *3*, 327.
- [163] P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 58.
- [164] J.K. Eng, A.L. McCormack, J.R. Yates, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 976.
- [165] P. Tempst, A.J. Link, L.R. Riviere, M. Fleming, C. Elicone, *Electrophoresis* **1990**, *11*, 537.
- [166] G. Neubauer, A. King, J. Rappsilber, C. Calvio, M. Watson, P. Ajuh, J. Sleeman, A. Lamond, M. Mann, *Nat. Genet.* **1998**, *20*, 46.
- [167] R.H. Chen, A. Shevchenko, M. Mann, A.W. Murray, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 283.
- [168] R. Aebersold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, *4*, 412.
- [169] J. Qin, B.T. Chait, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4002.
- [170] A.L. Burlingame, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 4.
- [171] J.S. Andersen, B. Svenson, P. Roepstorff, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 449.
- [172] B. Küster, M. Mann, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1998**, *8*, 393.
- [173] H.W. Lahm, H. Langen, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2105.
- [174] D. Arnott, K.L. O'Connell, K.L. King, J.T. Stults, *Anal. Biochem.* **1998**, *258*, 1.
- [175] P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007.
- [176] R.L. Moritz, J.S. Eddes, G.E. Reid, R.J. Simpson, *Electrophoresis* **1996**, *17*, 907.
- [177] K.R. Clauser, S.C. Hall, D.M. Smith, J.W. Webb, L.E. Andrews, H.M. Tran, L.B. Epstein, A.L. Burlingame, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 5072.
- [178] S.L. Cohen, B.T. Chait, *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 257.
- [179] P.A. Haynes, N. Fripp, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 939.
- [180] C. Scheler, S. Lamer, Z. Pan, X.P. Li, J. Salnikow, P. Jungblut, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 918.
- [181] A. Otto, B. Thiede, E.C. Müller, C. Scheler, B. Wittmann-Liebold, P. Jungblut, *Electrophoresis* **1996**, *17*, 1643.
- [182] U. Hellman, C. Wernstedt, J. Gonez, C.H. Heldin, *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 451.
- [183] M. Friedman, L.H. Krull, J.F. Cavins, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3868.
- [184] P.C. Andrews, J.E. Dixon, *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 524.
- [185] T.D. Lee, J.E. Shively, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 361.

- [186] M. Swiderek, M.T. Davis, T.D. Lee, *Elektrophoresis* **1998**, *19*, 989.
- [187] S. Sechi, B.T. Chait, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5150.
- [188] K. Biemann, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 977.
- [189] J. Fernandez, L. Andrews, S.M. Mische, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 112.
- [190] J. Rosenfeld, J. Capdevielle, J.C. Guillemot, P. Ferrara, *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 173.
- [191] A. Shevchenko, O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchenko, H. Boucherie, M. Mann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 14400.
- [192] P.J. Sweeney, J.M. Walker, *Methods Mol. Biol.* **1993**, *16*, 277.
- [193] H.R. Morris, M. Panico, G.W. Taylor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *117*, 299.
- [194] B.W. Gibson, K. Biemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 1956.
- [195] F.M. Greer, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1991**, *51*, 127
- [196] J.R. III Yates, S. Speicher, P.R. Griffin, T. Hunkapiller, *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 397.
- [197] D. Hess, T.C. Covey, R. Winz, R.W. Brownsey, R. Aebersold, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1342.
- [198] M.R. Gold, T. Yungwirth, C.L. Sutherland, R.J. Ingham, D. Vianzon, R. Chiu, I. van Oostveen, H.D. Morrison, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1994**, *15*, 441.
- [199] H. Ji, R.H. Whitehead, G.E. Reid, R.L. Moritz, L.D. Ward, R.J. Simpson, *Electrophoresis* **1994**, *15*, 391.
- [200] G.E. Reid, H. Ji, J.S. Eddes, R.L. Moritz, R.J. Simpson, *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1120.
- [201] G.E. Reid, R.K. Rasmussen, D.S. Dorow, R.J. Simpson, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 946
- [202] K. Gevaert, H. Demol, T. Sklyarova, J. Vandekerckhove, T. Houthaeve, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 909.
- [203] R.L. Winston, M.C. Fitzgerald, *Anal. Biochem.* **1998**, *262*, 83.
- [204] D. Fenyö, J. Qin, B.T. Chait, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 998.
- [205] J. Godovac-Zimmermann, V. Soskic, S. Poznanovic, F. Brianza, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 952.
- [206] J.R. Yates III, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 893.
- [207] F.W. McLafferty, R. Venkataraghavan, P. Irving, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *39*, 274.
- [208] H. Falter, *Advanced methods in protein sequence determination*, S.B. Needleman (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1977**, 123.
- [209] K. Biemann, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1288.
- [210] D.F. Hunt, J.R. III Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, C.R. Hauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6233.
- [211] K. Biemann, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 455.
- [212] J.T. Stults, *Methods Biochem. Anal.* **1990**, *34*, 145.
- [213] M.F. Bean, S.A. Carr, G.C. Thome, M.H. Reilly, S.J. Gaskell, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1473.
- [214] S.J. Gaskell, M.H. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 188
- [215] K. Biemann, *Biochem. Soc. Trans.* **1989**, *17*, 237.
- [216] J.A. Loo, C.G. Edmonds, R.D. Smith, *Science* **1990**, *248*, 201.
- [217] D.F. Hunt, N.Z. Zhu, J. Shabanowitz, *Rapid Commun. Mass Spectrom* **1989**, *3*, 122.
- [218] N.J. Jensen, K.B. Tomer, M.L. Gross, *J. Amer. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1863.
- [219] P. Roepstorff, J. Fohlmann, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.

- [220] P. Roepstorff, P. Hojrup, J. Moller, *Biomed. Mass Spectrom.* **1985**, *12*, 181.
- [221] K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 99.
- [222] K. Ambihapathy, T. Yalcin, H.-W. Leung, A.G. Harrison, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 209.
- [223] V. Katta, S.K. Chowdhury, B.T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 174.
- [224] X.J. Tang, R.K. Boyd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 651.
- [225] X.J. Tang, P. Thibault, R.K. Boyd, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2824.
- [226] J.R. III Yates, A.L. McCormack, A.J. Link, D. Schieltz, J. Eng, L. Hays, *Analyst* **1996**, *121*, 65R.
- [227] J.A. Loo, C.G. Edmonds, R.D. Smith, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 425.
- [228] A.L. McCormack, A. Somogyi, A.R. Dongrè, V.H. Wysocki, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2859.
- [229] K. Ishikawa, T. Nishimura, Y. Koga, Y. Niwa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 933.
- [230] C.J. Barinaga, C.G. Edmonds, H.R. Udseth, R.D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 160.
- [231] A.A. Tuinman, G.R. Pettit, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 331.
- [232] M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, M. Mann, *Nature* **1996**, *379*, 466.
- [233] R. Kaufmann, D. Kirsch, B. Spengler, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *131*, 355.
- [234] K.R. Clauser, P. Baker, A.L. Burlingame, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2871.
- [235] G. Neubauer, M. Mann, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 235.
- [236] H. Erdjument-Bromage, M. Lui, L. Lacomis, A. Grewal, R.S. Annan, D.E. McNulty, S.A. Carr, P. Tempst, *J. Chromatogr. A* **1998**, *826*, 167.
- [237] F. Rusconi, J.-M. Schmitter, J. Rossier, M. le Maire, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3046.
- [238] M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, P. Roepstorff, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 593.
- [239] J. Gobom, E. Nordhoff, E. Mirgorodskaya, R. Ekman, P. Roepstorff, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 105.
- [240] M.R. Wilkins, A.A. Gooley, *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. M.R. Wilkins, K.L. Williams (Hrsg.), Springer Verlag, **1997**.
- [241] P.A. Binz, M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, *Microcharacterization of proteins*, 2. Auflage, R. Kellner, F. Lottspeich, H.E. Meyer (Hrsg.), WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **1999**, 277.
- [242] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.-C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, *Meth. Mol. Biol.* **1999**, *112*, 531.
- [243] J.L. Cook, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 165.
- [244] B. Persson, *Proteomics in Functional Genomics*. P. Jollès, H. Jörnvall (Hrsg.), Birkhäuser Verlag Basel, Schweiz, **2000**, 215.
- [245] J.R. III Yates, A.L. McCormack, J. Eng, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 534.
- [246] J.R. III Yates, J.K. Eng, *US Pat.* 5 538 897, **1996**.
- [247] J.R. III Yates, J.K. Eng, A.L. McCormack, D. Schieltz, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1426.
- [248] J.R. III Yates, J.K. Eng, A.L. McCormack, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3202.
- [249] M. Mann, M. Wilm, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4390.
- [250] R. Krishna, F. Wold, in *Protein Structure- A Practical Approach*, 2. Aufl., T. Creighton (Hrsg.), Oxford University Press, New York, **1997**, 91.
- [251] E.G. Krebs, E.H. Fischer, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *20*, 150.
- [252] S.K. Hanks, A.M. Quinn, T. Hunter, *Science* **1988**, *241*, 42.

- [253] M. Affolter, J.D. Watts, D.L. Krebs, R. Aebersold, *Anal. Biochem.* **1994**, 223, 74.
- [254] W. Zhou, B.A. Merrick, M.G. Khaledi, K.B. Tomer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, 11, 273.
- [255] T.A.J. Haystead, J.C. Garrison, *Protein Phosphorylation*, D.G. Hardie (Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, **1999**, 1-31.
- [256] M. Kussmann, K. Hauser, R. Kissmehl, J. Breed, H. Plattner, P. Roepstorff, *Biochemistry* **1999**, 38, 7780.
- [257] J.X. Yan, N.H. Packer, L. Tonella, K. Ou, M.R. Wilkins, J.C. Sanchez, A.A. Gooley, D.F. Hochstrasser, K.L. Williams, *J. Chromatogr.* **1997**, 764, 201.
- [258] J.X. Yan, N.H. Packer, A.A. Gooley, K.L. Williams, *J. Chromatogr.* **1998**, 808, 23.
- [259] U.K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680.
- [260] G.R. Guy, R. Philip, Y.H. Tan, *Electrophoresis* **1994**, 15, 417.
- [261] M.R. Wardell, C.C. Reynolds, M.C. Berndt, R.W. Wallace, J.E. Fox, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15656.
- [262] N.C. Olson, K.T. Kruse-Elliott, A.R. Whorton, J.R. Dodam, *Am. J. Physiol.* **1993**, 264, 213.
- [263] S.F. Arnold, J.D. Obourn, H. Jaffe, A.C. Notides, *Mol. Endocrinol.* **1995**, 9, 24.
- [264] J.A. Cooper, B.M. Sefton, T. Hunter, *Methods Enzymol.* **1983**, 99, 387.
- [265] W.J. Boyle, P. van der Geer, T. Hunter, *Methods Enzymol.* **1991**, 201, 110.
- [266] G.G. Kuiper, A.O. Brinkmann, *Biochemistry* **1995**, 34, 1851.
- [267] R. Winz, D. Hess, R. Aebersold, R.W. Brownsey, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14438.
- [268] J.M. Hettasch, J.R. Sellers, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 11876.
- [269] A. Ruiz-Gomez, M.L. Vaello, F. Valdivieso, F. Mayor Jr. , *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 559.
- [270] P. Van Der Geer, K. Luo, B.M. Sefton, T. Hunter, *Protein Phosphorylation*, D.G. Hardie (Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, **1999**, 97-126.
- [271] P.J. Roach, Y.H. Wang, *Methods Enzymol.* **1991**, 201, 200.
- [272] S. Sullivan, T.W. Wong, *Anal. Biochem.* **1991**, 197, 65.
- [273] R. Aebersold, J.D. Watts, H.D. Morrison, E.J. Bures, *Anal. Biochem.* **1991**, 199, 51.
- [274] R.E. Wettenhall, R.H. Aebersold, L.E. Hood, *Methods Enzymol.* **1991**, 201, 186.
- [275] P. van der Geer, T. Hunter, *Electrophoresis* **1994**, 15, 544.
- [276] B. Duclos, S. Marcandier, A.J. Cozzone, *Methods Enzymol.* **1991**, 201, 10.
- [277] D.P. Ringer, *Methods Enzymol.* **1991**, 201, 3.
- [278] W.G. Carter, K.A. Asamoah, G.J. Sale, *Biochemistry* **1995**, 34, 9488.
- [279] S.M. Najjar, N. Philippe, Y. Suzuki, G.A. Ignacio, P. Formisano, D. Accili, S.I. Taylor, *Biochemistry* **1995**, 34, 9341.
- [280] L.N. Amankwa, K. Harder, F. Jirik, R. Aebersold, *Protein Sci.* **1995**, 4, 113.
- [281] R.W. Donaldson, S. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 8477.
- [282] J.Y. Wang, *Anal. Biochem.* **1988**, 172, 1.
- [283] D. Heffetz, M. Fridkin, Y. Zick, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 182, 343.
- [284] Q.P. Weng, M. Kozlowski, C. Belham, A. Zhang, M.J. Comb, J. Avruch, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 16621.
- [285] P. Fadden, T.A.J. Haystead, *Anal. Biochem.* **1995**, 225, 81.
- [286] T. Hunter, B.M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1311.
- [287] H.E. Meyer, B. Eisermann, M. Heber, E. Hoffmann-Posorske, H. Korte, C. Weigt, A. Wegner, T. Hutton, A. Donella-Deana, J.W. Perich, *FASEB J.* **1993**, 7, 776.
- [288] M. Heber, C. Liedtke, H. Korte, E. Hoffmann-Posorske, A. Donella-Deana, L.A. Pinna, J. Perich, E. Kitas, R.B. Johns, H.E. Meyer, *Chromatographia* **1992**, 33, 347.
- [289] H.E. Meyer, E. Hoffmann-Posorske, A. Donella-Deana, H. Korte, *Methods Enzymol.* **1991**, 201, 206.

- [290] D.A. Malencik, Z.Z. Zhao, S.R. Anderson, *Anal. Biochem.* **1990**, *184*, 353.
- [291] L.R. Murthy, K. Iqbal, *Anal. Biochem.* **1991**, *193*, 299.
- [292] D.B. Rylatt, P. Cohen, *FEBS Lett.* **1979**, *98*, 71.
- [293] C.G. Proud, D.B. Rylatt, S.J. Yeaman, P. Cohen, *FEBS Lett.* **1977**, *80*, 435.
- [294] P.J. Roach, Y.H. Wang, *Methods Enzymol.* **1991**, *201*, 200.
- [295] H.E. Meyer, E. Hoffmann-Posorske, H. Korte, L.M. Heilmeyer Jr., *FEBS Lett.* **1986**, *204*, 61.
- [296] H.E. Meyer, K. Swiderek, E. Hoffmann-Posorske, H. Korte, L.M. Heilmeyer Jr., *J. Chromatogr.* **1987**, *397*, 113.
- [297] K.L. Hsi, S.A. O'Neill, D.R. Dupont, P.M. Yuan, *Anal. Biochem.* **1998**, *258*, 38.
- [298] M. Quadroni, P. James, *Proteomics in Functional Genomics*, P. Jolles, H. Jörnvall (Hrsg.), Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin **2000**, S.199-213.
- [299] J.D. Watts, J.S. Sanghera, S.L. Pelech, R. Aebersold, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23275.
- [300] J.D. Watts, M. Affolter, D.L. Krebs, R.L. Wange, L.E. Samelson, R. Aebersold, *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ACS Symposium Series **1996**, *619*, 381.
- [301] J.S. Glavy, M. Wolfson, E. Neives, E.K. Han, C.P. Yang, S.B. Horwitz, G.A. Orr, *Methods Enzymol.* **1998**, *292*, 342.
- [302] E.M. Smyth, W.H. Li, G.A. FitzGerald, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 23258.
- [303] U. Schneider, T. Mini, P. Jenö, P.A. Fisher, N. Stuurman, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4620.
- [304] K.A. Resing, S.J. Mansour, A.S. Hermann, R.S. Johnson, J.M. Candia, K. Fukasawa, G.F. Vande Woude, N.G. Ahn, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2610.
- [305] V.N. Lapko, X.Y. Jiang, D.L. Smith, P.S. Song, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1032.
- [306] M.A. Edgar, P. Pasinelli, M. DeWit, B. Anton, L.A. Dokas, L. Pastorino, M. DiLuca, F. Cattabeni, W.H. Gispen, P.N. De Graan, *J. Neurochem* **1997**, *69*, 2206.
- [307] V. De Corte, H. Demol, M. Goethals, J. Van Damme, J. Gettemans, J. Vandekerckhove, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 234.
- [308] W. Zhang, A.J. Czernik, T. Yungwirth, R. Aebersold, B.T. Chait, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 677.
- [309] P.C. Liao, J. Leykam, P.C. Andrews, D.A. Gage, J. Allison, *Anal. Biochem.* **1994**, *219*, 9.
- [310] J. Szczepanowska, X. Zhang, C.J. Herring, J. Qin, E.D. Korn, H. Brzeska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8503.
- [311] M. Roos, V. Soskic, S. Poznanovic, J. Godovac-Zimmermann, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 924.
- [312] H.N. Wong, M.A. Ward, A.W. Bell, E. Chevet, S. Bains, W.P. Blackstock, R. Solari, D.Y. Thomas, J.J. Bergeron, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17227.
- [313] V. Soskic, E. Nyakatura, M. Roos, W. Müller-Esterl, J. Godovac-Zimmermann, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8539.
- [314] A. Watty, G. Neubauer, M. Dreger, M. Zimmer, M. Wilm, S.J. Burden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4585.
- [315] E.T. Lund, R. McKenna, D.B. Evans, S.K. Sharma, W. R. Mathews, *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 1221.
- [316] M. Svoboda, W. Meister, E.A. Kitas; W. Vetter, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1117.
- [317] D.P. Hanger, J.C. Betts, T.L. Loviny, W.P. Blackstock, B.H. Anderton, *J. Neurochem* **1998**, *71*, 2465.
- [318] Y.S. Yoo, Y.S. Han, M.J. Suh, J. Park, *J. Chromatogr.* **1997**, *763*, 285.
- [319] J. Wei, L. Yang, A.K. Harrata, C.S. Lee, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2356.
- [320] B.W. Gibson, P. Cohen, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 480.

- [321] K. Biemann, H.A. Scoble, *Science* **1987**, 237, 992.
- [322] H. Michel, D.F. Hunt, J. Shabanowitz, J. Bennett, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1123.
- [323] A.K. Erickson, D.M. Payne, P.A. Martino, A.J. Rossomando, J. Shabanowitz, M.J. Weber, D.F. Hunt, T.W. Sturgill, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 19728.
- [324] A.J. Rossomando, J. Wu, H. Michel, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, M.J. Weber, T.W. Sturgill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 5779.
- [325] K. Palczewski, J. Buczylo, P. Van Hooser, S.A. Carr, M.J. Huddleston, J.W. Crabb, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 18991.
- [326] J. Hou, K. McKeehan, M. Kan, S.A. Carr, M.J. Huddleston, J.W. Crabb, W.L. McKeehan, *Protein Sci.* **1993**, 2, 86.
- [327] K.A. Resing, R.S. Johnson, K.A. Walsh, *Biochemistry* **1995**, 34, 9477.
- [328] R.D. Ladner, S.A. Carr, M.J. Huddleston, D.E. McNulty, S.J. Caradonna, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7752.
- [329] C. Chapline, J. Cottom, H. Tobin, J. Hulmes, J. Crabb, S. Jaken, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 19482.
- [330] S.P. Gygi, D.K. Han, A.C. Gingras, N. Sonenberg, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1999**, 20, 310.
- [331] M.G. Katze, B. Kwieciszewski, D.R. Goodlett, C.M. Blakely, P. Neddermann, S.L. Tan, R. Aebersold, *Virology* **2000**, 278, 501.
- [332] A. Weijland, G. Neubauer, S.A. Courtneidge, M. Mann, R.K. Wierenga, G. Superti-Furga, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 240, 756.
- [333] J.C. Betts, W.P. Blackstocks, M.A. Wards, B.H. Anderton, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 12922.
- [334] A. Weijland, J.C. Williams, G. Neubauer, S.A. Courtneidge, M. Mann, R.K. Wierenga, G. Superti-Furga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 3590.
- [335] D.R. Müller, P. Schindler, M. Coulot, H. Voshol, J. van Oostrum, *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 336.
- [336] D.C. Neville, C.R. Rozanas, E.M. Price, D.B. Gruis, A.S. Verkman, R.R. Townsend, *Protein Science* **1997**, 6, 2436.
- [337] D. Immler, D. Gremm, D. Kirsch, B. Spengler, P. Presek, A.E. Meyer, *Electrophoresis* **1998**, 19, 1015.
- [338] J.D. Watts, M. Affolter, D.L. Krebs, R.L. Wange, L.E. Samelson und R. Aebersold *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 29520.
- [339] C.K. Palaty, G. Kalmar, G. Tai, S. Oh, L. Amankawa, M. Affolter, R. Aebersold, S.L. Pelech, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 10514.
- [340] B. Gallis, G.L. Corthals, D.R. Goodlett, H. Ueba, F. Kim, S.R. Presnell, D. Figeys, D.G. Harrison, B.C. Berk, R. Aebersold, M.A. Corson, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 30101.
- [341] G. Marino, P. Pucci, A. Malorni, H.R. Morris, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1988**, 231, 651.
- [342] P. Pettrilli, P. Pucci, H.R. Morris, F. Addeo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 140, 28.
- [343] T.T. Yip, T.W. Hutchens, *FEBS Lett.* **1992**, 308, 149.
- [344] Y.K. Wang, P.C. Laio, J. Allison, D.A. Gage, P.C. Andrews, D.M. Lubman, S.M. Hanash, J.R. Strahler, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 14269.
- [345] H. Jaffe, Veeranna, H.C. Pant, *Biochemistry* **1998**, 37, 16211.
- [346] A. Tholey, J. Reed, W.D. Lehmann, *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 117.
- [347] A. Schlosser, R. Pipkorn, D. Bossemeyer, W.D. Lehmann, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 170.
- [348] J.P. DeGnore, J. Qin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 1175.
- [349] S. Ogueta, R. Rogado, A. Marina, F. Moreno, J.M. Redondo, J. Vazquez, *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 556.

- [350] L. Andersson, J. Porath, *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 250.
- [351] G. Muszynska, L. Andersson, J. Porath, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6850.
- [352] G. Muszynska, G. Dobrowolska, A. Medin, P. Ekman, J. Porath, *J. Chromatogr.* **1992**, *604*, 19.
- [353] P. Scanff, M. Yvon, J.P. Pelissier, *J. Chromatogr.* **1991**, *539*, 425.
- [354] D. Figeys, S.P. Gygi, Y. Zhang, J. Watts, M. Gu, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1811.
- [355] P. Russo, R. Falchetto, R. Hendrickson, G. Smith, J. Shabanowitz, D. Hunt, *Proceedings of the 44th ASMS Conference*, Portland, OR, May 12-16, **1996**, S. 1084.
- [356] K.E. Cleverley, J.C. Betts, W.P. Blackstock, J.M. Gallo, B.H. Anderton, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3917.
- [357] M.C. Posewitz, P. Tempst, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2883.
- [358] L.M. Nuwaysir, J.T. Stults, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 662.
- [359] P. Cao, J.T. Stults, *J. Chromatogr.* **1999**, *853*, 225.
- [360] M.J. Huddleston, R.S. Annan, M.T. Bean, S.A. Carr, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 710.
- [361] S.A. Carr, M.J. Huddleston, M.F. Bean, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 183.
- [362] J. Ding, W. Burkhardt, D.B. Kassel, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 94.
- [363] A.P. Hunter, D.E. Games, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 559.
- [364] P.T. Jedrzejewski, W.D. Lehmann, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 294.
- [365] R. Verma, R.S. Annan, M.J. Huddleston, S.A. Carr, G. Reynard, R.J. Deshaies, *Science* **1997**, *278*, 455.
- [366] R.S. Annan, M.J. Huddleston, R. Verma, R.J. Deshaies, S.A. Carr, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 393.
- [367] S.A. Carr, M.J. Huddleston, R.S. Annan, *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 180.
- [368] J. Herrmann, U.P. Schlunegger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 135.
- [369] R. Annan, S.A. Carr, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3413.
- [370] M. Wilm, G. Neubauer, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 527.
- [371] G. Neubauer, M. Dreger, *Biospektrum* **1999**, *5*, 386.
- [372] G. Neubauer, M. Mann, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 94.
- [373] A. Lemmon, J. Schlessinger, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 459.
- [374] S. Zhou, K.L. Carraway 3rd, M.J. Eck, S.C. Harrison, R.A. Feldman, M. Mohammadi, J. Schlessinger, S.R. Hubbard, D.P. Smith, C.Eng, *et al.*, *Nature* **1995**, *373*, 536.
- [375] J.M. Backer, M.G. Myers Jr., S.E. Shoelson, D.J. Chin, X.J. Sun, M. Miralpeix, P. Hu, B. Margolis, E.Y. Skolnik, J. Schlessinger, M.F. White, *EMBO J.* **1992**, *11*, 3469.
- [376] M.R. Kuhne, T. Pawson, G.E. Lienhard, G.S. Feng, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11479.
- [377] E.Y. Skolnik, A.G. Batzer, N. Li, C.H. Lee, E.J. Lowenstein, M. Mohammadi, B. Margolis, J. Schlessinger, *Science* **1993**, *260*, 1953.
- [378] C.H. Lee, W. Li, R. Nishimura, M. Zhou, A.G. Batzer, M.G. Myers Jr., M.F. White, J. Schlessinger, E.Y. Skolnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11713.
- [379] S. Seino, M. Seino, G.I. Bell, *Diabetes* **1990**, *39*, 129.
- [380] P. Shier, V.M. Watt, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14605.
- [381] S.E. Shoelson, M.F. White, C.R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 4852.
- [382] R. Herrera, D. Lebowitz, A. Garcia de Herreros, R.G. Kallen, O.M. Rosen, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5560.
- [383] M. Villalba, S.R. Wentz, D.S. Russell, J.C. Ahn, C.F. Reichelderfer, O.M. Rosen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7848.
- [384] J. Schlessinger, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 443.
- [385] M.F. White, C.R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1.

- [386] J.L. Treadway, B.D. Morrison, M.A. Soos, K. Siddle, J. Olefsky, A. Ullrich, D.A. McClain, J.E. Pessin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 214.
- [387] J. Lee, T. O'Hare, P.F. Pilch, S.E. Shoelson, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 4092.
- [388] A.L. Fratalli, J.L. Treadway, J.E. Pessin, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 19521.
- [389] S.E. Shoelson, J. Lee, C.S. Lynch, J.M. Backer, P.F. Pilch, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 4085.
- [390] L. Schaffer, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 221, 1127.
- [391] E.N. Baker, T.L. Blundell, J.F. Cutfield, S.M. Cutfield, E.J. Dodson, G.G. Dodson, D.M. Hodgkin, R.E. Hubbard, N.W. Isaacs, C.D. Reynolds, K. Sakabe, N. Sakabe, N.M. Vijayan, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1988**, 319, 369.
- [392] S. Gammeltoft, *Physiol. Rev.* **1984**, 64, 1321.
- [393] C. Kristensen, T. Kjeldsen, F.C. Wiberg, L. Schäffer, M. Hach, S. Havelund, J. Bass, D.F. Steiner, A.S. Andersen, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 12978.
- [394] U. Schell, M. Grün, R. Hilgenfeld, *Chembiochem* **2000**, 1, 37.
- [395] A.L. Fratalli, J.L. Treadway, J.E. Pessin, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 9829.
- [396] J.N. Ihle, K. Morishita, T. Matsugi, C. Bartholomew, *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, 352, 329.
- [397] B.C. Cunningham, M. Ultsch, A.M. De Vos, M.G. Mulkerin, K.R. Clauser, J.A. Wells, *Science* **1991**, 254, 821.
- [398] S.R. Hubbard, L. Wei, L. Ellis, W.A. Hendrickson, *Nature* **1994**, 372, 746
- [399] S.R. Hubbard, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1999**, 71, 343.
- [400] S.R. Hubbard, *EMBO J.* **1997**, 16, 5572.
- [401] E.P. Feener, J.M. Backer, G.L. King, P.A. Wilden, X. Sun, C.R. Kahn, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11256.
- [402] D.A. McClain, H. Maegawa, J. Levy, T. Huecksteadt, T.J. Dull, J. Lee, A. Ullrich, J.M. Olefsky, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8904.
- [403] H. Maegawa, D.A. McClain, G. Freidenberg, J.M. Olefsky, M. Napier, T. Lipari, T.J. Dull, J. Lee, A. Ullrich, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8912.
- [404] C.K. Chou, T.J. Dull, D.S. Russell, R. Gherzi, D. Lebwohl, A. Ullrich, O.M. Rosen, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 1842.
- [405] H. Maegawa, J.M. Olefsky, S. Thies, D. Boyd, A. Ullrich, and D.A. McClain, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 12629.
- [406] M. Odawara, T. Kadowaki, R. Yamamoto, Y. Shibasaki, K. Tobe, D. Accili, C. Bevins, Y. Mikami, N. Matsuura, Y. Akanuma, *et al.*, *Science* **1989**, 245, 66.
- [407] D.E. Moller, A. Yokota, M.F. White, A.G. Pazianos, J.S. Flier, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 14979.
- [408] M.F. White, S.E. Shoelson, H. Keutmann, C.R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 2969.
- [409] B. Vogt, J.M. Carrascosa, B. Ermel, A. Ullrich, H.U. Häring, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 177, 1013.
- [410] P.A. Wilden, K. Siddle, E. Haring, J.M. Backer, M.F. White, C.R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13719.
- [411] M.F. White, J.N. Livingston, J.M. Backer, V. Lauris, T.J. Dull, A. Ullrich, C.R. Kahn, *Cell* **1988**, 54, 641.
- [412] Y. Kaburagi, K. Momomura, R. Yamamoto-Honda, K. Tobe, Y. Tamori, H. Sakura, Y. Akanuma, Y. Yazaki, T. Kadowaki, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 16610.
- [413] D. Chen, D.J. Van Horn, M.F. White, J.M. Backer, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 4711.
- [414] A.D. Keegan, K. Nelms, M. White, L.M. Wang, J.H. Pierce, W.E. Paul, *Cell* **1994**, 76, 811.
- [415] X.J. Sun, L.M. Wang, Y. Zhang, L. Yenush, M.G. Myers Jr., E. Glasheen, W.S. Lane, J.H. Pierce, M.F. White, *Nature* **1995**, 377, 173.

- [416] G. Wolf, T. Trüb, O. Ottinger, L. Groninga, A. Lynch, M.F. White, M. Miyazaki, J. Lee, S.E. Shoelson, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 27407.
- [417] M.G. Myers, J.M. Backer, K. Siddle, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 10616.
- [418] R.S. Thies, A. Ullrich, D.A. McClain, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 12820.
- [419] L. Pang, K.L. Milarski, M. Ohmichi, Y. Takata, J.M. Olefsky, A.R. Saltiel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10604.
- [420] R. Yamamoto-Honda, T. Kadowaki, K. Momomura, K. Tobe, Y. Tamori, Y. Shibasaki, Y. Mori, Y. Kaburagi, O. Koshio, and Y. Akanuma, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 16859.
- [421] E.P. Pessin, A.R. Saltiel, *J. Clin. Invest.* **2000**, 106, 165.
- [422] W. Vogel, A. Ullrich, *Cell Growth Differ.* **1996**, 7, 1589.
- [423] A. Kharitonov, J. Schneckenger, Z. Chen, P. Knyazev, S. Ali, E. Zwick, M. White, A. Ullrich, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29189.
- [424] T. Uchida, T. Matozaki, T. Noguchi, T. Yamao, K. Horita, T. Suzuki, Y. Fujjoka, C. Sakamoto, M. Kasuga, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 12220.
- [425] B.L. Seely, P.A. Staubs, D.R. Reichart, P. Berhanu, K.L. Milarski, A.R. Saltiel, J. Kusari, J.M. Olefsky, *Diabetes* **1996**, 45, 1379.
- [426] X.J. Sun, P. Rothenberger, C.R. Kahn, J.M. Backer, E. Araki, P.A. Wilden, D.A. Cahill, B.J. Goldstein, M.F. White, *Nature* **1991**, 352, 73.
- [427] J.A. Johnson, L.M. Wang, E.P. Hanson, X.J. Sun, M.F. White, S.A. Oakes, J.H. Pierce, J.J. O'Shea, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 28527.
- [428] L.S. Argetsinger, G.W. Hsu, M.G. Myers Jr., N. Billestrup, M.F. White, C. Carter-Su, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14685.
- [429] S. Uddin, L. Yenush, X.J. Sun, M.E. Sweet, M.F. White, L.C. Plataniias, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 15938.
- [430] L.C. Plataniias, S. Uddin, A. Yetter, X.J. Sun, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 278.
- [431] M.F. White, R. Maron, C.R. Kahn, *Nature* **1985**, 318, 183.
- [432] P.L. Rothenberg, W.S. Lane, A. Karasik, J. Backer, M. White, C.R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 8302.
- [433] S.R. Keller, K. Kitagawa, R. Aebersold, G.E. Lienhard, C.W. Garner, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 12817.
- [434] E. Araki, X.J. Sun, B.L. Haag 3rd, L.M. Chuang, Y. Zhang, T.L. Yang-Feng, M.F. White, C.R. Kahn, *Diabetes*. **1993**, 42, 1041.
- [435] M. Nishiyama, J.R. Wands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 183, 280.
- [436] M. Miralpeix, X. Sun, J.M. Backer, M.G. Myers Jr., E. Araki, M.F. White, *Biochemistry* **1992**, 31, 9031.
- [437] X.J. Sun, D.L. Crimmins, M.G. Myers Jr., M. Miralpeix, M.F. White, *Mol. Cell Biol.* **1993**, 13, 7418.
- [438] S.E. Shoelson, S. Chatterjee, M. Chaudhuri, M.F. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 2027.
- [439] B.E. Lavan, W.S. Lane, G.E. Lienhard, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 11439.
- [440] J. Smith-Hall, S. Pons, M.E. Patti, D.J. Burks, L. Yenush, X.J. Sun, C.R. Kahn, M.F. White, *Biochemistry* **1997**, 36, 8304.
- [441] M. Holgado-Madruga, D.R. Emlet, D.K. Moscatello, A.K. Godwin, A.J. Wong, *Nature* **1996**, 379, 560.
- [442] K.S. Kovacina, R.A. Roth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 192, 1303.
- [443] Y. Yamanashi, D. Baltimore, *Cell*, **1997**, 88, 205.
- [444] G.D. Holman, M. Kasuga, *Diabetologia*, **1997**, 40, 991.

- [445] M.G. Myers Jr., T.C. Grammer, J. Brooks, E.M. Glasheen, L.M. Wang, X.J. Sun, J. Blenis, J.H. Pierce, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11715.
- [446] T.A. Gustafson, W. He, A. Craparo, C.D. Schaub, T.J. O'Neill, *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*, 2500.
- [447] A. Craparo, T.J. O'Neill, T.A. Gustafson, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15639.
- [448] S. Dhe-Paganon, E.A. Ottinger, D.R. Nolte, M.J. Eck, S.E. Shoelson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8378.
- [449] M.J. Eck, S. Dhe-Paganon, T. Trub, R. Nolte, S.E. Shoelson, *Cell* **1996**, *85*, 695.
- [450] M.M. Zhou, B. Huang, E.T. Olejniczak, R.P. Meadows, S.B. Shuker, M. Miyazaki, T. Trub, S.E. Shoelson, S.W. Fesik, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 388.
- [451] M.A. Lemmon, K.M. Ferguson, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, *228*, 39.
- [452] M. Ridderstrale, E. Degerman, H.E. Tornqvist, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3471.
- [453] L. Yennush, M.F. White, *BioEssays*. **1997**, *19*, 491.
- [454] L.A. Velloso, F. Folli, X.J. Sun, M.F. White, M.J. Saad, C.R. Kahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12490.
- [455] M.G. Myers Jr., L.M. Wang, X.J. Sun, Y. Zhang, L. Yenush, J. Schlessinger, J.H. Pierce, M.F. White, *Mol. Cell Biol.* **1994**, *14*, 3577.
- [456] X.J. Sun, S. Pons, T. Asano, M.G. Myers Jr., E.M. Glasheen, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10583.
- [457] D. Beitner-Johnson, V.A. Blakesley, Z. Shen-Orr, M. Jimenez, B. Stannard, L.M. Wang, J. Pierce, D. LeRoith, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9287.
- [458] K. Vuori, E. Rusolahti, *Science* **1994**, *266*, 1576.
- [459] Z.L. Fei, C. D'Ambrosio, S. Li, E. Surmacz, R. Baserga, *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*, 4232.
- [460] M.G. Myers Jr., M.F. White, *Trends Endocrinol. Metab.* **1995**, *6*, 209.
- [461] M.G. Myers Jr., Y. Zhang, G.A. Aldaz, T. Grammer, E.M. Glasheen, L. Yenush, L.M. Wang, X.J. Sun, J. Blenis, J.H. Pierce, M.F. White, *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 4147.
- [462] T.F. Franke, S.I. Yang, T.O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D.K. Morrison, D.R. Kaplan, P.N. Tsichlis, *Cell* **1995**, *81*, 727.
- [463] M.T. Diaz-Meco, J. Lozano, M.M. Municio, E. Berra, S. Frutos, L. Sanz, J. Moscat, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 31706.
- [464] P.R. Sheperd, D.J. Withers, K. Siddle, *Biochem. J.* **1998**, *333*, 471.
- [465] J.M. Backer, G.G. Schroeder, C.R. Kahn, M.G. Myers Jr., P.A. Wilden, D.A. Cahill, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1367.
- [466] M.G. Myers Jr., J.M. Backer, X.J. Sun, S. Shoelson, P. Hu, J. Schlessinger, M. Yoakim, B. Schaffhausen, M.F. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10350.
- [467] T. Rordorf-Nikolic, D.J. Van Horn, D. Chen, M.F. White, J.M. Backer, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3662.
- [468] D.R. Alessi, M. Andejkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, B.A. Hemmings, *EMBO J.* **1996**, *15*, 6541.
- [469] D.R. Alessi, S.R. James, C.P. Downes, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese, P. Cohen, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 261.
- [470] D. Stokoe, L.R. Stephens, T. Copeland, P.R. Gaffney, C.B. Reese, G.F. Painter, A.B. Holmes, F. McCormick, P.T. Hawkins, *Science* **1997**, *277*, 567.
- [471] A.D. Kohn, F. Takeuchi, R.A. Roth, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21920.
- [472] G.E. Lienhard, J.W. Slot, D.E. James, M.M. Mueckler, *Scientific American* **1992**, *266*, 86.
- [473] T. Okada, Y. Kawano, T. Sakakibara, O. Hazeki, M. Ui, *J. Biochem.* **1994**, *269*, 3563.
- [474] M. Ridderstrale, H. Tornqvist, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203*, 306.

- [475] K. Hara, K. Yonezawa, H. Sakaue, A. Ando, K. Kotani, T. Kitamura, Y. Kitamura, H. Ueda, L. Stephens, T.R. Jackson, P.T. Hawkins, R. Dhand, A.E. Clark, G.D. Holman, M.D. Waterfield, M. Kasuga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7415.
- [476] X. Xu, W.E. Sonntag, *Trends Endocrinol. Metab.* **1996**, *7*, 145.
- [477] A.D. Kohn, S.A. Summers, M.J. Birnbaum, R.A. Roth, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31372.
- [478] M.L. Standaert, L. Galloway, P. Karnam, G. Bandyopadhyay, J. Moscat, R.V. Farese, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30075.
- [479] M.L. Standaert, G. Bandyopadhyay, L. Perez, D. Price, L. Galloway, A. Poklepovic, M.P. Sajan, V. Cenni, A. Sirri, J. Moscat, A. Toker, R.V. Farese, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25308.
- [480] G. Bandyopadhyay, M.L. Standaert, L. Galloway, J. Moscat, R.V. Farese, *Endocrinology* **1997**, *138*, 4721.
- [481] K. Kotani, W. Ogawa, M. Matsumoto, T. Kitamura, H. Sakaue, Y. Hino, K. Miyake, W. Sano, K. Akimoto, S. Ohno, M. Kasuga, *Mol. Cell Biol.* **1998**, *18*, 6971.
- [482] R. Mendez, G. Kollmorgen, M.F. White, R.E. Rhoads, *Mol. Cell Biol.* **1997**, *17*, 5184.
- [483] G. Bandyopadhyay, M.L. Standaert, M.P. Sajan, L.M. Karnitz, L. Cong, M.J. Quon, R.V. Farese, *Mol. Endocrinol.* **1999**, *13*, 1766.
- [484] P. Cohen, *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **1999**, *354*, 485.
- [485] C.L. Sable, N. Filippa, C. Filloux, B.A. Hemmings, E. Van Obbergehn, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29600.
- [486] J.A. Le Good, W.H. Ziegler, D.B. Parekh, D.R. Alessi, P. Cohen, P.J. Parker, *Science* **1998**, *281*, 2042.
- [487] M.M. Chou, W. Hou, J. Johnson, L.K. Graham, M.H. Lee, C.S. Chen, A.C. Newton, B.S. Schaffhausen, A. Toker, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 1069.
- [488] L.V. Ravichandran, D.L. Esposito, J. Chen, M.J. Quon, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3543.
- [489] Y.F. Liu, K. Paz, A. Herschkowitz, A. Alt, T. Tennenbaum, S.R. Sampson, M. Ohba, T. Kuroki, D. LeRoith, Y. Zick, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14459.
- [490] M.R. Kuhne, Z. Zhao, J. Rowles, B.E. Lavan, S.H. Shen, E.H. Fischer, G.E. Lienhard, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15833.
- [491] N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, J. Schlessinger, *Nature* **1993**, *363*, 85.
- [492] M.A. Simon, G.S. Dodson, G.M. Rubin, *Cell* **1993**, *73*, 169.
- [493] D.W. Rose, A.R. Saltiel, M. Majumdar, S.J. Decker, J.M. Olefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 797.
- [494] T. Sasaoka, B. Draznin, J.W. Leitner, W.J. Langlois, J.M. Olefsky, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10734.
- [495] T.M. Roberts, *Nature* **1992**, *360*, 534.
- [496] E.J. Lowenstein, R.J. Daly, A.G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E.Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, J. Schlessinger, *Cell* **1992**, *70*, 431.
- [497] V. Aguirre, M.F. White, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **2000**, *7*, 1.
- [498] N. Hashimoto, E.P. Feener, W.R. Zhang, B.J. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13811.
- [499] R. Lammers, N.P. Moller, A. Ullrich, *FEBS Lett.* **1997**, *404*, 37.
- [500] M. Elchebly, P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A.L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C.C. Chan, C. Ramachandran, M.J. Gresser, M.L. Tremblay, B.P. Kennedy, *Science* **1999**, *283*, 1544.
- [501] M.G. Myers Jr., R. Mendez, P. Shi, J.H. Pierce, R. Rhoads, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26908.

- [502] M. Kasuga, Y. Zick, D.L. Blith, F.A. Karlsson, H.U. Häring, C.R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 9891.
- [503] S. Takayama, M.F. White, V. Lauris, C.R. Kahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 7797.
- [504] G.E. Bollag, R.A. Roth, J. Beaudoin, D. Mochly-Rosen, D.E. Koshland Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 5822.
- [505] H. Häring, D. Kirsch, B. Obermaier, B. Ermel, F. Machicao, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 3869.
- [506] B. Obermaier, B. Ermel, D. Kirsch, J. Mushack, E. Rattenhuber, E. Biemer, F. Machicao, H.U. Häring, *Diabetologia* **1987**, 30, 93.
- [507] F. Liu, R.A. Roth, *FEBS Lett.* **1994**, 352, 389.
- [508] R.E. Lewis, D.J. Volle, S.D. Sanderson, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 26259.
- [509] M.P. Coghlan, T.S. Pillay, J.M. Tavare, K. Siddle, *Biochem. J.* **1994**, 303, 893.
- [510] R.E. Lewis, L. Cao, D. Perregaux, M.P. Czech, *Biochemistry* **1990**, 29, 1807.
- [511] J. Ahn, D.B. Donner, O.M. Rosen, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 7571.
- [512] J.M. Tavare, M. Dickens, *Biochem. J.* **1991**, 274, 173.
- [513] B. Bossenmaier, L. Mosthaf, H. Mischak, A. Ullrich, H.U. Häring, *Diabetologia* **1997**, 40, 863.
- [514] D. Jullien, J.F. Tanti, S.J. Heydrick, N. Gautier, T. Gremeaux, E. Van Obberghen, Y. Le Marchand-Brustel, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 15246.
- [515] H. Kanety, R. Feinstein, M.Z. Papa, R. Hemi, A. Karasik, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23780.
- [516] J.F. Tanti, T. Gremeaux, E. van Obberghen, Y. Le Marchand-Brustel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 6051.
- [517] V. Aguirre, T. Uchida, L. Yenush, R. Davis, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 9047.
- [518] M. Kellerer, J. Mushack, E. Seffer, H. Mischak, A. Ullrich, H.U. Häring, *Diabetologia* **1998**, 41, 833.
- [519] G.S. Hotamisligil, P. Peraldi, A. Budvari, R. Ellis, M.F. White, B.M. Spiegelman, *Science* **1996**, 271, 665.
- [520] K. Paz, R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, H. Kanety, Y. Zick, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29911.
- [521] K. De Fea, R.A. Roth, *Biochemistry* **1997**, 36, 12939.
- [522] K. De Fea, R.A. Roth, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 31400.
- [523] H. Eldar-Finkelmann, E.G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 9660.
- [524] K. Lam, C.L. Carpenter, N.B. Ruderman, J.C. Friel, K.L. Kelly, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20648.
- [525] H. Hug, T.F. Sarre, *Biochem. J.* **1993**, 291, 329.
- [526] Y. Takai, A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori, Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 3629.
- [527] M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 7847.
- [528] Y. Ono, T. Fujii, K. Ogita, U. Kikkawa, K. Igarashi, Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 6927.
- [529] L.V. Dekker, P.J. Parker, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 73.
- [530] R.B. Pearson, B.E. Kemp, *Methods Enzymol.* **1991**, 200, 62.
- [531] P.J. Kennelly, E.G. Krebs, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 15555.
- [532] R.M. Bell, D.J. Burns, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4661.
- [533] C. House, B.E. Kemp, *Science* **1987**, 238, 1726.
- [534] J.W. Orr, A.C. Newton, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 8383.

- [535] A.C. Newton, *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 973.
- [536] S.S. Taylor, E. Radzio-Andzelm, *Structure* **1994**, *2*, 345.
- [537] A.C. Newton, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28495.
- [538] H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 659.
- [539] K.L. O'Connell, J.T. Stults, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 349.
- [540] P.J. Watkins, I. Jardine, J.X. Zhou, *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, *19*, 957.
- [541] I. van Oostveen, A. Ducret, R. Aebersold, *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 310.
- [542] K.L. Stone, R. DeAngelis, M. LoPresti, J. Jones, V.V. Papov, K.R. Williams, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1046.
- [543] J.R. Yates III, A.L. McCormack, D. Schieltz, E. Carmack, A. Link, *J. Protein Chem.* **1997**, *16*, 495.
- [544] A.L. McCormack, D.M. Schieltz, B. Goode, S. Yang, G. Barnes, D. Drubin, J.R. Yates III, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 767.
- [545] D. Arnott, W.J. Henzel, J.T. Stults, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 968.
- [546] A. Ullrich, J.R. Bell, E.Y. Chen, R. Herrera, L.M. Petruzzelli, T.J. Dull, A. Gray, L. Coussens, Y.C. Liao, M. Tsubokawa, A. Mason, P.H. Seeburg, C. Grunfeld, O.M. Rosen, J. Ramachandran, *Nature* **1985**, *313*, 756.
- [547] W. Zhang, B.T. Chait, *Proceedings of the 43th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics*, Atlanta, GA, **1995**.
- [548] Rev. T. Bayes, *Trans. R. Soc. London* **1763**, *53*, 370.
- [549] M.F. White, H.U. Häring, M. Kasuga, C.R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 255.
- [550] C. Miele, M. Caruso, V. Calleja, R. Auricchio, F. Oriente, P. Formisano, G. Condorelli, A. Cafieri, D. Sawka-Verhelle, E. Van Obberghen, F. Beguinot, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3094.
- [551] R.E. Lewis, G.P. Wu, G.G. MacDonald, M.P. Czech, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 947.
- [552] H. Al-Hasani, B. Eisermann, N. Tennagels, C. Magg, W. Passlack, M. Koenen, D. Muller-Wieland, H.E. Meyer, H.W. Klein, *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 65.
- [553] F. Liu, R.A. Roth, *Biochem. J.* **1994**, *298*, 471.
- [554] L. Berti, L. Mosthaf, G. Kroder, M. Kellerer, S. Tippmer, J. Mushack, E. Seffer, K. Seedorf, H. Häring, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3381.
- [555] L. Mosthaf, L. Berti, M. Kellerer, J. Mushack, E. Seffer, B. Bossenmaier, M. Coghlan, K. Siddle, A. Ullrich, H.U. Häring, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *227*, 787.
- [556] V. Strack, B. Bossenmaier, B. Stoyanov, L. Mosthaf, M. Kellerer, R. Lammers, H.U. Häring, *FEBS Lett.* **1999**, *449*, 111.
- [557] V. Strack, A.M. Hennige, J. Krützfeldt, B. Bossenmaier, H.H. Klein, M. Kellerer, R. Lammers, H.U. Häring, *Diabetologia*. **2000**, *43*, 443.
- [558] B. Bossenmaier, V. Strack, B. Stoyanov, J. Krützfeldt, A. Beck, R. Lehmann, M. Kellerer, H.H. Klein, A. Ullrich, R. Lammers, H.U. Häring, *Diabetes* **2000**, *49*, 889.
- [559] K. Nishikawa, A. Toker, F.J. Johannes, Z. Songyang, L.C. Cantley, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 952.
- [560] A. Aderem, *Cell* **1992**, *71*, 713.
- [561] A. Aderem, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 438.
- [562] P.J. Blackshear, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1501.
- [563] B.E. Lavan, V.R. Fantin, E.T. Chang, W.S. Lane, S.R. Keller, G.E. Lienhard, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21403.
- [564] A. Virkamaki, K. Ueki, C.R. Khan, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 931.
- [565] I. Mothe, E. Van Obberghen, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11222.
- [566] J. Li, K. DeFea, R.A. Roth, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9351.
- [567] K. Paz, R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, H. Kanety, Y. Zick, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29918.

-
- [568] J.E. Chin, F. Liu, R.A. Roth, *Mol. Endocrinol.* **1994**, *8*, 51.
- [569] P. De Meyts, *Diabetologia* **1995**, *37*, 135.
- [570] J.M. Richardson, J.E. Pessin, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21021.
- [571] G. Kroder, B. Bossenmaier, M. Kellerer, E. Capp, B. Stoyanov, A. Muhlhofer, L. Berti, H. Horikoshi, A. Ullrich, H. Häring, *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1471.
- [572] L.Y. Qiao, J.L. Goldberg, J.C. Russell, X.J. Sun, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10625.
- [573] G. Li, M. Waltham, N.L. Anderson, E. Unsworth, A. Treston, J.N. Weinstein, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 391.
- [574] O.N. Jensen, M. Wilm, A. Shevchenko, M. Mann, *Methods in Molecular Biology*, A.J. Link (Hrsg.) **1999**, *112*, 571.
- [575] C.C. Retamal, P. Thiebaut, E.W. Alves, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 15.
- [576] K. Mock, M. Hail, I. Mylchreest, J. Zhou, K. Johnson, I. Jardine, *J. Chromatogr.* **1993**, *646*, 169.
- [577] T.G. Heath, A.B. Giordani, *J. Chromatogr.* **1993**, *638*, 9.
- [578] J.P. Chang, D.E. Kiehl, A. Kennington, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1266.
- [579] W. Zhang, B.T. Chait, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2482.
- [580] A. Ducret, I. van Oostveen, J.K. Eng, J.R. Yates III, R. Aebersold, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 706.
- [581] A. Ducret, C.F. Bruun, E.J. Bures, G. Marhaug, G. Husby, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1996**, *17*, 866.
- [582] G.E. Reid, R.J. Simpson, R.A. O'Hair, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 1047.
- [583] J.H. Till, R.S. Annan, S.A. Carr, W.T. Miller, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7423.
- [584] L. Rui, V. Aguirre, J.K. Kim, G.I. Shulman, A. Lee, A. Corbould, A. Dunaif, M.F. White, *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 181.
- [585] V. Aguirre, E.D. Werner, J. Giraud, Y.H. Lee, S.E. Shoelson, M.F. White, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1531.

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, H. Eckstein, G. Gauglitz, J. Gelinek, W. Göpel, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, I.-P. Lorenz, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, B. Rieger, W. Rundel, V. Schurig, F.F. Seelig, Ha. Stegmann, G. Staudt, J. Strähle, W. Voelter, U. Weber