

Mehrdimensionale chromatographische Trenntechniken für die Proteomanalyse

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

von

Dipl. Chem. Christian Schley

Saarbrücken
2006

Tag des Kolloquiums: 12. Januar 2007

Dekan: Prof. Dr. Kaspar Hegetschweiler

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Huber
Prof. Dr. Rolf Müller
Dr. Andreas Tholey

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei all denen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke besonders Herrn **Prof. Dr. Christian Huber** für die Vergabe dieses interessanten Themas, die sehr engagierte Betreuung und Unterstützung, sowie für das entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Herrn **Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Engelhardt**, Herrn **PD Dr. Frank Steiner** und Herrn **Dr. Markus Martin** für die Hilfestellung bei zahlreichen theoretischen Fragen danken.

Weiterhin will ich Herrn **Reiner Wintringer** (Windy), der nahezu für jedes apparative und technische Problem eine Lösung parat hatte und der zahlreiche monolithische Säulen für mich herstellte, danken.

Frau **Christa Göllen** und ihrer Vertretung Frau **Gabriele Krug** möchte ich für die Unterstützung bei bürokratischen Angelegenheiten, die mit deren Hilfe auch häufig unbürokratisch gelöst werden konnten, danken.

Außerdem möchte ich der kompletten Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen wissenschaftlichen und besonders nicht wissenschaftlichen Diskussionen danken. Hierbei sind zu erwähnen **Bettina Mayr, Hansjörg Toll, Nathanaël Delmotte, Andreas Leinenbach** und **Katja Melchior** (ehemalige Büromitglieder) sowie **Eva Luxenburger, Verena Fraaß, Iris Gostomski, Manuela Hügel, Anis Mahsunah, Rainer Geiss, Devid Hero, Sascha Quinten, Jens Mohr, Patrick Riefer** und **Bilgin Vatansever**.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich Herrn **Prof. Dr. Rolf Müller**, Herrn **Dr. Andreas Tholey** und Herrn **Matthias Altmeyer** danken.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitgliedern der Werkstatt, Herrn **Hans-Peter Skohoutil**, Herrn **Norbert Ochs**, Herrn **Jens Wiegert** und Herrn **Robin Adolph**, für die Unterstützung bei jeglichen technischen Belangen.

Für die materielle und finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei den Firmen **LCPackings – A Dionex Company, Bruker Daltonics** und **Roche Diagnostics**.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner **Familie** und meiner Freundin **Ute** bedanken, die mich stets unterstützten und mir mit sehr viel Verständnis und vor allem Geduld immer zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis und verwendete Formelzeichen	VII
Deutsche Zusammenfassung	X
Englische Zusammenfassung.....	XIII
Kapitel I: Problemstellung und Zielsetzung	1
Literatur	4
Kapitel II: Theoretischer Teil	7
1. Eigenschaften von Peptiden und Proteinen	8
1.1 Aufbau der Peptide und Proteine	8
1.2 Struktur und Eigenschaften der Peptide und Proteine.....	10
1.3 Proteolytische Spaltung von Proteinen.....	12
2. Kapillar-Hochleistungs-Flüssigchromatographie zur Analyse von Peptiden und Proteinen	15
2.1 Chromatographische Trennmethode für die Peptid- und Protein- analyse.....	18
2.1.1 Umkehrphasen- und Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC	19
2.1.2 Ionenaustauschchromatographie	22
2.2 Stationäre Phasen für die Bioanalytik.....	24
2.3 Mikro-Hochleistungs-Flüssigchromatographie.....	26
2.3.1 Instrumentelle Miniaturisierung von HPLC-Komponenten	27
2.3.2 Detektionsmethoden in der Kapillar-HPLC	31
2.4 Multidimensionale Hochleistungs-Flüssigchromatographie	33
3. Massenspektrometrie	35
3.1 Prinzip der Elektrospray-Ionisation	36
3.2 Funktionsweise des Ionenfallen-Massenanalysators	39
3.3 Peptid-/Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	43
3.3.1 Fragmentierungsreaktionen von Peptidionen	43
3.4 Computerunterstützte Interpretation von MS und MS/MS Spektren.....	45

4. Literatur	48
---------------------------	----

Kapitel III: Entwicklung eines zweidimensionalen HPLC-Systems und Charakterisierung der einzelnen Dimensionen.....53

1. Einleitung	54
----------------------------	----

2. Experimenteller Teil	58
--------------------------------------	----

2.1 Chemikalien und Materialien	58
---------------------------------------	----

2.2 Geräte	59
------------------	----

2.3 Kopplung der Mikro-HPLC mit dem Elektrospray-Massenspektrometer	60
---	----

2.4 Enzymatischer Proteinverdau.....	61
--------------------------------------	----

2.5 Packen der SCX-Kapillarsäulen mit der ProPac SCX Phase	62
--	----

3. Ergebnisse und Diskussion	64
---	----

3.1 Charakterisierung der individuellen chromatographischen Dimensionen	64
---	----

3.1.1 Charakterisierung der analytischen starken Kationenaustauscher- säule.....	64
---	----

3.1.2 Herstellung und Charakterisierung von SCX-Kapillarsäulen.....	71
---	----

3.1.3 Charakterisierung der Mikro-HPLC Anlagen.....	76
---	----

3.2 Entwicklung und Charakterisierung eines Mikro-HPLC-Systems zum Entsalzen und Aufkonzentrieren von Peptiden und Proteinen	92
---	----

3.2.1 Entwicklung und Charakterisierung einer PS-DVB Anreicherungs- säule.....	92
---	----

3.2.2 Kopplung der monolithischen Anreicherungssäule mit der monolithischen Trennsäule	100
---	-----

4. Zusammenfassung	113
---------------------------------	-----

5. Literatur	116
---------------------------	-----

Kapitel IV: Evaluierung und Optimierung des zwei-dimensionalen HPLC Systems 119

1. Einleitung	120
----------------------------	-----

2. Experimenteller Teil	122
--------------------------------------	-----

2.1 Chemikalien und Materialien	122
---------------------------------------	-----

2.2 Enzymatischer Proteinverdau.....	122
--------------------------------------	-----

2.3 Geräte	123
2.4 Computerunterstützte Datenauswertung der Massenspektren.....	125
3. Ergebnisse und Diskussion	126
3.1 Evaluierung der Kopplung aus Kationenaustausch- und Ionenpaar- Umkehrphasen-Chromatographie	126
3.1.1 Zweidimensionale Analyse (SCX x IP-RP) der 10er Protein- verdaue	128
3.1.2 Peptid- und Proteinidentifizierung	131
3.2 Optimierung des off-line 2D-HPLC-Systems	140
3.2.1 Optimierung der Aufkonzentrierung eines Peptidstandards an monolithischen PS-DVB Anreicherungsäulen.....	141
3.2.2 Optimierung der Aufkonzentrierung eines 10er Proteinverdaus an monolithischen PS-DVB Anreicherungsäulen.....	149
4. Zusammenfassung.....	154
5. Literatur.....	157

Kapitel V: Zweidimensionale Proteomanalyse des

Bakteriums <i>Myxococcus xanthus</i>	159
1. Einleitung.....	160
2. Experimenteller Teil	162
2.1 Chemikalien und Materialien	162
2.2 Geräte	162
2.3 Enzymatischer Verdau des <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 Proteoms	163
2.4 Computerunterstützte Datenauswertung der Massenspektren.....	164
3. Ergebnisse und Diskussion	166
3.1 SCX-Trennung des <i>Myxococcus xanthus</i> Lysats in der 1. Trenndimension	166
3.2 IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen der <i>Myxococcus xanthus</i> SCX- Fraktionen (2. Trenndimension)	167
3.3 Abhängigkeit der Retention von Peptiden an der ProPac SCX-10 Phase	173
3.4 Verschleppung von Peptiden über mehrere SCX-Fraktionen.....	181
3.5 Orthogonalität und theoretische Peakkapazität des 2D-HPLC Systems	186
3.6 Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	189

3.7 Nachweis von Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)	192
4. Zusammenfassung	195
5. Literatur	197
Anhang	199

Abkürzungsverzeichnis

AC	Affinitäts-Chromatographie
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
Bomb	Bombesin
Brad	Bradykinin
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Carbanh	Carboanhydrase
CE	Kapillarelektrophorese
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
Cyt C	Cytochrom C
D	Dimensional
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
ExPASy	Expert Protein Analysis System
FA	Ameisensäure
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz- Massenspektrometer
GE	Gelelektrophorese
Gl.	Gleichung
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
ICAT	Isotopen-markierte Affinitätskennzeichnung
ICC	Automatische Regulierung der Ionenfallen-Füllung
I.D.	Innendurchmesser
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEX	Ionenaustausch
IMAC	Metallaffinitäts-Chromatographie

IP	Ionenpaar
Leu Enk	Leucin Enkephalin
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
Lys	Lysozym
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Met Enk	Methionin Enkephalin
MOWSE	Molecular Weight Search
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSDB	Mass Spectrometry Protein Sequence DataBase
Myo	Myoglobin
NFPA	Nonafluorpentansäure
NP	Normalphase
NPC	Normalphasen-Chromatographie
Nr.	Nummer
O.D.	Außendurchmesser
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PEEK	Polyetheretherketon
PFF	Peptid-Fragment-Fingerprint
PFPA	Pentafluorpropionsäure
pl	isoelektrischer Punkt
PMF	Peptid-Massen-Fingerprint
PS-DVB	Poly(Styrol-Divinylbenzol)
Rib A	Ribonuklease A
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
RPC	Umkehrphasen-Chromatographie
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
RTICC	Rekonstruiertes Totales Ionenstrom Chromatogramm
SCX	Starker Kationenaustausch
SD	Standardabweichung
SEC	Größenausschluss-Chromatographie

Sub P	Substanz P
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer
Trans	Transferrin
UdFHA	Undecafluorhexansäure
UV	Ultraviolettes Licht
Vas [Arg ⁸]	[Arg ⁸]-Vasopressin
v:v	Zusammensetzung in Volumenprozent
Vis	Sichtbares Licht
w:w	Zusammensetzung in Gewichtsprozent
WW	Wechselwirkungen
z.B.	zum Beispiel
2D-GE	2 dimensionale Gelelektrophorese

Verwendete Formelzeichen

c	Konzentration
d_{micro}	Innendurchmesser der Mikrosäule
d_{conv}	Innendurchmesser der konventionellen Säule
ε_T	totale Porosität
f	Downscaling Faktor
F_p	Primärfluss
F_c bzw. F_r	Flussrate durch Säule bzw. durch Restriktionskapillare
k	Retentionsfaktor
M	Molarität [mol/l]
M_r	relative molare Masse
P	Peakkapazität
pH	negative dekadische Logarithmus der Oxoniumionenaktivität
$\text{p}K_a$	negative dekadische Logarithmus der Säurekonstante K_a
R	Korrelationskoeffizient
S/N	Signal-zu-Rauschen Verhältnis
t_G	Gradientendauer
t_M bzw. t_R	Durchflusszeit bzw. Gesamtretentionszeit
w_b bzw. w_h	Peakbasisbreite (bei 4σ) bzw. Peakhalbwertsbreite (bei 2.355σ)

Zusammenfassung

Die Proteomanalyse (Proteomik), welche als Ziel die Aufklärung der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt hat, stellt neben der Genomanalyse (Genomik), welche die Aufklärung der Gesamtheit aller Gene in einer Zelle beinhaltet, eines der wichtigsten Forschungsgebiete in der Bioanalytik dar. Während die Gene den Bauplan der Zelle enthalten, sind die Proteine für dessen Realisierung und Regulierung verantwortlich. Die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine über die intakten Proteine selbst oder ihre Fragmente (Peptide) kann aus diesen Gründen ausgenutzt werden, um spezifische Einblicke in biochemische Zellabläufe zu erhalten oder Biomarker für bestimmte Krankheiten zu identifizieren. Aufgrund der extrem hohen Komplexität von Proteomen und des großen dynamischen Bereichs der einzelnen Proteinkonzentrationen ($1-10^8$) sind für die Proteomik Analysemethoden vonnöten, die ein hohes Auflösungsvermögen, eine hohe Peakkapazität und ein niedriges Detektionslimit bieten. Mehrdimensionale Analysensysteme, welche zwei oder mehrere unterschiedliche Trenntechniken miteinander kombinieren, gewährleisten in Kopplung mit der Massenspektrometrie diese Vorgaben und haben sich aus diesem Grund auch schon mehrfach in der Proteomanalyse bewährt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung eines zweidimensionalen Chromatographiesystems unter Verwendung von monolithischen Poly(Styrol-Divinylbenzol) (PS-DVB) Kapillarsäulen, die sich schon mehrfach für die Analyse von Biomolekülen ausgezeichnet haben, für die Proteomanalyse beschrieben. Die Detektion und Identifizierung der Analyten wurde durch on-line Kopplung der 2. Dimension mit der Elektrospray-Ionenfallen Massenspektrometrie gewährleistet. Um einen hohen Orthogonalitätsgrad für das 2D-HPLC System zu erhalten wurden die PS-DVB Säulen (Ionenpaar-Umkehrphasen Chromatographiemodus, 2. Dimension) mit starken Kationenaustausch(SCX)-Säulen (1. Dimension) kombiniert. Vor der eigentlichen Kopplung wurden die jeweiligen Trenndimensionen zuerst individuell charakterisiert. Für die 1. Dimension wurden sowohl eine analytische 4.0 mm I.D. SCX-Säule als auch mehrere SCX-Kapillarsäulen getestet. Da die beste Trenneffizienz für Proteine und Peptide mit der analytischen SCX-Säule erreicht werden konnte, wurde diese für das 2D-HPLC System ausgewählt. Aufgrund der stark unterschiedlichen Säulendimensionen der SCX-Säule und der PS-DVB

Kapillarsäule, die in der 2. Dimension eingesetzt werden sollte, musste die Kopplung der beiden Trenndimensionen off-line über zwei komplett eigenständige HPLC-Anlagen erfolgen. Das Leistungsvermögen und die Zuverlässigkeit der beiden HPLC-Systeme konnte hierbei über detaillierte Charakterisierungen ermittelt werden.

Die Aufkonzentrierung und Entsalzung der SCX-Fractionen aus der 1. Trenndimension wurde mit einer monolithischen PS-DVB Anreicherungsäule (10 x 0.20 mm I.D.) durchgeführt. Für diese Säule wurde ein spezielles Gehäuse entwickelt, mit dem sich 3 - 10 mm lange Kapillarsäulen mit einem Außendurchmesser von 360 µm optimal in Mikro-HPLC Systeme einbinden lassen. Angeschlossen an eine Mikro-HPLC Anlage konnte über Langzeittests eine Druckstabilität von bis zu 400 bar für die Anreicherungsäulenhalterung nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Beladbarkeit der monolithischen Anreicherungsäule (10 x 0.20 mm I.D.) über Frontalanalysen ergaben 0.5 bis 1.6 µg für drei verschiedene Proteine (Serum Albumin, Carboanhydrase und Cytochrom C) und 0.6 µg für eine Mischung aus sechs bioaktiven Peptiden. Mit Hilfe der Trennung einer Mischung aus neun Peptiden konnte gezeigt werden, dass die Trenneffizienz von monolithischen Trennsäulen (100 und 200 µm I.D.) durch die Kombination mit einer monolithischen Anreicherungsäule um bis zu 20% erhöht werden konnte. Die Kombination aus beiden Säulen beinhaltete hierbei die Fokussierung der Analyten an der Anreicherungsäule, dann den Transfer der Analyten zur Trennsäule im Backflush-Modus und abschließend die Trennung der Analyten in der Trennsäule. Die Möglichkeit der Aufkonzentrierung von Analyten an der monolithischen Anreicherungsäule konnte mit einer 100-fach verdünnten Proteinmischung bestätigt werden. Bei Injektion gleicher Probenmengen konnte kein signifikanter Einfluss der Proteinkonzentration (unverdünnt oder 100-fach verdünnt) auf die Wiederfindung der Proteine festgestellt werden. Durch Erhöhung der Konzentration des Ionenpaar-Reagenzes sowie durch Verwendung von hydrophoberen Ionenpaar-Reagenzien in dem Eluenten, der für die Aufkonzentrierung der Proben an der Anreicherungsäule verwendet wurde, konnte die Effizienz der Anreicherung, speziell für kleine und hydrophile Peptide, gesteigert und schließlich optimiert werden. Optimale Anreicherungsbedingungen wurden mit 0.1 Vol% Heptafluorbuttersäure im Beladungseluenten erreicht.

Das zweidimensionale Chromatographiesystem mit der starken Kationenaustauschsäule in der 1. Dimension und den monolithischen PS-DVB

Säulen (Anreicherungs- und Trennsäule) in der 2. Dimension wurde schließlich mit tryptisch verdauten Proteinmischungen detailliert charakterisiert. Mit Hilfe der ausgewerteten Daten konnten unter anderem eine gute Reproduzierbarkeit der Peptididentifikation (46-74% für drei Wiederholungsmessungen) sowie eine zuverlässige Identifizierung von Peptiden/Proteinen bis zu einem dynamischen Konzentrationsbereich von 1 zu 650 nachgewiesen werden.

Nach der Entwicklung und Optimierung wurde das zweidimensionale HPLC-System erfolgreich für die Proteomanalyse des Mikroorganismus *Myxococcus xanthus* DK1622, welcher bekannt für die Produktion von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten ist, eingesetzt. Über Datenbankrecherche wurden 1312 unterschiedliche Peptide und 631 unterschiedliche Proteine identifiziert. Unter den 631 Proteinen konnten auch elf Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS), welche in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten in *Myxococcus xanthus* involviert sind, identifiziert werden. Mit Hilfe der zahlreichen Peptididentifikationsdaten konnte zusätzlich noch der hohe Grad der Orthogonalität der gekoppelten Trenndimensionen sowie das Elutionsverhalten der Peptide in der starken Kationenaustauschchromatographie (1. Trenndimension) dargelegt werden.

Abstract

Within the last two decades, two main fields of research have gained central attraction in bioanalysis: genome research (genomics), i.e. the examination of the whole hereditary information of a cell, and proteome research (proteomics), which comprises the examination of the totality of proteins in a cell under defined conditions and at a definite point in time. Whereas genes bear the construction plan of the biological cell, proteins are responsible for its realisation and regulation. Their identification and quantification via intact proteins or protein fragments (peptides), respectively, can be used to get specific insights into biochemical cell workflows or to find biomarkers for specified diseases. Because of the extremely high complexity of proteomes and the wide dynamic range of the protein concentrations ($1-10^8$), their analysis requires analytical methods with high resolving power, high peak capacity, and low limits of detection. These requirements can be achieved with the combination of multidimensional analysis methods, which comprise two or more different separation techniques, and mass spectrometry.

In this work we describe the development of a two-dimensional chromatographic system for proteome analyses using monolithic poly(styrene-divinylbenzene) (PS-DVB) capillary columns, which have proven to be very suitable for the analysis of biomolecules. The detection and identification of the analytes were accomplished by on-line coupling of the second dimension with electrospray ion trap mass spectrometry. To ensure a high degree of orthogonality, the PS-DVB columns, which were operated in ion-pair reversed-phase chromatography mode (second dimension), were coupled with strong cation-exchange columns (first dimension). Before coupling the columns, both separation dimensions were characterized individually. For the first dimension we tested an analytical 4.0 mm I.D. strong cation-exchange (SCX) column as well as several SCX capillary columns. Since the best separation efficiency for proteins and peptides was obtained with the analytical SCX column, we chose this column for the 2D-HPLC system. Because of large differences in column dimensions of the analytical SCX column and the PS-DVB capillary columns, both separation dimensions had to be coupled off-line via two completely independent HPLC systems. The performance and the reliability of both HPLC systems were characterised by means of detailed experiments.

Preconcentration and desalination of the collected SCX-fractions were accomplished with a monolithic PS-DVB trap column (10 x 0.20 mm I.D.). For this column we developed a special housing, which can be used to connect capillary columns with lengths of 3 – 10 mm and with an outer diameter of 360 µm to micro HPLC systems. Pressure durability tests approved long term stability up to 400 bar for this setup. Frontal analyses revealed loadabilities for the 10 x 0.20 mm I.D. preconcentration column between 0.5 and 1.6 µg for three different proteins (serum albumin, carbonic anhydrase and cytochrome c) and 0.6 µg for a mixture of six bioactive peptides. A 20% decrease in the average peak widths of nine peptides was obtained upon combining an analytical separation column (100 and 200 µm I.D.) with a preconcentration column as compared with a setup using an analytical separation column only. The combination of both columns comprised the focusing of the analytes on the preconcentration column, subsequently the transfer of the analytes to the analytical column in backflush mode, and finally the separation of the analytes in the analytical column. The applicability of monolithic trap columns to concentrate analytes was approved by a 100-fold diluted protein mixture. By injecting the same amounts of proteins we could not determine a significant influence of the protein concentration (undiluted or 100-fold diluted) on protein recovery. Trapping efficiency, especially for small and hydrophilic peptides, was optimized by increasing the concentration of the ion pair reagent and by using more hydrophobic ion pair reagents in the sample loading solvent. Optimal trapping conditions could be achieved with 0.1 vol% heptafluorobutyric acid in the loading solvent.

The off-line two-dimensional chromatography system, combining a strong cation-exchange column (first dimension) and two monolithic PS-DVB columns (preconcentration and separation column, second dimension), was characterized in detail with tryptic protein digests. The evaluated data revealed good reproducibility of peptide identification (46-75% for triplicate analyses) and reliable identification of peptides/proteins up to a dynamic concentration range of 1 to 650.

After development and optimisation of the 2D-system we applied this HPLC setup successfully to the proteome analysis of the microorganism *Myxococcus xanthus* DK1622, which is known to be a potent producer of biologically active secondary metabolites. Upon automated database searching, 1312 unique peptides and 631 unique proteins were identified. Among the 631 proteins we could also identify eleven polyketide synthases (PKS) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS), which

are known to be involved in the biosynthesis of various secondary metabolites in *Myxococcus xanthus*. By means of the large peptide identification data the high degree of orthogonality of the coupled separation dimensions as well as the elution behaviour of peptides in strong cation-exchange chromatography (first separation dimension) were additionally demonstrated.

Kapitel I

Problemstellung und Zielsetzung

I. Problemstellung und Zielsetzung

Die Probenvorbereitung repräsentiert einen essentiellen und meist kritischen Schritt für jedes analytische Verfahren, das auf die Identifizierung und Quantifizierung von Komponenten aus komplexen Matrices abzielt^[1]. Voll automatisierte on-line Probenaufbereitung mittels Kopplung von Anreicherungs- und Trennsäulen hat eine lange Tradition in der chromatographischen Analyse von komplexen Probemischungen^[2]. Die Anreicherungssäule besitzt in diesen Anwendungen die Funktion, die gewünschten Analyten aus der Matrix zu isolieren und aufzukonzentrieren. Die Entfernung der Matrixbestandteile aus der Probe gewährleistet hierbei eine bessere Möglichkeit der Trennung und Detektion der Analyten. Die prominentesten Anwendungen der on-line Säulenschaltung stellen die Anreicherung von umweltrelevanten Analyten im Spurenbereich^[3;4] und die Bestimmung von Pharmazeutika oder Metaboliten in biologischen Proben^[5-7] dar.

In der Mikro-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (Mikro-HPLC) werden Anreicherungssäulen häufig eingesetzt, um die Injektion von großen Volumina und die Fokussierung von verdünnten Proben zu ermöglichen. Die Fokussierung der Analyten an der Anreicherungssäule bewirkt hierbei, dass die Trennperformance der analytischen Säule nicht negativ durch Volumenüberladung beeinflusst wird. Um die Beladungsdauer der Anreicherungssäule relativ kurz zu halten, wird die Probe bei einer hohen Flussrate auf die Anreicherungssäule injiziert. Aus diesem Grund sind die Anreicherungssäulen meist sehr kurz, um somit einen hohen Druckabfall während der Beladungsphase zu vermeiden. Nach der Anreicherung der Analyten werden diese über eine Säulenschaltung zu der analytischen Mikrosäule, wo die Trennung stattfindet, transferiert^[8]. Seit einiger Zeit hat diese Technik nun auch Einzug in die multidimensionale on- bzw. off-line Analyse von komplexen biologischen Proben (z.B. Proteom) gefunden^[9-14]. Bei dieser Anwendung werden Fraktionen aus der ersten Trenndimension zuerst an einer Anreicherungssäule aufkonzentriert, bevor sie schließlich in der nächsten Trenndimension weiter aufgetrennt werden. Bei der multidimensionalen Analyse von Proteinen und Peptiden hat sich besonders die Ionenaustauschchromatographie für die Fraktionierung in der ersten Trenndimension ausgezeichnet. In der zweiten Dimension hat sich die Umkehrphasen-Chromatographie, aufgrund der Orthogonalität zur Ionenaustauschchromatographie bezüglich der Trennmechanismen als auch

aufgrund der Möglichkeit zur on-line Kopplung mit der Elektrospray Ionisations (ESI) Massenspektrometrie oder der Matrix-unterstützten Laser Desorptions/Ionisations (MALDI) Massenspektrometrie, bewährt. Bei der Kopplung von HPLC und MS ist eine effiziente Entsalzung der Proben unerlässlich bevor diese ins Massenspektrometer zur Detektion und Identifizierung überführt werden^[15;16].

Bei der Kopplung von Anreicherungssäulen mit Trennsäulen sind grundsätzlich zwei Hauptkriterien zu beachten. Zum einen muss die Retentionsstärke der stationären Phase in der Anreicherungssäule relativ hoch sein, damit die Analyten während des Aufkonzentrierungsschrittes auf der Säule zurückgehalten werden und somit nicht verloren gehen. Zum anderen muss die stationäre Phase der Anreicherungssäule aber auch bezüglich der Retentionsstärke an die stationäre Phase der analytischen Trennsäule angepasst werden. Hierbei muss, damit die Analyten nach der Elution von der Anreicherungssäule noch Retention an der Trennsäule erfahren, die Retentionsstärke der Trennsäule gleich groß oder sogar größer sein als die der Anreicherungssäule.

Kapillarsäulen gepackt mit monolithischen Poly(Styrol-Divinylbenzol) (PS-DVB) Phasen haben sich bereits mehrfach für die hochauflösende Trennung von Biopolymeren wie Proteine^[17-19], Peptide^[20-23] und Nukleinsäuren^[24;25] ausgezeichnet. Will man die hohe Trenneffizienz dieser Säulen in multidimensionalen HPLC-Systemen ausnutzen, so muss man geeignete Anreicherungssäulen finden, welche mit diesen Säulen kombiniert werden können. Da die Hydrophobie von oktadekylierten stationären Phasen, die herkömmlich in Anreicherungssäulen verwendet werden, wesentlich höher ist als die von monolithischen PS-DVB Phasen, ist eine Kombination von diesen beiden Phasen ausgeschlossen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein zweidimensionales HPLC-System unter Verwendung von monolithischen PS-DVB Säulen zu entwickeln. Das entwickelte HPLC-System sollte anschließend mit einem Elektrospray-Ionenfallen Massenspektrometer gekoppelt werden. Aufgrund der geplanten Verwendung von PS-DVB Monolithen in der zweiten Trenndimension musste im Rahmen dieser Arbeit auch eine geeignete Anreicherungssäule angefertigt werden. Diese musste in ihren Dimensionen und ihrer Retentionsstärke sowohl die Kombination mit monolithischen PS-DVB Kapillarsäulen als auch die effiziente Aufkonzentrierung der Fraktionen aus der ersten Trenndimension gewährleisten. In der ersten Trenndimension sollte die Ionenaustauschchromatographie, die sich in Kombination mit der Umkehrphasen-

Chromatographie schon in vielen multidimensionalen Chromatographiesystemen bewährt hat^[14;16;26-31], eingesetzt werden. Nach der Entwicklung und einer umfassenden Charakterisierung und gegebenenfalls Optimierung sollte das 2D-System anschließend für die Proteomanalytik verwendet werden.

Literatur

1. J. Henion, E. Brewer, G. Rule, *Anal. Chem.*, 70 (1998), 650A-656A.
2. R. W. Frei, K. Zech, *Selective Sample Handling and Detection in High-Performance Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1988.
3. A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *J. Chromatogr. A*, 960 (2002), 109-19.
4. C. Rivasseau, G. Vanhoenacker, P. Sandra, M.-C. Hennion, *J. Microcol. Sep.*, 12 (2000), 323-332.
5. S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. B*, 801 (2004), 141-156.
6. J. L. Veuthey, S. Souverain, S. Rudaz, *Ther. Drug Monit*, 26 (2004), 161-6.
7. E. Hagemeyer, K.-S. Boos, E. Schlimme, K. Lechtenbörger, A. Kettrup, *J. Chromatogr.*, 268 (1983), 291-295.
8. J. P. C. Vissers, H. Claessens, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997), 1-28.
9. M. T. Davis, J. Beierle, E. T. Bures, M. D. McGinley, J. Mort, J. H. Robinson, C. S. Spahr, W. Yu, R. Luethy, S. D. Patterson, *J. Chromatogr. B*, 752 (2001), 281-91.
10. W. H. McDonald, R. Ohi, D. T. Miyamoto, T. Mitchison, J. R. Yates III, *Int. J. Mass Spectrometry*, 219 (2002), 245-251.
11. Y. Shen, R. J. Moore, R. Zhao, J. Blonder, D. L. Auberry, C. Masselon, L. Pasatolic, K. K. Hixson, K. J. Auberry, R. D. Smith, *Anal. Chem.*, 75 (2003), 3596-

- 3605.
12. D. Chelius, T. Zhang, G. Wang, R.-F. Shen, *Anal. Chem.*, 75 (2003), 6658-6665.
 13. Y. Shen, N. Tolic, C. Masselon, L. Pasa-Tolic, D. G. Camp 2nd, K. K. Hixson, R. Zhao, G. A. Anderson, R. D. Smith, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 144-54.
 14. G. Mitulovic, C. Stingl, M. Smoluch, R. Swart, J. P. Chervet, I. Steinmacher, C. Gerner, K. Mechtler, *Proteomics*, 4 (2004), 2545-57.
 15. G. J. Opiteck, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem.*, 69 (1997), 1518-1524.
 16. D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 5683-5690.
 17. Q. C. Wang, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 65 (1993), 2243-2248.
 18. S. Xie, R. W. Allington, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, 865 (1999), 169-74.
 19. I. Gusev, X. Huang, C. Horváth, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999), 273-290.
 20. Q. C. Wang, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, 669 (1994), 230-235.
 21. A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A.-M. Timperio, L. Zolla, J.-P. Chervet, N. Cavusoglu, A. Van Dorsselaer, C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 2390-2396.
 22. X. Huang, S. Zhang, G. A. Schultz, J. Henion, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 2336-44.
 23. A. R. Ivanov, L. Zang, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 75 (2003), 5306-16.
 24. A. Premstaller, H. Oberacher, C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 72 (2000), 4386-4393.
 25. H. Oberacher, C. G. Huber, *TRAC*, 21 (2002), 166-173.
 26. H. Kimura, T. Tanigawa, H. Morisaka, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, M. Ueda, K. Cabrera, N. Tanaka, *J. Sep. Sci.*, 27

- (2004), 897-904.
27. M. Vollmer, P. Hörth , E. Nägele, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 5180-5.
28. W. H. Jin, J. Dai, S. J. Li, Q. C. Xia, H. F. Zou, R. Zeng, *J. Proteome Res.*, 4 (2005), 613-619.
29. W. J. Qian, J. M. Jacobs, D. G. Camp 2nd, M. E. Monroe, R. J. Moore, M. A. Gritsenko, S. E. Calvano, S. F. Lowry, W. Xiao, L. L. Moldawer, R. W. Davis, R. G. Tompkins, R. D. Smith, *Proteomics*, 5 (2005), 572-84.
30. Y. Shen, J. M. Jacobs, D. G. Camp 2nd, R. Fang, R. J. Moore, R. D. Smith, W. Xiao, R. W. Davis, R. G. Tompkins, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 1134-44.
31. D. M. Maynard, J. Masuda, X. Yang, J. A. Kowalak, S. P. Markey, *J. Chromatogr. B*, 810 (2004), 69-76.

Kapitel II

Theoretischer Teil

II. Theoretischer Teil

1. Eigenschaften von Peptiden und Proteinen

Proteine spielen bei nahezu allen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Während die Desoxyribonukleinsäure (DNA) den biologischen Bauplan der Zelle enthält, sind die Proteine für dessen Realisierung und Regulierung verantwortlich. Sie fungieren in der Zelle unter anderem als Biokatalysatoren (Enzyme), Strukturelemente, Antikörper (Immunglobuline) zur Infektionsabwehr, Transportproteine und Informationsübermittler (Hormone). Als Beispiel für Biokatalysatoren kann die Carboanhydrase, welche die Hydratisierung von CO_2 katalysiert, aufgeführt werden. Auch die Proteasen (z.B. Pepsin, Trypsin) gehören zu dieser Gruppe, da sie die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Strukturproteine erhöhen die Festigkeit und Elastizität von Zellen und Geweben wie z.B. Keratin in Haaren und Nägeln. Des Weiteren können sie auch für die Muskelkontraktion verantwortlich sein (z.B. Myosin). Antikörper wie Immunglobulin G (IgG) im Blutserum binden an körperfremde Moleküle (Antigene), um sie so als Eindringlinge zu kennzeichnen und damit eine gezielte Abwehr zu ermöglichen. Beispiele für Transportproteine stellen das Hämoglobin und das Transferrin dar, welche im Blut für den Sauerstoff- bzw. Eisentransport zuständig sind. Die Aufgabe der biochemischen Botenstoffe übernehmen die Hormone innerhalb eines Organismus. Hier ist zum Beispiel das Peptid-Hormon Insulin und sein Gegenspieler Glucagon zu erwähnen, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutzuckers spielen. Das breite Aufgabenspektrum, das die Proteine abdecken, wird durch ihren variablen Aminosäureaufbau und ihre komplexe Struktur bewerkstelligt.

1.1 Aufbau der Peptide und Proteine

Im Gegensatz zur DNA besitzen die Proteine einen wesentlich komplexeren Aufbau, da sie nicht aus nur vier verschiedenen Bausteinen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) aufgebaut sind, sondern aus 20, den so genannten proteinogenen Aminosäuren. Die Basensequenz der DNA legt die genaue Abfolge der Aminosäuren im Protein fest (genetischer Code). Durch Transkription der DNA in Ribonukleinsäure (RNA) und anschließende Translation der RNA in eine Aminosäuresequenz werden

die entsprechenden Proteine erhalten. Hierbei legen genau drei Basen in der DNA-Kette eine Aminosäure im Protein fest. Jede Aminosäure besteht aus einem zentralen tetraedrischen Kohlenstoffatom (α C-Atom), an das eine Aminogruppe, eine Carboxylgruppe, ein Wasserstoffatom und eine jeweils charakteristische Seitenkette gebunden sind. Die Seitenketten der Aminosäuren unterscheiden sich in ihrer Größe, Gestalt und Art der vorhandenen funktionellen Gruppen und somit deutlich in ihren chemischen Eigenschaften. Man unterscheidet Aminosäuren mit aliphatischen, aromatischen und heterocyclischen Seitenketten sowie mit Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Carboxyl- und Aminocarbonyl-Gruppen. Für alle proteinogenen Aminosäuren sind neben ihrer herkömmlichen Bezeichnung noch deren Drei- und Ein-Buchstaben-Symbol gebräuchlich. Die Strukturen der Aminosäuren und ihre jeweiligen Kurzbezeichnungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Strukturen und Buchstabencodices der 20 proteinogenen Aminosäuren.

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

1.2 Struktur und Eigenschaften der Peptide und Proteine

Peptide und Proteine sind lineare Polymere, bei denen die α -Carboxylgruppen von Aminosäuren mit α -Aminogruppen der nächsten Aminosäuren über eine Amidbindung, auch Peptidbindung genannt, verknüpft sind. Hierbei werden definitionsgemäß Polypeptidketten mit bis zu 50 Aminosäuren als Peptide oder Oligopeptide bezeichnet. Polypeptide mit mehr als 50 Aminosäuren sind meist in der Lage stabile dreidimensionale Strukturen auszubilden und werden als Proteine bezeichnet. Die Peptidbindungen zeichnen sich durch eine hohe kinetische Stabilität (hydrolyseresistent) und durch ihren Doppelbindungscharakter aus. Der Doppelbindungscharakter bewirkt, dass die Peptidbindung planar ist und somit pro Peptidbindung sechs Atome auf einer Ebene liegen: das α -Kohlenstoffatom und die CO-Gruppe der ersten Aminosäure und die NH-Gruppe und das α -Kohlenstoffatom der zweiten Aminosäure. Die Bindungen zwischen den α -Kohlenstoffatomen und den Amino- bzw. Carbonylgruppen sind im Gegensatz zur Peptidbindung reine Einfachbindungen und somit zur Rotation befähigt. Diese Rotationsfreiheit erlaubt es Peptiden und Proteinen sich auf verschiedene Weise zu falten. Über Wechselwirkungen können das „Peptidrückgrat“, welches über ein hohes Potential zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken verfügt, und die funktionellen Gruppen der Seitenketten spezielle Strukturen stabilisieren. Allgemein unterscheidet man bei Proteinen vier verschiedene Strukturebenen: die Primärstruktur, die Sekundärstruktur, die Tertiärstruktur und die Quartärstruktur.

Die Primärstruktur ist gegeben durch die Abfolge der Aminosäuren in der Polypeptidkette (Aminosäuresequenz). Die Aminosäuresequenzen werden per Konvention vom Aminoende (N-Terminus) zum carboxyterminalen Ende (C-Terminus) hin aufgestellt. In Abbildung 1 ist als Beispiel die Aminosäuresequenz mit Strukturformel für das Pentapeptid *AGSFK* dargestellt. Die einzelnen Aminosäuren sind hierbei grau hinterlegt.

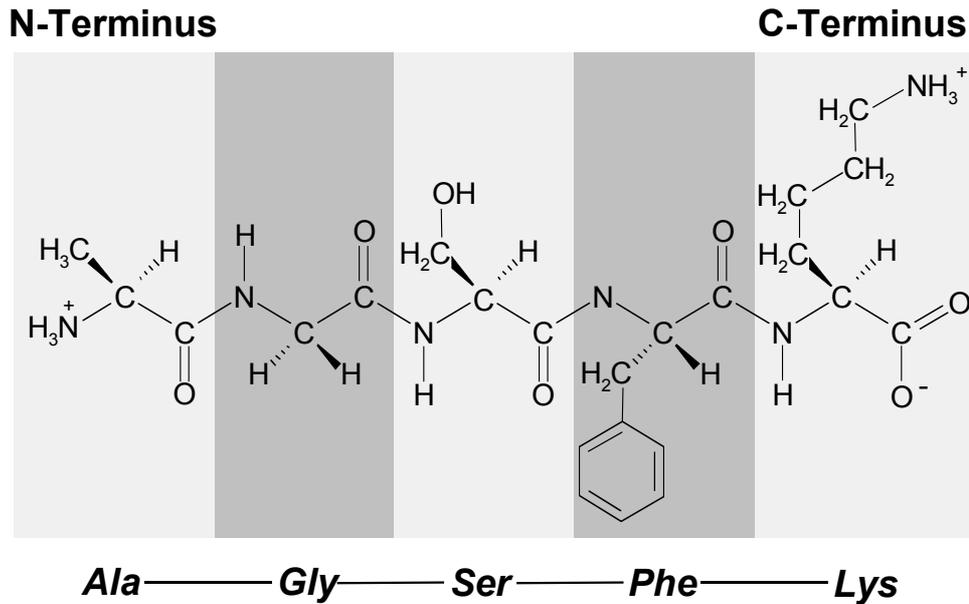


Abbildung 1. Aminosäuresequenz des Pentapeptids *AGSFK*.

Die räumliche Anordnung der Polypeptidkette wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Hier treten als Hauptelemente die periodischen Strukturen der α -Helix und des β -Faltblatts auf. Daneben sind häufig auch β -Haarnadelkehren und Ω -Schleifen in Proteinen anzutreffen. Die α -Helix stellt eine gewundene Stabstruktur dar, hervorgerufen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den NH- und CO-Gruppen des „Peptidrückgrats“. Im β -Faltblatt liegen zwei oder mehrere fast völlig ausgestreckte Polypeptidketten, so genannte β -Stränge, nebeneinander, wobei hier die Struktur durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den CO- und NH-Gruppen der einzelnen Stränge stabilisiert wird. In schematischen Darstellungen werden β -Stränge in der Regel als breite Pfeile, die in Richtung des carboxyterminalen Endes zeigen, dargestellt. Richtungsänderungen im Verlauf der Polypeptidkette können durch die so genannten β -Haarnadelkehren oder Ω -Schleifen hervorgerufen werden.

Die Tertiärstruktur eines Proteins ist durch die räumliche Anordnung der einzelnen Sekundärstrukturen gegeben. Sie beschreibt also die Gesamtanordnung der Polypeptidkette, die abhängig von der Art und Verteilung der Aminosäureseitenketten (z.B. Ausbildung von Disulfidbrücken) sowie von der Anwesenheit von prosthetischen Gruppen ist. Bei prosthetischen Gruppen handelt es sich um Moleküle, die an das Protein gebunden, jedoch nicht aus Aminosäuren

aufgebaut sind, wie z.B. die Hämgruppe in Hämoglobin. Weitere posttranslatorische Modifikationen, wie z.B. Acetylierungen, Phosphorylierungen und Glykosylierungen erhöhen die Komplexität von Proteinen und erschweren deren Analyse.

Bei Proteinen, die aus mehr als einer zusammenhängenden Peptidkette bestehen, beschreibt die Quartärstruktur die Anordnung dieser Ketten, die in diesem Fall als Untereinheiten bezeichnet werden. In den meisten Fällen sind nichtkovalente Bindungen für die Bildung solcher Multikomplexproteine verantwortlich.

Je nach Gestalt der Proteine unterscheidet man Strukturproteine (Skleroproteine), in denen die Peptidketten gefaltet oder spiralförmig vorliegen, und globuläre Proteine (Sphäroproteine), deren Peptidketten annähernd zur Kugel oder zum Ellipsoid geformt sind. Unter bestimmten Bedingungen, z.B. extremer pH-Wert, hoher Salzgehalt, hohe Temperatur oder organisches Solvens, kann die dreidimensionale Struktur der Proteine zerstört werden. Die Polypeptidketten nehmen, sofern sie nicht kovalent quervernetzt sind, eine zufällige Knäuelkonformation (random coil) ein. Diese so genannte Denaturierung der Proteine geht einher mit dem Verlust der biologischen Aktivität, der unter Umständen irreversibel sein kann. Unter geeigneten Bedingungen können jedoch viele Proteine wieder in den nativen Zustand überführt werden.

Die Ladung der Proteine hängt vom Anteil der sauren und basischen funktionellen Gruppen und vom pH-Wert der Lösung in der sie vorliegen ab. Der pH-Wert, bei dem sich die Ladungen gegenseitig aufheben und die Nettoladung des Proteins gleich null ist, bezeichnet man als isoelektrischen Punkt. Dieser Effekt kann z.B. für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen genutzt werden (isoelektrische Fokussierung).

1.3 Proteolytische Spaltung von Proteinen

Häufig ist es für die Analyse von Proteinen vorteilhaft, diese in kleinere Fragmente (Peptide) zu spalten. Die spezifische Spaltung kann hierbei mit chemischen oder enzymatischen Methoden erfolgen. Die anschließend erhaltenen Peptidmischungen zeichnen sich gegenüber Proteinmischungen durch eine höhere Homogenität in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften aus. Ein prominenter Vertreter bei den chemischen Spaltreagenzien ist das Bromcyan (CNBr). Dieses spaltet Polypeptide spezifisch auf den Carboxylseiten von Methioninresten. Ein häufig verwendetes biologisches Reagenz zur Spaltung von Proteinen stellt Trypsin, ein

proteolytisches Enzym aus dem Pankreassaft, dar. Diese Protease spaltet hochspezifisch an der Carboxylseite von Arginin- und Lysinresten.

Die durchschnittlichen Peptidlängen, die bei einem Proteinverdau erzeugt werden, hängen von der Reagenzspezifität und der Anzahl an spaltspezifischen Aminosäuren im Protein ab. Je nach Wahl der verwendeten Spaltreagenzien kann man somit die durchschnittliche Peptidlängenverteilung beeinflussen. In Tabelle 2 sind verschiedene chemische und enzymatische Reagenzien zusammen mit ihren spezifischen Spaltstellen aufgelistet^[1;2].

Tabelle 2. Chemische und enzymatische Reagenzien für die spezifische Proteinspaltung.

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

Damit die Spaltreagenzien ungehindert und optimal mit der Polypeptidkette wechselwirken können, muss das Protein vor dem Verdau denaturiert werden. Die nichtkovalenten Bindungen im Protein werden meistens mit einer Harnstoff- oder Guanidiniumchlorid-Lösung gelöst. Kovalente Disulfidbrücken (Cystine) in der Polypeptidkette können z.B. mit Dithiothreitol (DTT) zu Cysteinen reduziert werden. Damit die Sulfhydrylgruppen unter oxidierenden Bedingungen nicht wieder Sulfidbrücken ausbilden, können diese mit den entsprechenden Chemikalien (Iodessigsäure, Iodacetamid, 4-Vinylpyridin) alkyliert werden. Die Reduzierung einer

Disulfidbrücke mit DTT und anschließende Carboxymethylierung der Cysteine mit Iodessigsäure ist in Abbildung 2 illustriert. Mit Hilfe der Alkylierungsreagenzien hat man zusätzlich die Möglichkeit bestimmte funktionelle Gruppen ins Protein einzufügen, die bei der Trennung, Quantifizierung oder Identifizierung von Vorteil sein können. Benötigt man z.B. für die chromatographische Trennung oder massenspektrometrische Analyse eher positiv geladene Peptide/Proteine, alkyliert man die Cysteine mit der Base 4-Vinylpyridin, benötigt man eher negativ geladene Peptide/Proteine alkyliert man mit Iodessigsäure. Will man keine zusätzliche Ladung einfügen, so verwendet man Iodacetamid. Des Weiteren kann die Derivatisierung von Thiolgruppen zur Anreicherung mittels Affinitätschromatographie (z.B. Wechselwirkungen zwischen biotinylierten Peptiden/Proteinen mit Streptavidin-Affinitätssäulen)^[3;4] oder zur relativen Quantifizierung (z.B. isotopenmarkierte Affinitätsreagenzien, ICAT)^[5;6] genutzt werden.

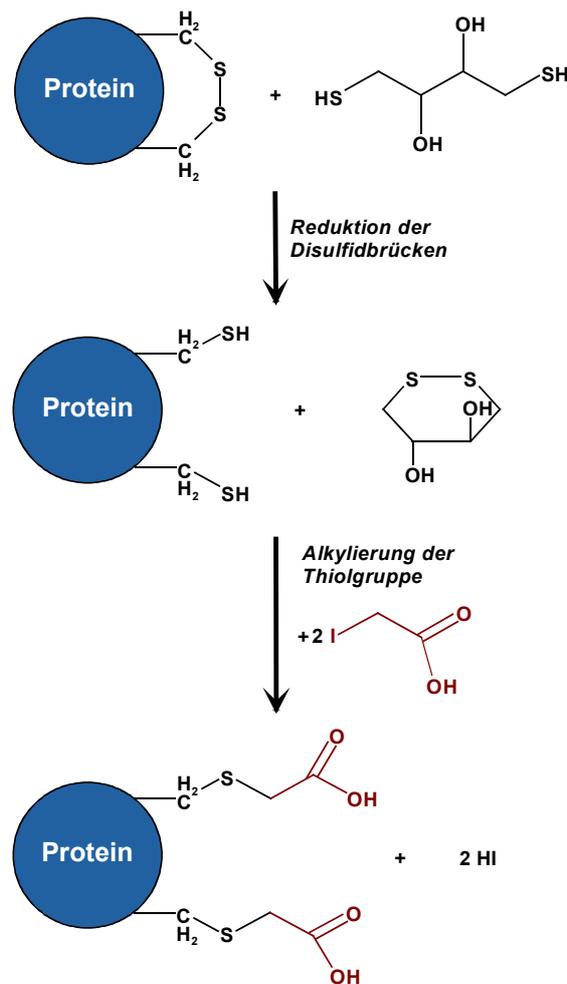


Abbildung 2. Reduktion und Carboxymethylierung von Disulfidbrücken (Cystine).

2. Kapillar-Hochleistungs-Flüssigchromatographie zur Analyse von Peptiden und Proteinen

Die Analyse von biologischen Makromolekülen wurde durch die Entwicklung von schonenden Ionisationsmöglichkeiten in der Massenspektrometrie, d.h. Elektrospray-Ionisation (ESI)^[7] und Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI)^[8], vollkommen revolutioniert. Es war nun möglich, biologische Makromoleküle wie Peptide und Proteine in Gasphase schonend zu ionisieren, um sie so der massenspektrometrischen Analyse, welche sich vor allem durch ihre hohe Empfindlichkeit auszeichnet, zugänglich zu machen. Die massenspektrometrische Analyse von Peptid- und Proteinmischungen kann jedoch nur bis zu einem bestimmtem Komplexitätsgrad der Probe zufriedenstellend durchgeführt werden. Oberhalb dieser Grenze gelangen mehr Probenmoleküle in die Gasphase als ionisiert werden können, was zu einer kompetitiven Ionensuppression führt. Diese Suppression ist schließlich dafür verantwortlich, dass nicht alle Analyten massenspektrometrisch erfasst werden können.

Proben biologischen Ursprungs sind jedoch von Natur aus meist sehr komplex, weshalb eine gewisse Auftrennung der Proben vor massenspektrometrischen Analysen unerlässlich ist. Gerade im Bereich der Proteomik und Peptidomik, welche die Analyse sämtlicher Proteine bzw. Peptide, die zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen in einer Zelle oder Gewebe exprimiert sind^[9], umfasst, wird das sehr deutlich. Die zu analysierenden Protein- bzw. Peptidmischungen können hier über tausend Komponenten in einem dynamischen Bereich von 1 bis 10^8 enthalten. Aus diesem Grund stellen Proteom- bzw. Peptidom-Analysen hohe Anforderungen an die verwendeten Trenntechniken bezüglich Trenneffizienz und Peakkapazität.

Aufgrund ihrer großen Trennstärken haben sich auf dem Gebiet der Peptid- und Proteinanalyse die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), die Kapillarelektrophorese (CE) und die Gelelektrophorese (GE) bewährt. Die Kapillarelektrophorese, die sich genau wie die Gelelektrophorese durch eine hohe Trenneffizienz auszeichnet, ist in der Variation der Selektivität gegenüber der HPLC stark eingeschränkt. Die Gelelektrophorese, insbesondere die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE), stellt zur Zeit die leistungsstärkste Trenntechnik für hochauflösende Trennungen von Proteinmischungen dar. Ihr Nachteil gegenüber der

HPLC liegt jedoch zum Beispiel darin, dass sie nicht direkt on-line mit der Massenspektrometrie gekoppelt werden kann, dass stark hydrophobe Proteine schwierig zu analysieren sind, da sie kaum ins Gel eindringen, dass der dynamische Bereich der zu untersuchenden Probe nicht zu groß sein darf und dass diese Trennmethode sehr arbeitsaufwendig sowie schwer zu automatisieren ist.

Aus diesen Gründen hat sich in den letzten Jahren die Hochleistungs-Flüssigchromatographie, insbesondere die multidimensionale-Hochleistungs-Flüssigchromatographie^[10], als leistungsstarke Alternative für die Hochdurchsatz-Proteinanalytik durchgesetzt. Die unterschiedlichen Peptid- und Proteineigenschaften, die ihre Trennung mittels verschiedenster Chromatographiearten erlauben, die breite Palette an effizienten stationären Phasen, die kommerziell erhältlich sind und die Entwicklung miniaturisierter HPLC-Anlagen, die eine problemlose Kopplung mit der Massenspektrometrie ermöglichen, stellen hierbei die Hauptkriterien für die HPLC dar.

Auf dem Sektor der Proteomanalyse werden allgemein zwei Strategien angewendet, die Top-Down Proteomik und die Bottom-Up Proteomik (Shotgun Methode). Diese unterscheiden sich untereinander dadurch wie die Proteinprobe bei der Trennung und Identifizierung vorliegt, als intakte Proteine oder als Proteinfragmente (Peptide). Bei der so genannten Top-Down Methode erfolgt die Auftrennung der Proben zuerst auf der Ebene der intakten Proteine^[11], wobei neben der HPLC^[12] auch häufig die 2D-GE^[13] aufgrund ihres großen Auflösungsvermögens angewendet wird. Nachfolgend werden die Proteinfractionen meistens verdaut (siehe Kapitel 1.3) und massenspektrometrisch über Peptid-Massen-Fingerprint (PMF)^[14;15] oder über Peptid-Fragment-Fingerprint (PFF)^[16] in Kombination mit Datenbankrecherche identifiziert^[17].

Da aufgrund der Fülle von physikalischen und chemischen Eigenschaften, die den Proteinen zugrunde liegen (Größe, isoelektrischer Punkt, Hydrophobie, Ladung und biologische Aktivität^[18]), die Fraktionierung mittels HPLC auf der intakten Proteinebene oft schwierig ist, werden die Proteine bei der Bottom-Up Methode vor der Fraktionierung in kleinere Fragmente (Peptide, siehe Kapitel 1.3) gespalten^[19]. Die chemisch oder enzymatisch verdauten Proteine liefern einen mehr oder weniger definierten Satz von Peptiden, die in ihren Eigenschaften homogener und somit einfacher zu handhaben sind. Auf der anderen Seite jedoch nimmt die Komplexität der Probe stark zu, da jedes einzelne Protein mehrere Peptide liefert. Aus diesem

Grund werden bei dem Bottom-Up Analyseverfahren häufig mehrdimensionale chromatographische Trennmethode, die sich durch hohe Peakkapazitäten auszeichnen, eingesetzt. Abschließend können die Fraktionen ebenfalls via Massenspektrometrie und computerunterstützter Datenbankrecherche identifiziert werden. In Abbildung 3 ist die allgemeine Vorgehensweise für beide Methoden skizziert und einander gegenübergestellt.

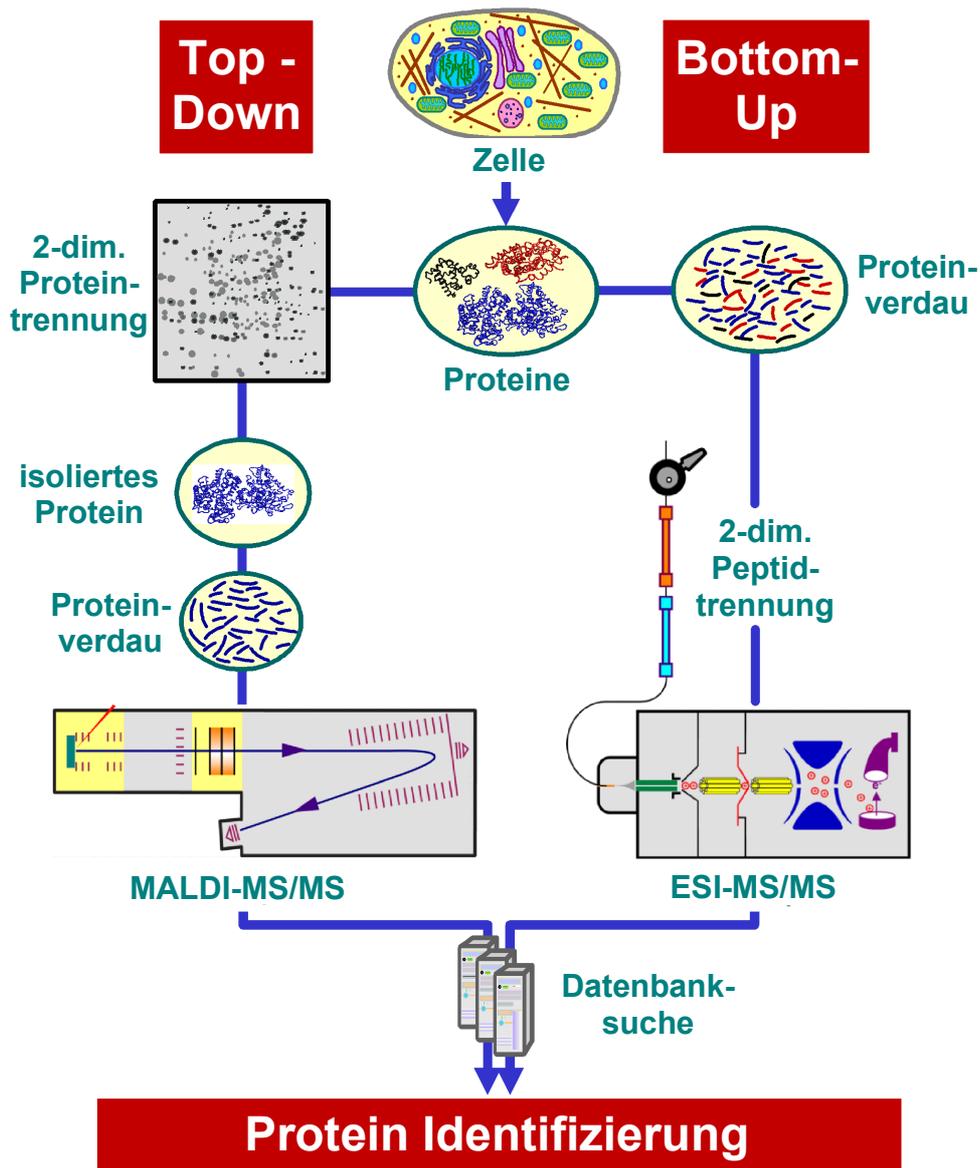


Abbildung 3. Strategien für die Proteomanalyse: Top-Down-Proteomik (links) und Bottom-Up Proteomik (rechts).

2.1 Chromatographische Trennmethode für die Peptid- und Proteinanalyse

Die vielfältige Anzahl an Eigenschaften der Proteine, wie ihre molekulare Größe, Ladung, Polarität, Metallaffinität und biologische Affinität^[18], macht diese zugänglich für flüssigchromatographische Trennungen. Hierbei können verschiedene komplementäre Trennmechanismen, welche diese Eigenschaften ausnutzen, eingesetzt werden^[20;21]. Die wichtigsten flüssigchromatographischen Methoden in der Peptid-/Proteinanalytik sind zusammen mit ihren Trennprinzipien in Tabelle 3 aufgelistet^[21-24]. Nachfolgend werden die chromatographischen Trennmethode, die für die vorliegende Arbeit eingesetzt wurden, kurz erklärt.

Tabelle 3. Chromatographische Trennmethode in der Peptid-/Proteinanalytik.

Trennmethode	Abkürzung	Trennprinzip
<i>nicht interaktive Methoden</i>		
Größenausschluss-Chromatographie	SEC	Unterschiede in der Molekülgröße
<i>interaktive Methoden</i>		
Ionenaustausch-Chromatographie	IEC	elektrostatische Wechselwirkungen
Normalphasen-Chromatographie	NPC	polare Wechselwirkungen
Umkehrphasen-Chromatographie	RPC	solvophobe Wechselwirkungen
Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie	IP-RPC	elektrostatische + solvophobe Wechselwirkungen
Affinitäts-Chromatographie	AC	Biospezifische Wechselwirkungen
Metallaffinitäts-Chromatographie	IMAC	Komplexbildung

Der größte Unterschied zwischen der „klassischen“ Analyse von organischen Molekülen und der Analyse von Peptiden und Proteinen besteht darin, dass die Biomoleküle aufgrund ihrer molekularen Größe an mehreren Stellen der stationären Phase gleichzeitig adsorbieren können (Mehrpunktsadsorption)^[25]. Die komplette Desorption der Bioanalyten setzt also erst ein, wenn die Elutionsstärke des Laufmittels groß genug ist um alle Adsorptionspunkte zwischen Analyt und

stationärer Phase zu lösen („On-Off“ Modell)^[26]. Aus diesem Grund erhält man für die Retention in Abhängigkeit zur Elutionsstärke der mobilen Phasen einen linearen Zusammenhang mit einer sehr großen negativen Steigung. Dies ist in Abbildung 4 anhand der Auftragung des Logarithmus des Retentionsfaktors k als Funktion des Anteils an Acetonitril (Umkehrphasenchromatographie) für die großen Lysozymmoleküle und die kleinen Nitrobenzolmoleküle verdeutlicht.

Bei allen interaktiven chromatographischen Modi wird aus dem oben genannten Grund ausschließlich die Gradientenelution für die Trennung von Peptiden und Proteinen eingesetzt.

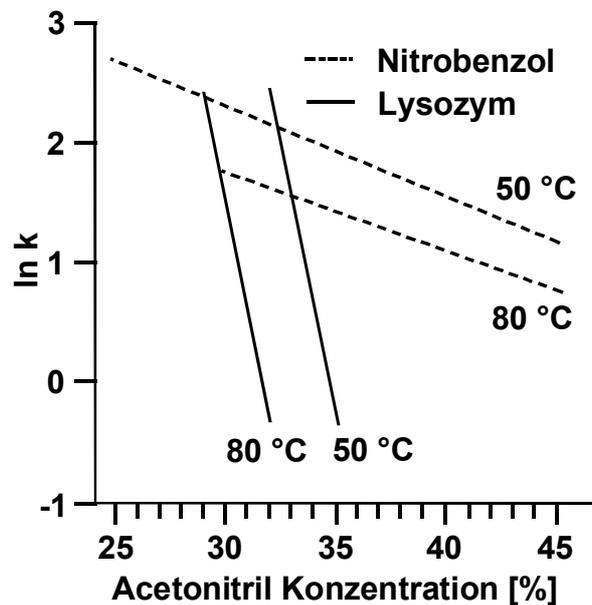


Abbildung 4. Auftragung des Logarithmus des Retentionsfaktors k gegen die Acetonitrilkonzentration für die RP-HPLC von Lysozym (durchgezogene Linie) und Nitrobenzol (gestrichelte Linie).

2.1.1 Umkehrphasen- und Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC

Bei der Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC) werden Analyten aufgrund von solvophoben Wechselwirkungen mit einer hydrophoben stationären Phase im polaren Medium getrennt. Die Phasenmaterialien bestehen meist aus alkyliertem Kieselgel oder aus hydrophoben organischen Polymeren. Die Elution der retardierten Moleküle erfolgt durch Zugabe eines polaren, organischen Lösungsmittels, welches die Desorption der Analyten von der stationären Phase thermodynamisch begünstigt. Polare Säuren, wie Phosphorsäure, Salzsäure oder

Ameisensäure, werden häufig zur mobilen Phase hinzugefügt, damit die Proteine denaturiert vorliegen und um sekundäre Wechselwirkungen der Biomoleküle mit den Restsilanolgruppen bei kieselgel-basierten stationären Phasen zu vermeiden^[27]. Unter diesen Bedingungen beruht die Retention der Analyten hauptsächlich auf solvophoben Wechselwirkungen^[28].

Gibt man andererseits relativ hydrophobe Säuren oder Basen zu den Eluenten, so erfolgt die Trennung der Analyten neben ihrer Hydrophobie auch aufgrund ihrer Ladung. In diesem als Ionenpaar-Umkehrphasen Chromatographie bezeichneten Modus (IP-RP-HPLC) adsorbieren die hydrophoben Gruppen der deprotonierten Säuren bzw. protonierten Basen (Amphiphile) an der unpolaren stationären Phase, wodurch ein elektrisches Oberflächenpotential erzeugt wird^[29]. Da die Konzentration der Ionenpaar-Reagenzien meistens nicht hoch genug ist um die stationäre Phase komplett zu belegen, werden die Peptide/Proteine sowohl aufgrund von elektrostatischen als auch von solvophoben Wechselwirkungen retardiert^[30-33]. Abbildung 5 zeigt diese Wechselwirkungen schematisch am Beispiel der Retention eines Peptids an einer hydrophoben stationären Oktylphase mit Trifluoressigsäure als Ionenpaar-Reagenz.

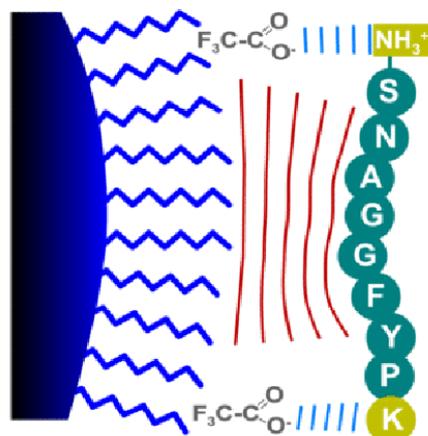


Abbildung 5. Schematische Darstellung der elektrostatischen und solvophoben Wechselwirkungen bei der IP-RP-HPLC.

Die RP- und IP-RP-HPLC stellen in der Peptid- und Proteinchromatographie die Methoden mit den höchsten Trenneffizienzen und Peakkapazitäten dar. Als Hauptgrund für die meist scharfen Peaks können die denaturierenden Bedingungen angeführt werden, unter denen die Biomoleküle entfaltet sind und keine Konformationsisomere mehr ausbilden. Die Effizienz der Methode kann je nach

Trennproblem durch die Wahl der stationären Phase sowie des Ionenpaar-Reagenzes und dessen Konzentration im Eluenten optimiert werden. Da die Proteine unter den verwendeten Bedingungen denaturiert vorliegen, eignet sich diese Chromatographiemethode jedoch nicht für die Fraktionierung von Proteinmischungen, wenn im Anschluss die biologische Aktivität der Proteine noch gefordert ist.

Ein weiterer Vorteil der RP-HPLC und IP-RP-HPLC ist, dass beide Methoden unter Verwendung von flüchtigen Komponenten in der mobilen Phase direkt mit der Massenspektrometrie (ESI-MS^[34;35], MALDI-MS^[36]) gekoppelt werden können. Diese ermöglicht gegenüber anderen Detektionsmethoden, wie z.B. UV-Detektion, eine sehr empfindliche Detektion im atto- bis zeptomol-Bereich^[37] und liefert zusätzlich noch Informationen über die molekulare Masse und Molekülstruktur. Eine IP-RP-HPLC Trennung einer Peptidmischung unter Verwendung einer hydrophoben monolithischen Poly(Styrol-Divinylbenzol) Phase mit anschließender massenspektrometrischer Detektion ist exemplarisch in Abbildung 6 gezeigt.

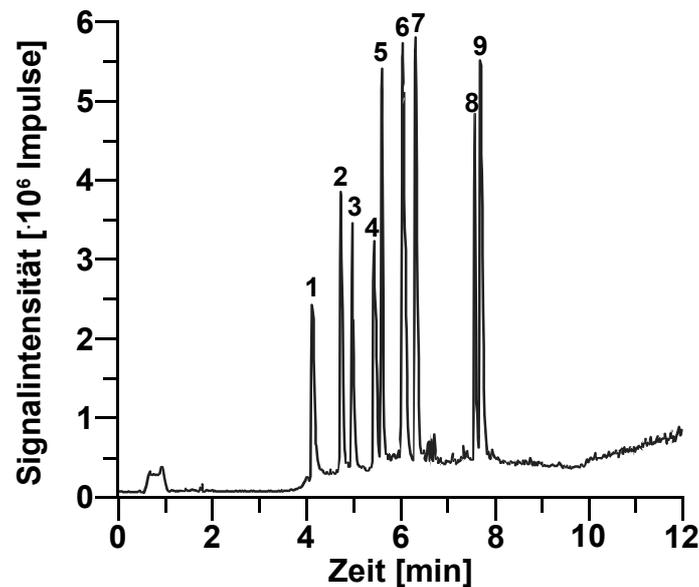


Abbildung 6. IP-RP-HPLC-MS Analyse einer 9er Peptidmischung.

Säule, PS/DVB, 60 x 0.20 mm I.D.; mobile Phase, A) H₂O + 0.05% TFA, B) ACN + 0.05% TFA; Gradient, 0-50% B in 15 min; Flussrate, 2.5 µl/min; Temperatur, 50°C; Detektion, ESI-MS; Probe, Peptidmischung bestehend aus 1=Bradykinin Fragment 1-5, 2=[Arg⁸]-Vasopressin, 3=Methionin Enkephalin, 4=Leucin Enkephalin, 5=Oxytocin, 6=Bradykinin, 7=LHRH, 8=Bombesin, 9=Substanz P, jeweils 1 ng injiziert.

2.1.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustausch-HPLC (IEX-HPLC) basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen der Analyten mit positiv bzw. negativ geladenen funktionellen Gruppen, welche auf der stationären Phase verankert sind. Dieser Sachverhalt ist schematisch in Abbildung 7 anhand der Retention eines Oktapeptids an einer Anionenaustauscherphase dargestellt. Die Wechselwirkungen der Peptide und Proteine mit der stationären Phase erfolgen über saure oder basische Aminosäurereste in der Polypeptidkette (saure AS: Glutaminsäure, Asparaginsäure; basische Aminosäuren: Arginin, Lysin, Histidin), über die Carbonsäure am C-Term und das Amin am N-Term, sowie über geladene posttranslatorische Modifikationen wie z.B. Phosphat- oder Sulfatgruppen.

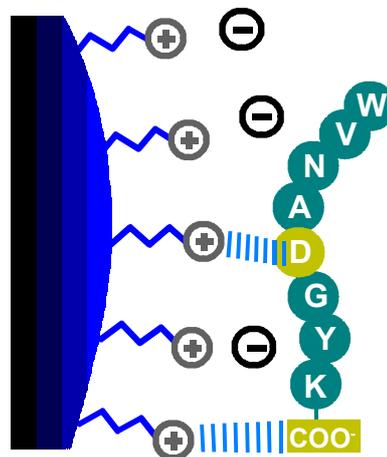


Abbildung 7. Schematische Darstellung der elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Anionenaustauschchromatographie.

Da es sich bei den Polypeptidketten um Amphotere handelt, d.h. dass sowohl positiv als auch negativ geladene Gruppen im Molekül vorliegen, können Peptide und Proteine mittels Kationenaustausch- sowie Anionenaustauschchromatographie getrennt werden (siehe Abbildung 8). Welche der beiden Methoden angewendet wird, ist abhängig vom pI-Wert des Peptids/Proteins und vom pH-Wert bei dem die Trennung durchgeführt werden soll^[38]. Der pI-Wert ist hierbei definiert als der pH-Wert, bei welchem das Peptid/Protein vom Gesamtladungszustand her ungeladen ist (isoelektrischer Punkt). Liegt der pH-Wert über diesem Wert, trägt das Peptid/Protein eine negative Überschussladung und kann mittels

Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Wenn der pH-Wert unter diesem Wert liegt, ist eine positive Überschussladung vorhanden und die Analyten können mittels Kationenaustauschchromatographie getrennt werden. Als Faustregel für die Ionenaustauschchromatographie gilt, dass sich der pH-Wert der Lösung um mindestens eine Einheit vom pI-Wert des Peptids/Proteins unterscheiden sollte, um eine reproduzierbare Retention aufgrund ionogener Wechselwirkungen zu erhalten.

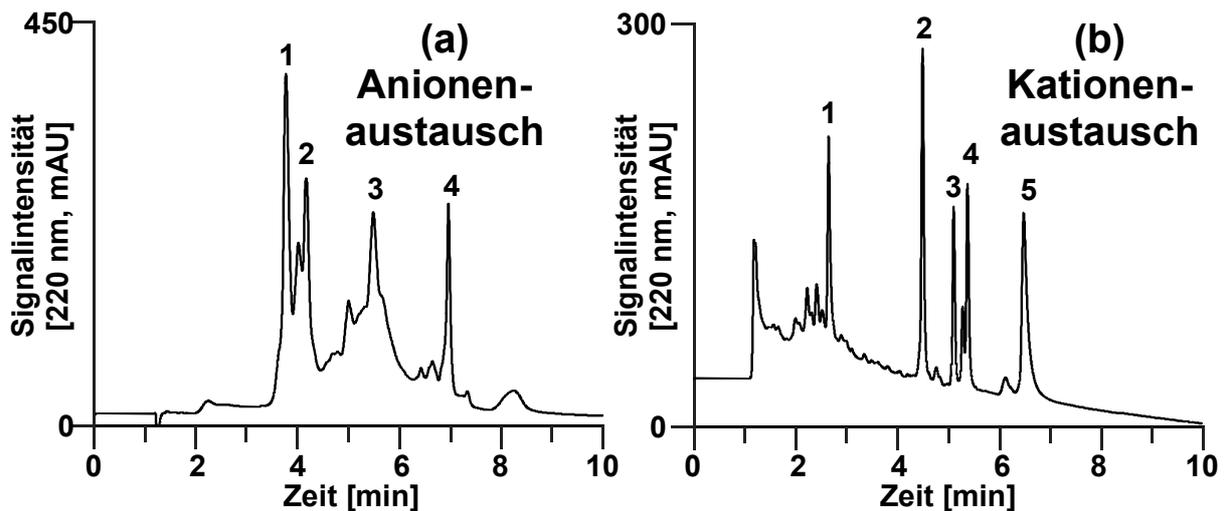


Abbildung 8. Proteintrennung mittels Kationen- und Anionenaustauschchromatographie.

(a): Säule, ProPac SAX-10, 250 x 4.0 mm I.D., Teilchendurchmesser, 10 μm ; Gradient, 0-0.50 mol/l NaCl in 20 mmol/l Tris-HCl in 10 min, pH 8.0; Flussrate, 1.0 ml/min; Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 220 nm; Probe, Proteinmischung bestehend aus 1=Conalbumin (130 $\mu\text{g/ml}$), 2=Transferrin (200 $\mu\text{g/ml}$), 3=Ovalbumin (500 $\mu\text{g/ml}$), 4=Trypsin Inhibitor (170 $\mu\text{g/ml}$); Injektionsvolumen, 10 μl .

(b): Säule, ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D., 10 μm ; Gradient, 0-0.50 mol/l NaCl in 50 mmol/l Na_2HPO_4 in 10 min, pH 6.0; Flussrate, 1.0 ml/min; Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 220 nm; Probe, Proteinmischung bestehend aus 1=Trypsinogen (400 $\mu\text{g/ml}$), 2= α -Chymotrypsinogen A (70 $\mu\text{g/ml}$), 3=Ribonuklease A (300 $\mu\text{g/ml}$), 4=Cytochrom C (70 $\mu\text{g/ml}$), 5=Lysozym (100 $\mu\text{g/ml}$); Injektionsvolumen, 10 μl .

Die Elution der Probenmoleküle von der stationären Phase erfolgt meist durch Erhöhung der Ionenstärke im Laufmittel (Salzgradient). Dieser Umstand erschwert häufig eine direkte Kopplung der IEX-HPLC mit der Massenspektrometrie. Im Gegensatz zur RP- bzw. IP-RP-HPLC behalten die Proteine bei der IEX-HPLC

jedoch ihre dreidimensionale Struktur, solange der für die Trennung gewählte pH-Bereich angemessen ist. Dies hat den Vorteil, dass die Proteine nach einer ionenaustauschchromatographischen Trennung weiterhin ihre biologische Aktivität besitzen. Auf der anderen Seite ist der Erhalt der dreidimensionalen Proteinstruktur häufig dafür verantwortlich, dass man bei der IEX-HPLC eher breitere Peaks für die Analyten erhält, was mit dem Vorliegen von unterschiedlichen Proteinkonformationen erklärt werden kann. Aus diesem Grund besitzt die IEX-HPLC im Vergleich zur RP- und IP-RP-HPLC eine wesentlich geringere Trennleistung und Peakkapazität. Jedoch aufgrund der Orthogonalität der den beiden Chromatographiemodi zugrunde liegenden Trennmechanismen, wird die Ionenaustauschchromatographie häufig mit der Umkehrphasenchromatographie für zweidimensionale Proteomanalysen gekoppelt (1. Dim. IEX-HPLC; 2. Dim. RP-HPLC). Hierbei werden IEX-Fractionen der Probenmischung aus der 1. Dimension on- oder off-line mittels RP-HPLC in der 2. Dimension weiter aufgetrennt und analysiert^[19].

2.2 Stationäre Phasen für die Bioanalytik

Die Analyten in der Bioanalytik erstrecken sich über einen weiten molekularen Massenbereich, der von einigen hundert bis hin zu einigen hunderttausend Dalton reichen kann. Gerade die großen Biomoleküle, wie Nukleinsäuren oder Proteine, besitzen im Vergleich zu niedermolekularen Substanzen, aufgrund ihrer hohen molekularen Massen, einen sehr viel niedrigeren Diffusionskoeffizienten. Aus diesem Grund diffundieren die hochmolekularen Substanzen bei einer chromatographischen Trennung an einer porösen stationären Phase wesentlich langsamer in die Poren hinein und wieder heraus, wodurch der Massentransfer insgesamt verzögert wird. Dieser Verzögerung kann man durch geeignete Modifikation der Morphologie der verwendeten stationären Phase entgegenwirken. Hierbei stehen mehrere Alternativen zur Verfügung (siehe Abbildung 9). Eine Möglichkeit zur Verbesserung des Massentransfers bei der Verwendung von porösen Partikeln besteht darin, dass man die Partikelgröße reduziert um somit die Diffusionswege innerhalb der Poren zu verkürzen. Dieser Ansatz hat jedoch den Nachteil, dass einhergehend mit der Verkleinerung der Partikelgröße auch gleichzeitig der Druckabfall über die Säule ansteigt. Eine andere Variante ergibt sich durch Verwendung von unporösen Partikeln, so genannte pelliculare stationäre Phasen^[39]. Hierbei wird der Massentransfer lediglich auf die äußere Oberfläche der stationären Phase

beschränkt. Der Nachteil solcher stationärer Phasen liegt häufig darin, dass sie nur eine sehr begrenzte Beladungskapazität aufweisen, was durch die drastisch reduzierte Gesamtoberfläche, die nur noch zur Retention verfügbar ist, erklärt werden kann.

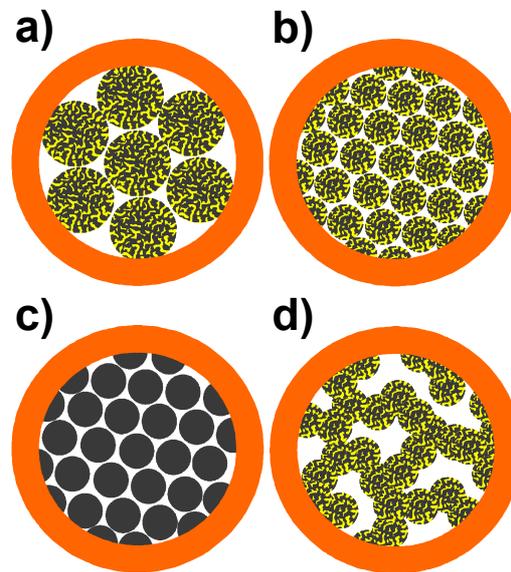


Abbildung 9. Gegenüberstellung von verschiedenen Säulenpackungen.

a) sphärische poröse Partikel mit großem Teilchendurchmesser (hohe Permeabilität, große Zwischenkornvolumina, geringe Trennleistung), b) sphärische poröse Partikel mit kleinem Teilchendurchmesser (geringe Permeabilität, kleine Zwischenkornvolumina, hohe Trennleistung), c) sphärische unporöse Partikel mit kleinem Teilchendurchmesser (geringe Permeabilität, kleine Zwischenkornvolumina, hohe Trennleistung, geringe Beladbarkeit), d) monolithische Phase (hohe Permeabilität, keine Zwischenkornvolumina, hohe Trennleistung).

Neben den Alternativen, die auf sphärischen Partikeln beruhen, gibt es jedoch auch monolithische Trennsäulen, deren stationären Phasen aus jeweils einem einzigen porösen Partikel bestehen^[40-43]. Diese Phasen, die entweder aus Kieselgel oder organischen Polymeren aufgebaut sind, bieten den Vorteil, dass sie keinerlei Zwischenkornvolumen aufweisen. Säulen, die mit sphärischen Partikeln gepackt sind, besitzen je nach Partikelgröße relativ große Zwischenräume zwischen den einzelnen Partikeln. Diese zusätzlichen Zwischenkornvolumina vermindern die Trennleistung einer Säule, aufgrund diffusionsabhängiger Bandenverbreiterung der Substanzzonen. Da monolithische Phasen keine solchen Zwischenkornvolumina besitzen, wird die gesamte mobile Phase durch die Porenkanäle des Trennmediums

gepumpt^[44]. Der Massentransfer der Analyten wird hierbei über den konvektiven Fluss durch die Makroporenkanäle unterstützt^[45]. Der diffusionsabhängige Massentransfer beschränkt sich auf die Mikro- und Mesoporen innerhalb des Monolithenskeletts, wobei es sich jedoch um sehr kurze Diffusionswege handelt. Ein weiterer Vorteil den monolithische Trennsäulen bieten, ist ihre hohe Permeabilität. Sie eignen sich daher optimal für schnelle Trennungen von Biomolekülen bei hohen Flussraten. Aufgrund der hohen Permeabilität der Trennsäulen und des sehr flachen Verlaufs der van-Deemter Kurven^[46] bei großer Lineargeschwindigkeit, liefern Monolithen bei schnellen Flussraten immer noch hohe Trennleistungen. Ein Vergleich zwischen monolithischen und teilchenförmigen Phasen hat gezeigt, dass ein Kieselgel-Monolith (Chromolith) mit bimodaler Porengrößenverteilung (Mesoporen: 12.5 nm, Makroporen: 1.9 µm) eine hydraulische Permeabilität aufweist, welche der einer Säulenpackung mit 11 µm Teilchendurchmesser entspricht, während die Dispersion der von vollkommen porösen 1.0 µm Teilchen gleichkommt^[47].

2.3 Mikro-Hochleistungs-Flüssigchromatographie

In der HPLC haben sich routinemäßig überwiegend Säulen mit Durchmessern von 2.0 – 4.6 mm I.D., welche bei Flussraten von 0.2 – 1.0 ml/min betrieben werden können, durchgesetzt. Die Gründe hierfür basieren auf der einfachen Handhabung und hohen Robustheit der benötigten HPLC-Module sowie auf der erschwerten Realisierung von miniaturisierten Säulen, Pumpen, Injektionseinheiten und Detektoren. Bei dem derzeitigen Stand der Entwicklung von miniaturisierten Trennmethode ist es jedoch ohne weiteres möglich robuste Mikro-HPLC-Anlagen, die verlässliche Flussraten im µl- bis nl-Bereich, präzise Gradientenformierung und reproduzierbare Injektionsvolumina im nl-Bereich liefern, zusammen mit den entsprechend empfindlichen Detektoren kommerziell zu erwerben. Diese miniaturisierten Systeme bieten mehrere Vorteile gegenüber den herkömmlichen analytischen Anlagen:

- geringer Verbrauch an mobiler und stationärer Phase
- erhöhte Massenempfindlichkeit
- erhöhte Trenneffizienz^[48]
- direkte Kopplung mit der Massenspektrometrie möglich
- nur geringe Probenmengen nötig

Die verbesserte Trennleistung von Mikrosäulen wird auf eine niedrigere radiale Flussdispersion innerhalb der Säule und auf eine homogenere Säulenpackung, welche die stabilisierende Wirkung der Säulenwand über nahezu das komplette Packungsbett erfährt, zurückgeführt^[49]. Als Gehäuse für die stationäre Phase bei miniaturisierten Säulen haben sich Quarzkapillaren, aufgrund ihrer Flexibilität, relativ inerten Oberfläche, Hochdruck-Stabilität, geringen Kosten und Verfügbarkeit in nahezu allen Durchmessern, durchgesetzt.

Die kontinuierliche Weiterentwicklung und die Ausbreitung der Einsatzgebiete der Mikro-HPLC gehen mehr oder weniger einher mit der rasanten Entwicklung der Biowissenschaften. Hier spielen besonders der geringe Verbrauch an Probenmaterial sowie die direkte Kopplung mit der Massenspektrometrie^[34] eine wichtige Rolle.

Prinzipiell können alle stationären Phasen, die in der herkömmlichen analytischen HPLC Anwendung finden, auch in Kapillarsäulen gepackt werden. Jedoch besitzen auch hier die bereits erwähnten monolithischen Phasen gewisse Vorteile gegenüber den gepackten Säulen. Eine Schwierigkeit die beim Packen von Kapillarsäulen überwunden werden muss, ist der Einsatz von kleinen Fritten am Säulenende, um das Packungsmaterial in der Säule zurückzuhalten. Die richtige Wahl bei dem verwendeten Material und den Dimensionen der Fritten sind später entscheidend für die Performance der Trennsäule. So tragen Adsorptionseffekte an der Fritte und zusätzliche Dispersion der Analyten in der Fritte zu einer Abnahme der Probenwiederfindung und Verschlechterung der Trenneffizienz bei^[50]. Bei der Herstellung von monolithischen Säulen kann auf die Verwendung von Fritten verzichtet werden, da die stationäre Phase kovalent an der Säulenwand immobilisiert werden kann. Aus diesem Grund zeigen die monolithischen Säulen auch eine hohe mechanische Stabilität.

2.3.1 Instrumentelle Miniaturisierung von HPLC-Komponenten

Die heutigen von vielen verschiedenen Anbietern kommerziell erhältlichen Kapillar- und Nano-HPLC Anlagen stellen ausgereifte Systeme dar, die ein hohes Maß an Zuverlässigkeit und Robustheit bieten. Sie erlauben in direkter Kombination mit der Massenspektrometrie umfassende Hochdurchsatzanalysen von kleinsten Mengen an biologischen Proben.

Ein typisches System für die Mikro-HPLC benötigt im wesentlichen die gleichen Komponenten wie eine konventionelle HPLC-Anlage: a) Gradientenpumpe, b) Injektionseinheit, c) Säulenofen, d) Detektor. Jedoch müssen die miniaturisierten Systeme so konzipiert sein, dass nahezu jegliche Extrasäulenvolumina, welche zu zusätzlichen Bandenverbreiterungen führen, vermieden werden^[51;52]. Aus diesem Grund müssen neben der Flussrate auch alle Volumina, wie z.B. Injektions- und Detektionsvolumen durch einen bestimmten Faktor f (Downscaling-Faktor) angepasst werden. Dieser Faktor f ist wie folgt definiert:

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

d_{micro} = Innendurchmesser der Mikrosäule

d_{conv} = Innendurchmesser der konventionellen Säule

Das genaue Anpassen der Parameter für die Mikro-HPLC ist unerlässlich, um eine optimale Performance zu gewährleisten^[51;53-59]. Ausgehend von den optimalen Einsatzbedingungen (Flussrate, Injektionsvolumen, Detektionsvolumen) einer analytischen Säule mit 4.6 mm I.D. sind in Tabelle 4 exemplarisch für eine Reihe von Kapillarsäulen die angepassten Parameter aufgelistet.

Tabelle 4. Angepasste Volumina und Flussraten für die Mikro- und Nano-HPLC.

Säulen I.D.	f	Flußrate	Injektionsvolumen	Detektionsvolumen
4.6 mm	1	1 ml/min	5 µl	10 µl
1.0 mm	1/ 21	47 µl/min	240 nl	75 nl
200 µm	1/ 529	1.8 µl/min	9.5 nl	19 nl
100 µm	1/ 2116	470 nl/min	2.4 nl	4.7 nl
50 µm	1/ 8464	120 nl/min	0.6 nl	1.2 nl

Die Anpassung der Parameter für die Mikro-HPLC gegenüber der konventionellen HPLC stellt auch gewisse technische Anforderungen an die verwendeten Geräte. Pumpenmodule für die Mikro-HPLC müssen zwei wichtige Kriterien erfüllen. Zum einen müssen sie einen konstanten Fluss im µl/min- und nl/min-Bereich fördern können und zum anderen müssen sie eine genaue Gradientenformierung zuzüglich eines geringen Dwell-Volumens gewährleisten.

Um diese Vorgaben zu realisieren wurden mehrere technische Ansätze entwickelt. Man unterscheidet im Allgemeinen zwei verschiedene Varianten. Die eine Möglichkeit um eine optimale Fluss- und Gradientenerzeugung in der Mikro-HPLC zu gewährleisten, besteht in der Verwendung von speziellen Mikro-Spritzenpumpen mit miniaturisierten Pumpenköpfen, Ventilen und Mischkammern. Der Vorteil bei dieser Methode liegt in dem geringen Verbrauch an Eluent, der Erzeugung einer konstanten Flussrate unabhängig vom Druckabfall und der direkten Einstellung der Flussrate über die Säule. Auf der anderen Seite sind jedoch die Konstanz des Flusses und die Effizienz der Gradientenmischung gerade bei sehr niedrigen Flussraten schwer zu gewährleisten. Die andere Variante basiert auf dem Einsatz von konventionellen Gradientenpumpen, wobei hier um den geeigneten Fluss über die Kapillarsäule einstellen zu können, der Primärfluss von der Pumpe einfach im richtigen Verhältnis in einen geringeren Sekundärfluss gesplittet wird^[60]. Im Prinzip kann so jede beliebige konventionelle Gradientenpumpe mit Hilfe eines T-Stücks und einer Restriktionskapillare in ein Mikro bzw. Nano-Gradientensystem umgewandelt werden (siehe Abbildung 10).

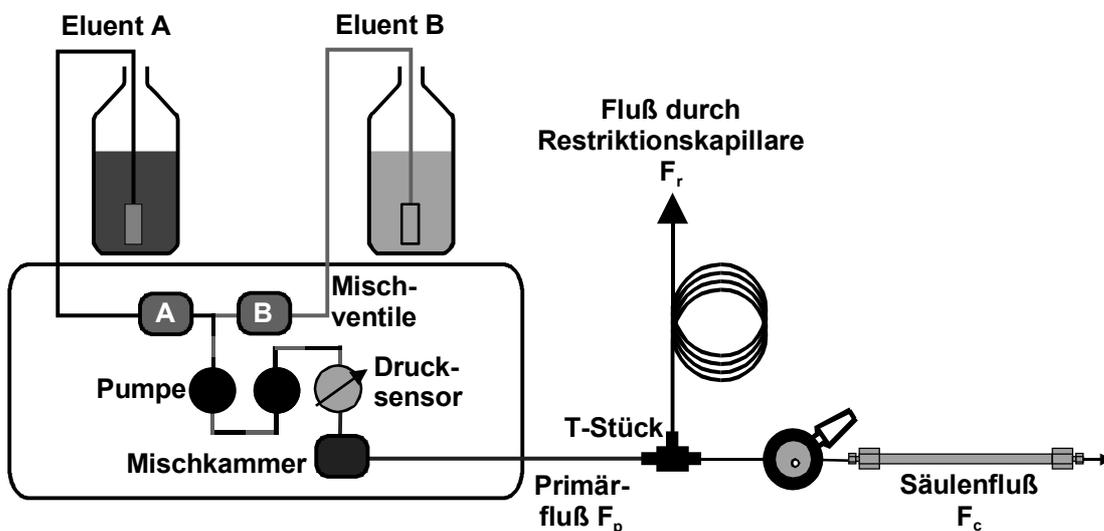


Abbildung 10. Schematischer Aufbau eines Splitsystems zur Erzeugung von Flussraten im $\mu\text{l}/\text{min}$ - und nl/min -Bereich.

Der Gegendruck, der von der Restriktionskapillare erzeugt wird, ist nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz abhängig von deren Länge und Radius. Somit kann der Fluss durch die Säule über die Länge und den Radius der Restriktionskapillare und den Primärfluss geregelt werden.

Der Vorteil der Splitsysteme liegt darin, dass robuste, konventionelle HPLC-Pumpen eingesetzt werden können, die eine konstante Flussrate und genaue Gradientenabmischung gewährleisten. Die Nachteile gegenüber den miniaturisierten Pumpenmodulen sind unter anderem der hohe Eluentenverbrauch sowie die Abhängigkeit des Splitverhältnisses von der Säulenpermeabilität. Um Fluktuationen der Flussrate über die Säule aufgrund von Änderungen der Säulenpermeabilität zu minimieren, gibt es verschiedene technische Möglichkeiten. Die prominentesten Technologien, die in kommerziellen Mikro-HPLC Anlagen zum Einsatz kommen, sind in Abbildung 11 angeführt.

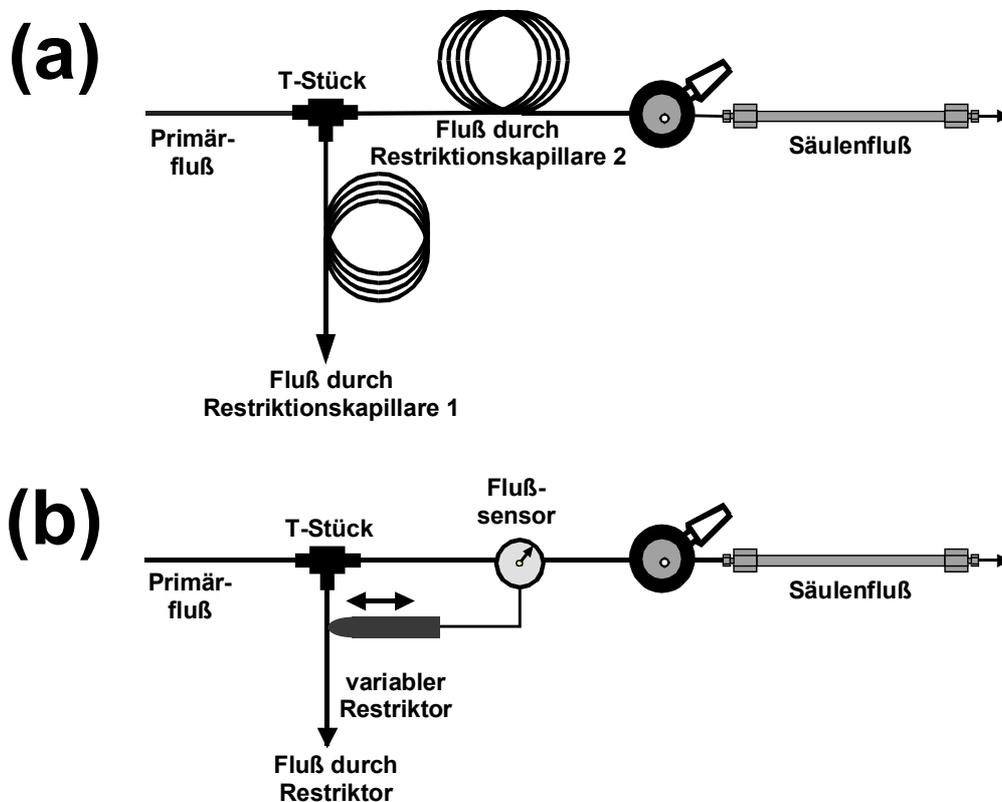


Abbildung 11. Passive und elektronisch regulierte Splitsysteme.

(a) Passives Splitsystem mit zwei Restriktionskapillaren, (b) elektronisch reguliertes Splitsystem mit Flussensor.

Das obere, passive Splitsystem findet in Mikro-HPLC Anlagen der Firma LCPackings – A Dionex Company Verwendung (UltiMate Serie). Bei diesem Splitaufbau ist neben der Restriktionskapillare, die für das entsprechende Splitverhältnis sorgt, noch zusätzlich eine Restriktionskapillare vor die Trennsäule geschaltet. Diese vorgeschaltete Restriktionskapillare ermöglicht die Kompensation von kleinen

Änderungen in der Säulenpermeabilität und gewährleistet somit, bis zu einem gewissen zusätzlichen Druckabfall an der Säule, ein konstantes Splitverhältnis.

Ein fortschrittlicheres Splitsystem, welches von der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) patentiert wurde, stellt das untere Splitsystem dar. Dieses elektronisch regulierte Splitsystem besitzt im Gegensatz zu dem passiven Splitsystem einen variablen Restriktor, der durch Erhöhung oder Erniedrigung des Druckabfalls das Splitverhältnis auch bei großen Änderungen in der Säulenpermeabilität konstant halten kann. Änderungen in der Säulenpermeabilität werden mit Hilfe eines Flusssensors, der vor der Säule positioniert ist, registriert und an den variablen Restriktor zur Kompensation weitergeleitet.

Aufgrund des Patentschutzes des Splitsystems von Agilent sind andere Hersteller von Mikro-HPLC Anlagen gezwungen neuartige Konzepte zur elektronischen Splitregulierung zu entwickeln. Ein solch neuer Ansatz zur elektronischen Splitregulation verwendet das neue Mikro-HPLC Modell (UltiMate 3000) der Firma LCPackings. Dieses System wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für den Einsatz in der Mikro-HPLC ausführlich getestet. Die Funktionsweise des hier verwendeten Splitsystems sowie die durchgeführten Experimente und die erhaltenen Ergebnisse werden in Kapitel III (3.1.3) besprochen.

2.3.2 Detektionsmethoden in der Kapillar-HPLC

Die am häufigsten verwendeten Detektionsmethoden in der Kapillar-HPLC sind neben der Massenspektrometrie die UV/Vis Absorptions- und Fluoreszenz-Detektion. Voraussetzung für den Einsatz der beiden letztgenannten Methoden in der Kapillar-HPLC ist die Anpassung der Detektorzellvolumina nach dem Downscaling-Faktor. Nur durch Verringerung des Detektionsvolumens ist es möglich, die auf einer Kapillarsäule physikalisch getrennten Analyten auch bei niedrigen Flussraten mit entsprechender Effizienz als schmale, getrennte Peaks zu detektieren. Als Faustregel gilt, dass das Detektionsvolumen ein Zehntel des kleinsten Peakvolumens im Chromatogramm nicht überschreiten sollte.

Die in der UV/Vis-Detektion eingesetzten Flusszellen bestanden früher zumeist aus Quarzkapillaren in die einfach ein UV/Vis-transparentes Fenster durch Entfernen der äußeren Polyimidschicht mittels Säure bzw. Hitze eingefügt wurde. Anschließend konnte senkrecht zur Flussrichtung mit Hilfe eines konventionellen Spektrometers die

Absorption gemessen werden (Abbildung 12 a). Diese Anordnung ist zwar sehr einfach zu realisieren, hat jedoch den Nachteil, dass die Weglänge, die das Licht zurücklegen muss, nur sehr kurz ist, was nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit einer geringen Detektionsempfindlichkeit einhergeht. Aus diesem Grund wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um den Lichtweg in der Kapillare und somit die Empfindlichkeit der Detektion zu erhöhen. Eine Möglichkeit stellt die so genannte Blasen-Zelle (Bubble cell) dar, die in der Kapillare durch konzentrierte Flussssäure erzeugt werden kann^[50] (Abbildung 12 b). Die Vergrößerung des Lichtweges ist bei dieser Variante jedoch durch die Wandstärke der Kapillare auf einen Faktor von 2-5 limitiert. Eine wesentlich effizientere Anordnung zur Steigerung der Empfindlichkeit kann erhalten werden, wenn man einen größeren Teil der Polyimidschicht entfernt und anschließend die Kapillare in eine Art Z-Form biegt (Abbildung 12 c)^[61]. Dieses Zellendesign liefert einen noch längeren Lichtweg von 3-10 mm und zeichnet sich durch eine hohe Detektionsempfindlichkeit aus. Aus diesem Grund wurden für alle Mikro-HPLC Analysen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden und UV-Detektion beinhalteten, diese Art von Zellen eingesetzt.

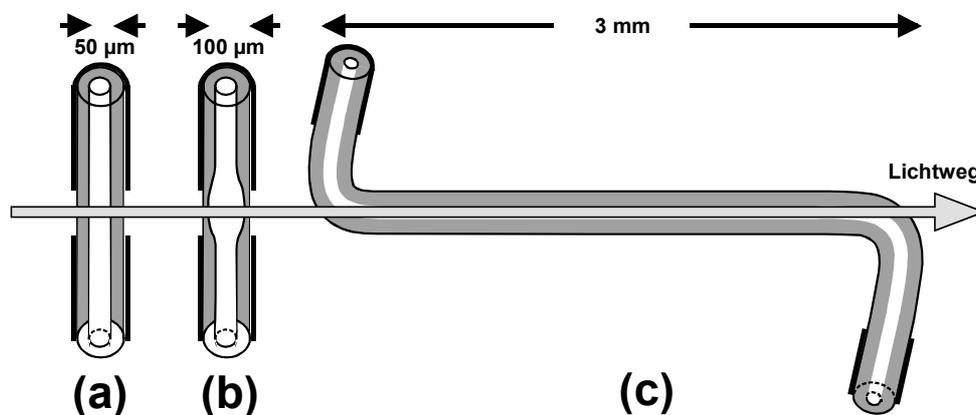


Abbildung 12. Verschiedene UV/Vis-Detektorzellvarianten für die Kapillar-HPLC.

(a) Einfache Kapillare mit UV/Vis-Fenster; (b) Kapillare mit Blasen-Zelle; (c) Z-förmige Kapillare.

Aufgrund seiner sehr hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit kleinste Volumina mittels fokussiertem Laserlicht zu bestrahlen, ist auch die Fluoreszenz-Detektion besonders gut für den Einsatz in der Mikro-HPLC geeignet^[62]. Von Nachteil ist jedoch, dass nur wenige Peptide und Proteine von Natur aus fluoreszieren und deshalb häufig eine Derivatisierung der Biomoleküle vonnöten ist, um diese Detektionsmethode überhaupt anwenden zu können.

Eine der wichtigsten Detektionsmethoden in der konventionellen als auch der Mikro-HPLC stellt die Massenspektrometrie dar^[63]. Da diese sehr komplex im apparativen Aufbau sowie in ihrer Anwendung ist, wird speziell in einem eigenen Kapitel (Kapitel 3) darauf eingegangen.

2.4 Multidimensionale Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, sind die Selektivität und Trennleistung einer chromatographischen Trennmethode gerade bei komplexen Proben, wie sie in der Peptid-/Proteinanalytik häufig vorkommen, nicht mehr ausreichend um eine umfassende Trennung und Identifizierung aller Analyten zu gewährleisten. Um dies zumindest annähernd zu erreichen, werden häufig zwei oder sogar mehr chromatographische Trennmethode miteinander kombiniert^[64]. Damit es sich um eine „wahre“ multidimensionale chromatographische Trenntechnik handelt, müssen zwei Kriterien erfüllt sein. Zum einen müssen die gekoppelten Chromatographiemodi auf unterschiedlichen bzw. orthogonalen Trennmechanismen beruhen und zum anderen darf die erreichte Auflösung in der ersten Dimension nicht durch die nachfolgenden Dimensionen verloren gehen. In diesem Idealfall entspricht die maximale Peakkapazität des multidimensionalen Systems dem Produkt der Peakkapazitäten der individuellen Dimensionen^[65]. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die in der multidimensionalen Peptidomik/Proteomik am häufigsten kombinierten Chromatographiemodi. Die vergrößerte Peakkapazität führt neben einer signifikanten Erhöhung der Peptid- und Proteinidentifizierung in komplexen biologischen Proben^[5] auch zu einer breiteren Abdeckung des dynamischen Konzentrationsbereiches^[66].

Tabelle 5. Chromatographische Trennmechanismen für die multidimensionale Analyse.

1. Dimension	Einsatzgebiet	2. Dimension	Einsatzgebiet
IEX-HPLC	Proteine, Peptide	(IP)-RP-HPLC	Proteine, Peptide
AC, IMAC	Proteine, Peptide	(IP)-RP-HPLC	Proteine, Peptide
SEC	Proteine	(IP)-RP-HPLC	Proteine, Peptide
SEC	Proteine	IEX-HPLC	Proteine, Peptide

Prinzipiell unterscheidet man bei multidimensionalen Trennmethoden, je nachdem ob die einzelnen Dimensionen direkt miteinander gekoppelt sind oder nicht, zwischen on-line und off-line Systemen. Bei on-line Systemen werden die einzelnen Säulen so miteinander verbunden, dass die Fraktionen aus der ersten Dimension automatisch in die nächste Dimension zur weiteren Auftrennung transferiert werden können. Bei den off-line Methoden liegen die einzelnen Trenndimensionen als komplett voneinander unabhängige Systeme vor. Die Fraktionen der 1. Dimension werden in beliebigen Zeitabständen gesammelt und anschließend in die nächste Dimension zur weiteren Auftrennung injiziert.

Ein spezielles on-line System, welches sich bereits in der Hochdurchsatz-Proteomanalyse ausgezeichnet hat, repräsentiert die von Yates et al. 2001 entwickelte multidimensionale Proteinidentifikationstechnologie (MudPIT)^[19]. Das Herzstück dieses Systems ist eine Kapillar-Elektrospraynadel, welche mit zwei unterschiedlichen stationären Phasen gefüllt ist (Abbildung 13). Die erste Phase besteht aus Kationenaustausch-Partikeln und die zweite Phase aus Umkehrphasen-Partikeln. Bei den Messungen werden die Probenmoleküle „paketweise“ von dem Ionenaustauscher auf die Umkehrphase überführt, wo sie im Anschluss mit einem Acetonitrilgradienten direkt in ein Massenspektrometer eluiert werden. Der leistungsstarke Einsatz dieser Technologie in der Proteomanalyse konnte anhand eines verdauten Hefeextrakts demonstriert werden. Hier wurden mit Peptid-Fragment-Fingerprinting und Datenbanksuche 2114 unterschiedliche Peptide identifiziert und die zugeordneten Proteine deckten einen dynamischen Bereich von 10000:1 ab.

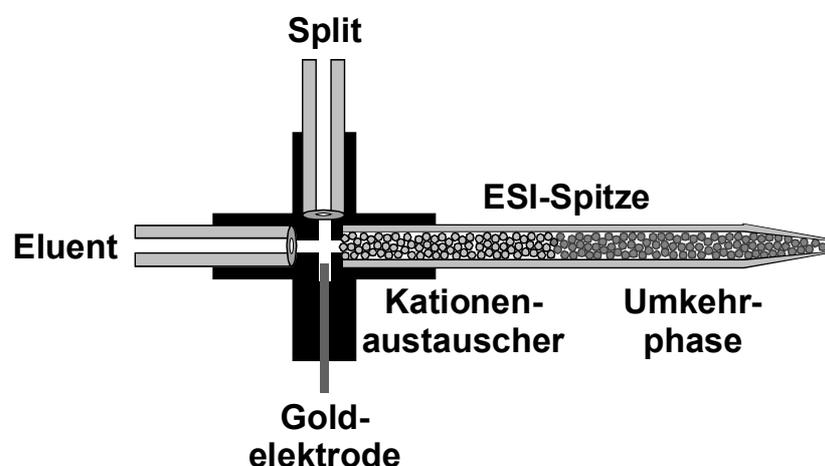


Abbildung 13. Prinzip der multidimensionalen Proteinidentifikationstechnologie (MudPIT).

3. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie stellt aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit (bis zeptomol-Bereich^[37]) und schnellen Messgeschwindigkeit, eine der wichtigsten physikalischen Detektionsmethoden in der analytischen Chemie dar. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Detektionsmethoden ergibt sich aus dem hohen Informationsgehalt, der aus den massenspektrometrischen Messungen gewonnen werden kann. Hier können neben der molekularen Masse auch zusätzlich noch Informationen über die Struktur der analysierten Substanz erhalten werden. Der Einsatz der Massenspektrometrie in der Peptid- und Proteinanalytik war jedoch lange Zeit nicht oder nur schlecht realisierbar, da keine geeigneten Ionisierungsquellen für Analyten mit großer Molekularmasse und hoher Polarität zur Verfügung standen. Erst die Einführung zweier neuartiger Ionisationstechniken, der Matrix-unterstützten-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) von der Arbeitsgruppe um Hillenkamp^[8] und der Elektrospray-Ionisation (ESI) von der Arbeitsgruppe um Dole^[67], ermöglichten die Ionisierung von großen und polaren Biomolekülen in der Gasphase. Gegenüber anderen Ionisationstechniken, wie z.B. der Elektronenstoß-Ionisation (EI), zeichnen sich diese beiden Techniken zusätzlich noch durch eine schonende Ionisierung der Probenmoleküle aus. Dies gewährleistet, dass die Analyten nach der Ionisierung in den meisten Fällen als intakte, unfragmentierte Moleküle vorliegen und analysiert werden können. Eine zu starke Fragmentierung der Probenmoleküle hat den Nachteil, dass die Signale der unfragmentierten Ionen im Massenspektrum nur noch sehr gering oder sogar überhaupt nicht mehr vorhanden sind, wodurch eine direkte Identifizierung oft erschwert wird. Sind bei der Verwendung von ESI- und MALDI-Massenspektrometern jedoch neben der molekularen Masse auch zusätzlich Strukturinformationen über das analysierte Molekül gewünscht, so können diese über kollisionsinduzierte Fragmentierung erhalten werden.

Da die für diese Arbeit relevanten massenspektrometrischen Messungen ausschließlich an Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometern durchgeführt wurden, wird in den folgenden Kapiteln auch speziell nur auf das Prinzip dieser Ionisationsmethode und Massenanalyse näher eingegangen.

3.1 Prinzip der Elektrospray-Ionisation

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation beruht auf den Arbeiten von Dole et al. in den 70er Jahren^[67]. Mittels Elektrospray-Verfahren gelang es ihm, freie gasförmige Ionen von Molekülen mit hohem Molekulargewicht zu erzeugen. Die generierten Ionen konnten allerdings nur indirekt nachgewiesen werden. Der Arbeitsgruppe von Fenn gelang es etwas später das Elektrospray-Verfahren mit einem konventionellen Quadrupol-Massenanalysator zu koppeln^[68]. Somit wurden die mittels ESI erzeugten gasförmigen Ionen für die Massenspektrometrie zugänglich gemacht. Von diesem Zeitpunkt an hat sich die Elektrospray-Ionisation in der Massenspektrometrie immer mehr etabliert und stellt heute eine der meist verwendeten Ionisationstechniken für massenspektrometrische Analysen dar. Aufgrund ihrer Eigenschaften hat sie auch insbesondere in der Bioanalytik einen hohen Stellenwert.

Bei der praktischen Durchführung der Elektrospray-Ionisation wird die in Lösung vorliegende Probe in einem starken elektrostatischen Feld versprüht. Dieses Feld wird durch eine Potentialdifferenz (meist 1-5 kV) zwischen der Kapillarspitze, aus der die Lösung austritt, und einer in unmittelbarer Nähe befindlichen Gegenelektrode hervorgerufen. Die aus der Kapillare fließende Flüssigkeit wird aufgrund des angelegten Feldes vernebelt und die in der Flüssigkeit enthaltenen Analytmoleküle werden entsprechend der Polarität der Kapillarspitze mittels negativer oder positiver Überschussladung ionisiert. Durch eine Öffnung in der Gegenelektrode gelangen die erzeugten Analytionen anschließend zum Massenanalysator, wo sie aufgrund ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt werden.

Die Verneblung des Flüssigkeitsstroms wird meist noch zusätzlich durch einen Gasstrom (z.B. N_2), der konzentrisch-gleichgerichtet oder/und in entgegengesetzter Richtung zum Spray fließt, pneumatisch unterstützt. Sobald die gegenseitige Abstoßung der gleichgeladenen Ionen und die elektrostatische Anziehung der Gegenelektrode die Oberflächenspannung der Probenlösung übertreffen, kommt es zur Ausbildung eines so genannten Taylor-Kegels^[69]. Aus diesem Kegel tritt ein dünnes Flüssigkeitsfilament aus, das anschließend in geladene Tröpfchen zerfällt. Das Lösungsmittel der geladenen Tröpfchen verdampft sukzessive bei der Wanderung zur Gegenelektrode, wodurch eine Erhöhung der Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche hervorgerufen wird. Ab einer gewissen Grenze, der so genannten Rayleigh-Grenze, überwiegt schließlich die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung, welche den Tropfen zusammenhält, und die Tropfen zerfallen

in noch kleinere Tropfen (Coulomb-Explosion)^[70;71]. Dieser Vorgang wiederholt sich mehrere Male bis nur noch sehr kleine Tröpfchen vorliegen. Der beschriebene ESI-Prozeß ist in Abbildung 14 nochmals schematisch illustriert.

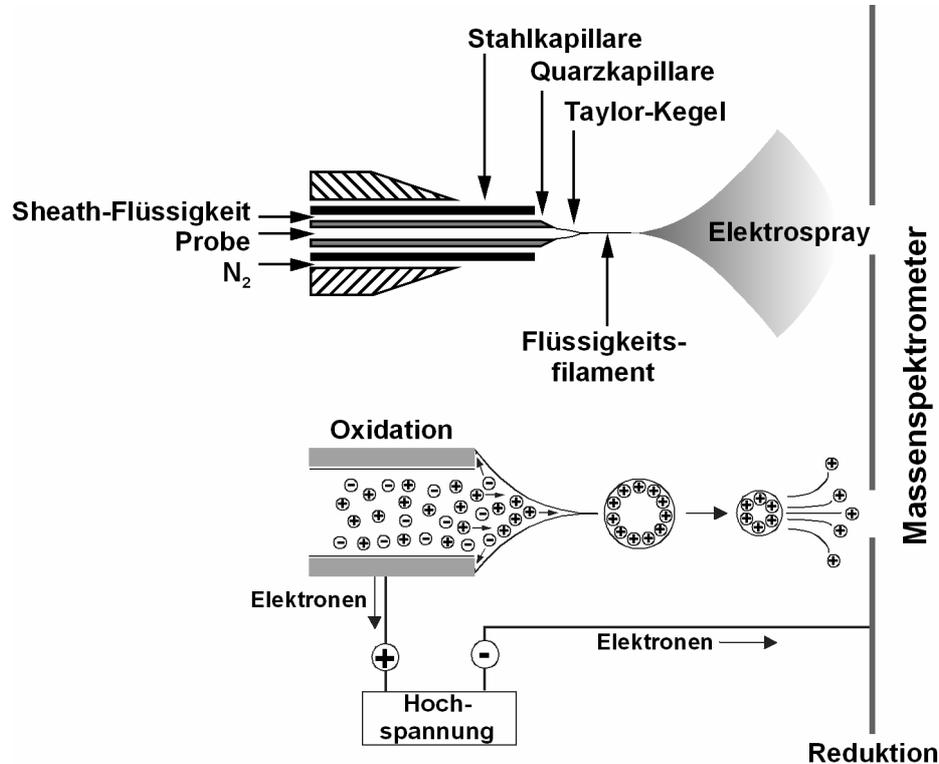


Abbildung 14. Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisationstechnik im positiven Modus.

Der hohe Stellenwert der Elektrospray-Ionisationstechnik für die Bioanalytik beruht auf dem großen zugänglichen Massenbereich. Der Scanbereich der Massenanalytoren ist meist auf einige 1000 Da begrenzt. Da die Massenspektrometer jedoch nicht nach der Masse sondern nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung trennen (Bsp. $M = 10000 \text{ Da}$, $z = 10 \Rightarrow m/z = 1000$), vergrößerte die Elektrospray-Ionisation, über ihre typische Mehrfachionisierung von großen Molekülen, den untersuchbaren Massenbereich auf einige 100000 Da

Die m/z -Signale der mehrfach geladenen Analyten können über einen einfachen Algorithmus in das einfach geladene m/z -Verhältnis bzw. in das ungeladene Molekulargewicht umgerechnet werden (Dekonvolution). Je nach Höhe des Ladungsgrades und Auflösung des verwendeten Massenspektrometers kann das Molekulargewicht der untersuchten Substanz direkt aus dem erhaltenen m/z -Signal

und dem dazugehörigen ^{13}C -Isotopenmuster ermittelt werden. Die Auflösung von herkömmlichen Ionenfallen- und Quadrupol-Analysatoren (Auflösung: 2000-4000) erlaubt eine eindeutige Bestimmung des Molekulargewichtes über das ^{13}C -Isotopenmuster nur bis zu einer maximalen Ladung von 3+. Anhand des m/z -Abstands der aufeinander folgenden Isotopensignale kann auf die vorliegende Ladung des Analytmoleküls geschlossen werden. Bei einer 1-fachen Ladung beträgt der Abstand der Isotopenpeaks 1.0 m/z , bei einer 2-fachen Ladung beträgt der Abstand der Isotopenpeaks 0.5 m/z und bei einer 3-fachen Ladung nur noch 0.3 m/z . Nach Ermittlung der vorliegenden Ladung kann aus dem m/z -Verhältnis anschließend die molekulare Masse bestimmt werden.

Ist das Analytmolekül jedoch mehr als 3-fach geladen, kann in den meisten Fällen das ^{13}C -Isotopenmuster nicht mehr ausreichend aufgelöst werden (Ausnahme: Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS), Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS)). In diesem Fall kann die vorliegende Ladung bzw. das Molekulargewicht eines mehrfach geladenen Molekülions aus aufeinander folgenden m/z -Signalen einer Ladungsverteilung berechnet werden. Es gilt für zwei aufeinander folgende m/z -Verhältnisse, wobei $(m/z)_2 > (m/z)_1$ ist:

$$\text{Gl. (1)} \quad n_2 = n_1 - 1$$

$$\text{Gl. (2)} \quad (m/z)_1 = \frac{M + n_1}{n_1}$$

$$\text{Gl. (3)} \quad (m/z)_2 = \frac{M + n_2}{n_2} = \frac{M + (n_1 - 1)}{n_1 - 1}$$

n = Anzahl der Ladungen

M = Molekulargewicht

Durch Einsetzen von $n_1 - 1$ für n_2 (Gl. 1) und $((m/z)_1 - 1) \cdot n_1$ für M (Gl. 2 aufgelöst nach M) in Gleichung 3 erhält man schließlich Gleichung (4), welche die Berechnung des Ladungszustands n_1 anhand der benachbarten m/z -Verhältnisse erlaubt.

$$\text{Gl. (4)} \quad n_1 = \frac{(m/z)_2 - 1}{(m/z)_2 - (m/z)_1}$$

Mit dem Wert für den Ladungszustand n_1 lässt sich letztendlich das Molekulargewicht nach Gleichung (5) berechnen:

$$\text{Gl. (5)} \quad M = n_1 \cdot ((m/z)_1 - 1)$$

Für die Dekonvolution und Auswertung von mehrfach geladenen Analytsignalen stehen heute eine Vielzahl von Algorithmen zur Verfügung, welche in verschiedenen Datenverarbeitungsprogrammen integriert, die Berechnung der Molekulargewichte automatisch übernehmen. Abbildung 15 zeigt ein typisches ESI-Massenspektrum eines mehrfach geladenen Proteins (Ribonuklease A) mit dem dazugehörigen dekonvolvierten Spektrum, welches letztlich das Molekulargewicht des untersuchten Proteins liefert.

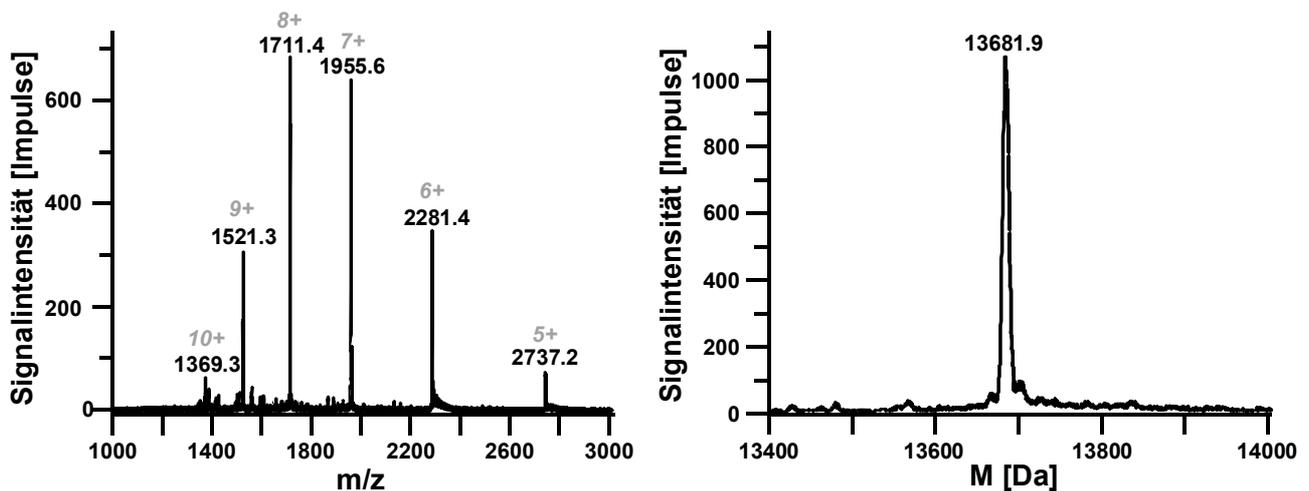


Abbildung 15. ESI-Massenspektrum von Ribonuklease A (Rind) mit Ladungsverteilung und das daraus ermittelte Dekonvolutionsspektrum.

3.2 Funktionsweise des Ionenfallen-Massenanalysators

Nachdem die Analytmoleküle ionisiert in Gasphase vorliegen, werden sie durch eine Öffnung in der Gegenelektrode zum Massenanalysator transferiert, wo sie aufgrund ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt werden. Für die Analyse der Massen gibt es, wie bei den Ionenquellen, eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden die angewendet werden können. Die Methode der Wahl ergibt sich aus der analytischen Fragestellung und zum Teil auch aus der verwendeten Ionenquelle. Die Hauptkriterien bei der Wahl eines geeigneten Massenanalysators sind der

maximal untersuchbare Massenbereich, die Scangeschwindigkeit, die Auflösung, die Massengenauigkeit und die Empfindlichkeit.

Neben den Ionenfallen-Analysatoren werden noch häufig die linearen Quadrupol- und die Flugzeit-Analysatoren mit der Elektrospray-Ionisations-Technik gekoppelt. Bereits 1960 beschrieben W. Paul und H. S. Steinwedel das physikalische Prinzip einer Quadrupol-Ionenfalle^[72]. Jedoch erst ungefähr 20 Jahre später war die Technik soweit entwickelt, dass sie kommerziell in Massenspektrometern eingesetzt werden konnte^[73]. Das Prinzip der Ionenfalle beruht auf dem Einfangen von Ionen mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Innerhalb dieses Feldes bewegen sich die Ionen auf stabilen Bahnen. Durch Änderung des elektrischen Feldes können die Ionen selektiv nach ihrer Masse aus der Ionenfalle ejiziert und anschließend detektiert werden. Im Gegensatz zu Quadrupol-Analysatoren, wo je nach angelegtem Potential nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis den Analysator passieren, werden bei der Ionenfalle alle Ionen eingefangen und erst anschließend selektiv nach ihrem m/z -Verhältnis aus der Ionenfalle zur Detektion ejiziert. In Abbildung 16 ist der Aufbau eines Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometers schematisch skizziert.

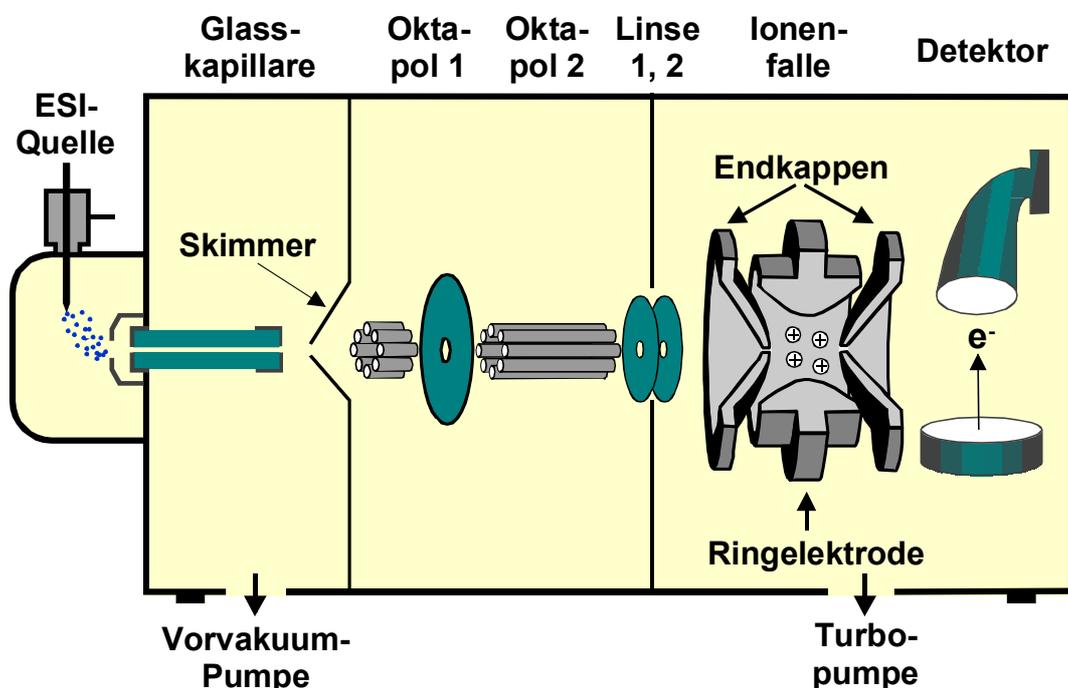


Abbildung 16. Schematische Darstellung eines Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometers.

Die Quadrupol-Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei hyperbolischen Endkappen-Elektroden. Durch Löcher genau im Zentrum der Endkappen können die Ionen in die Falle hinein sowie hinaus gelangen. Die in der Quelle erzeugten Ionen werden mit Hilfe einer vorgeschalteten Ionenoptik (Skimmer, Oktapol-Linsen) fokussiert und zur Ionenfalle transportiert. Um die in die Falle eintretenden Ionen abzubremesen, wird diese mit Heliumgas bis zu einem Druck von 3×10^{-3} bar gefüllt. Durch Kollision mit den Heliumatomen wird die kinetische Energie der Ionen verringert und ein effizienteres Einfangen der Ionen in der Falle gewährleistet. Das Anlegen von Wechselspannungen an die Ringelektrode und die Endkappen erzeugt ein quadrupolares Feld im Inneren der Falle, unter dessen Einwirkung die Ionen auf stabilen Flugbahnen gehalten werden können. Dieses Feld, in dem die Ionen gefangen werden, entspricht einer räumlich ausgedehnten Potentialmulde, die einige Elektronenvolt tief ist. Durch Lösen der Mathieuschen Bewegungsgleichungen können die Spannungen ermittelt werden, die an der Ionenfalle angelegt werden müssen, damit die Ionen stabile Flugbahnen im quadrupolaren Feld beschreiben^[74]. Während eines Messzyklus werden die Ionen für eine begrenzte Zeit, meist zwischen 0.1 und einigen 100 ms, in der Falle akkumuliert. Anschließend wird die Transferstrecke zwischen Ionenquelle und Ionenfalle durch Änderung der elektrischen Potentiale für weitere Ionen blockiert. Dies gewährleistet, dass keine weiteren Ionen mehr in die bereits gefüllte Falle eindringen. Die Falle wird also nur bis zu einem gewissen Anteil mit Ionen gefüllt. Dies geschieht zum einen, um eine zu hohe Raumladungsdichte von Ionen in der Falle zu vermeiden, die zu einer gegenseitigen Beeinflussung der gespeicherten Moleküle und zu einer Minderung der Massengenauigkeit führen würde. Zum anderen soll die Massenanalyse nicht durch nachfolgende Ionen beeinträchtigt werden.

Die sequentielle Ejektion der Ionen erfolgt durch Generierung einer massenselektiven Resonanzfrequenz an den Endkappen. Diese bewirkt eine Destabilisierung der Ionenflugbahn und somit ein Auswerfen der Ionen aus der Falle. Die ausgeworfenen Ionen werden abschließend mit Hilfe von Multipliern, die das Signal über Sekundärelektronen-Vervielfacher verstärken, detektiert.

Die Erzeugung von Fragmentationen für die Tandem-Massenspektrometrie erfolgt durch kollisionsinduzierte Dissoziation der Ionen. Hierbei wird jeweils ein bestimmtes m/z -Verhältnis (Vorläuferion) in der Falle isoliert. Die übrigen Ionen werden vorher durch Anregung mittels Resonanzfrequenz aus der Falle entfernt. Die kinetische

Energie des selektierten Vorläuferions wird durch Einstrahlen einer Resonanzfrequenz erhöht, wodurch es zu Stößen mit den Heliumatomen, die sich ebenfalls in der Falle befinden, kommt. Aufgrund dieser Zusammenstöße wird soviel potentielle Energie auf die Moleküle übertragen, dass diese in der Falle fragmentieren. Anschließend können diese Fragmentionen sequentiell aus der Ionenfalle eijiziert und detektiert werden. Alternativ ist es auch möglich eines dieser Fragmentionen in der Falle zu isolieren und über kollisionsinduzierte Dissoziation weiter zu fragmentieren. Dieser Prozess, der theoretisch mehrere Male wiederholt werden kann (MS^n), ist jedoch durch die Verringerung der Signalintensität auf eine konkrete Anzahl an MS/MS-Operationen beschränkt. Die einzelnen Abläufe einer MS/MS-Analyse mittels Ionenfallen-Massenanalysators sind in Abbildung 17 schematisch skizziert.

Die Vorteile der Ionenfalle liegen im Vergleich zum linearen Quadrupol-Massenanalysator in der wesentlich höheren Scangeschwindigkeit (Faktor 10-20 höher) und in der Möglichkeit mehrere MS/MS-Operationen (bis zu MS^{10}) nacheinander durchführen zu können. Aufgrund dieser Eigenschaften sind die Ionenfallen-Massenspektrometer prädestiniert für die Kopplung mit chromatographischen Trennsystemen, die eine hohe Datenaufnahmerate fordern, sowie für die Strukturaufklärung und eindeutige Identifizierung von Analytmolekülen, wozu Fragmentspektren unerlässlich sind.

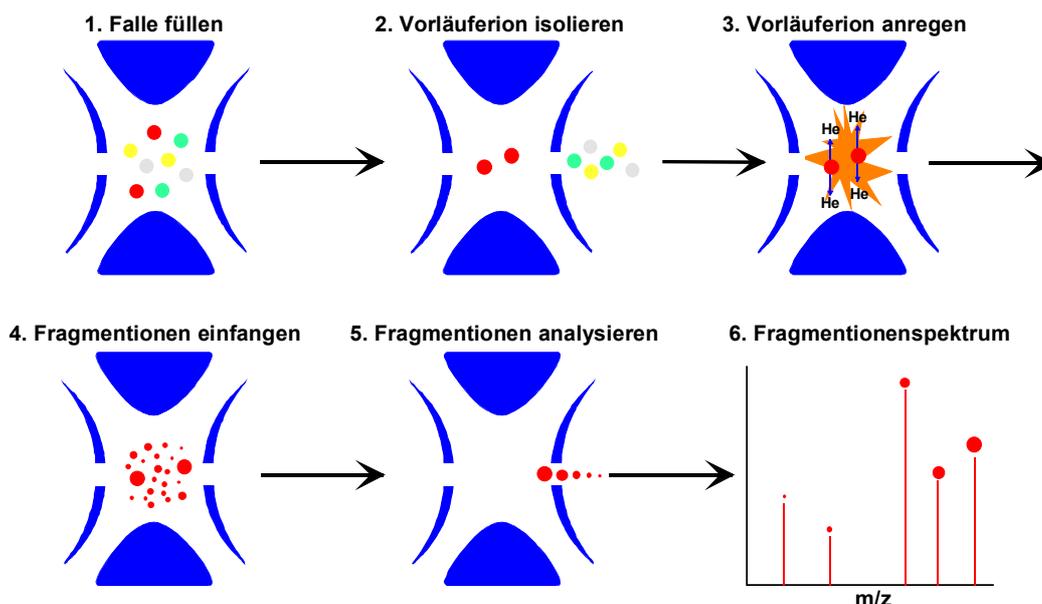


Abbildung 17. Schematische Darstellung der Funktionsweise einer MS/MS-Analyse mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer.

3.3 Peptid-/Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

3.3.1 Fragmentierungsreaktionen von Peptidionen^[75;76]

Die am häufigsten verwendete Methode zur Identifizierung von Proteinen mit Hilfe der Massenspektrometrie beinhaltet den proteolytischen Verdau der Proteine zu den entsprechenden Peptiden und die anschließende Charakterisierung der erhaltenen Peptide mittels Massenspektrometrie (MS) oder Tandem Massenspektrometrie (MS/MS). Die über die MS Analyse erhaltenen Massen können zur Identifizierung der Peptide herangezogen werden (Peptid-Massen-Fingerprinting (PMF)). In den meisten Fällen ist jedoch aufgrund der Komplexität der Proteinproben oder einer unzureichenden Massengenauigkeit der verwendeten Massenspektrometer keine eindeutige Peptid-Zuordnung aufgrund der Massen zu treffen. In diesen Fällen werden die Peptide neben ihrer Masse auch noch über charakteristische Peptidfragmente identifiziert (Peptid-Fragment-Fingerprinting (PFF)). Hierbei werden von den ionisierten Peptiden Fragmentionen mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) erzeugt. Die Aktivierung erfolgt über Stöße mit Gasmolekülen (z.B. Helium), wobei die Translationsenergie der Ionen teilweise in Schwingungsenergie umgewandelt wird, welche anschließend zu struktursignifikanten Fragmentierungsreaktionen führt. Diese Methode erlaubt des Weiteren die Ermittlung der Aminosäuresequenzen von unbekanntem Peptiden (De novo Sequenzierung) sowie die Identifizierung und Lokalisierung von posttranslatorischen Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung oder Glykolisierung, die in der Proteinanalytik aufgrund ihrer biologischen Relevanz von besonderer Bedeutung sind. Ein grundlegendes Wissen über die möglichen Peptid-Fragmentierungsreaktionen ist unablässig um die aufgenommen MS/MS Spektren richtig interpretieren zu können.

Es gibt drei verschiedene Arten von sequenz-spezifischen Fragmentierungsreaktionen die das Peptid entlang der Peptidbindungen („Peptidrückgrat“) spalten (Abbildung 18). Das Peptid kann genau vor oder nach der eigentlichen Peptidbindung (Carbonsäureamid) gespaltet werden oder die Peptidbindung selbst wird gespalten. Je nachdem ob die Ladung am N-terminalen Fragment verbleibt, entstehen die N-terminalen Sequenzen a_n , b_n , c_n , wohingegen sich die C-terminalen Sequenzen x_m , y_m und z_m bilden wenn das C-terminale

Fragment die Ladung trägt^[77;78]. Unter den herkömmlich verwendeten niedrig-Energie MS/MS Fragmentierungsbedingungen (Kollisionsenergie < 200 eV) entstehen hauptsächlich die a_n , b_n und y_m Fragmentationen.

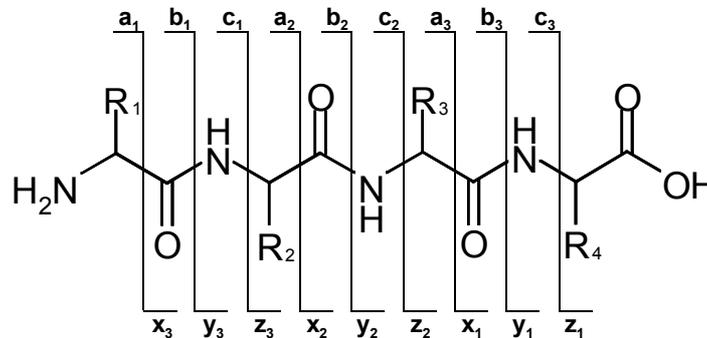


Abbildung 18. Kollisioninduzierte Fragmentierung entlang des „Peptid-Rückgrats“.

Neben diesen drei Fragmentierungsmöglichkeiten kann es bei der CID von Peptiden auch zu sequenz-unspezifischen Fragmentierungen, wie z.B. der Abspaltung von Wasser, Ammoniak und Kohlenmonoxid sowie zu Abspaltungen an den Seitenketten der Aminosäuren kommen.

Als niedrig-Energie Fragmentierungsbeispiel ist in ein MS/MS Spektrum des Peptids PFGK abgebildet. Die Fragmentierungsenergie wurde hierbei so gewählt, dass das einfach geladene Vorläuferion nicht vollständig fragmentiert wurde und somit noch deutlich im Spektrum zu erkennen ist. Neben diesem ist im Spektrum die komplette y - und b - Fragmentationenserie sowie das a_2 -Fragmentation, welches durch die Abspaltung von Kohlenmonoxid aus dem b_2 -Fragmentation entstanden ist, zu erkennen.

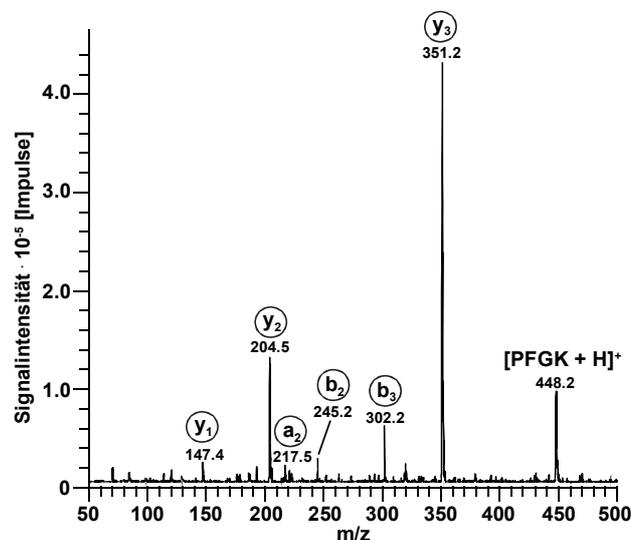


Abbildung 19. MS/MS Spektrum des Peptids PFGK.

3.4 Computerunterstützte Interpretation von MS und MS/MS Spektren

Für die eindeutige Identifizierung von Proteinen reicht die massenspektrometrisch ermittelte Proteinmasse, selbst bei einer hohen Massengenauigkeit des verwendeten Massenspektrometers, in der Regel nicht aus. Aus diesem Grund werden die Proteine vor der massenspektrometrischen Untersuchung meist mit chemischen oder biologischen Reagenzien an spezifischen Stellen gespalten und so in die kleineren Peptide überführt. Analysiert man die verdauten Probe, so erhält man für jedes Protein ein den Peptiden entsprechendes charakteristisches Massenspektrum. Diese charakteristischen Spektren, die man auch als Peptid-Massen-Fingerabdruck (Fingerprint) bezeichnet, können anschließend mit theoretisch berechneten Massenspektren verglichen werden (Peptid-Massen-Fingerprinting, PMF)^[14]. Für die Generierung der theoretischen Massenspektren und den anschließenden Vergleich zwischen berechneten und gemessenen Spektren stehen eine Vielzahl von Computerprogrammen zur Verfügung. Eine kleine Auswahl dieser Programme ist in Tabelle 6 aufgeführt. Für eine zuverlässige Proteinidentifizierung über Peptid-Massen-Fingerprinting müssen die genauen Messbedingungen und Suchkriterien, wie z.B. die verwendete Protease, chemische Modifikationen, untersuchter Organismus und Massentoleranzen, an das Computerprogramm weitergegeben werden. Das Programm spaltet die Proteine aus einer zugewiesenen Datenbank *in silico* und vergleicht die Übereinstimmung der berechneten und gemessenen Spektren. Die Höhe der Übereinstimmung wird anschließend nach einem vom verwendeten Algorithmus abhängigen Wertungssystem ausgegeben.

Tabelle 6. Auflistung von Computerprogrammen zur Proteinidentifizierung via PMF.

Suchmaschine	Webseite
Aldente	http://www.expasy.org
Mascot	http://www.matrixscience.com
MS-Fit	http://prospector.ucsf.edu
Profound	http://prowl.rockefeller.edu

Für die in der Bioanalytik charakteristischen komplexen Proben stellt das Peptid-Massen-Fingerprinting jedoch nicht die Methode der Wahl dar. Hier überlagern sich meist die Signale von mehreren verdauten Proteinen im Massenspektrum, wodurch eine eindeutige Zuordnung der Peptidmassen überhaupt nicht mehr oder nur noch

sehr schwierig möglich ist. Des Weiteren muss für ein zufriedenstellendes PMF ein Massenspektrometer mit einer sehr hohen Massengenauigkeit zur Verfügung stehen. Die Alternative zum PMF stellt das Peptid-Fragment-Fingerprinting (PFF) dar. Hier werden die Peptide der verdauten Proteine in einem ersten MS-Scan selektiert, dann mit Hilfe eines Inertgases kollisionsinduziert fragmentiert und abschließend werden die gebildeten Fragmentionen in einem zweiten MS-Scan (MS/MS-Spektrum) analysiert. Die selektierten Peptidmassen (Vorläuferionen) und die dazugehörigen charakteristischen Fragmentmassen können dann ähnlich zum PMF mit den theoretisch generierten Daten verglichen werden^[17]. Da beim PFF neben den Peptidmassen auch noch die spezifischen Fragmentionenspektren für die Auswertung zur Verfügung stehen, gewährleistet diese Methode eine zuverlässigere Identifizierung von Proteinen, insbesondere bei komplexen Proben. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass bei der Analyse von komplexen Proben die Generierung der MS/MS-Spektren meist datenabhängig erfolgt (data-dependent MS/MS). Das bedeutet, dass bei jedem Fullscan nur eine bestimmte Anzahl der intensivsten Signale für die kollisionsinduzierte Fragmentierung selektiert wird. Aus diesem Grund kann es bei der tandem-massenspektrometrischen Analyse von sehr komplexen Proben dazu kommen, dass viele Peptide aufgrund einer geringen Signalintensität im Fullscanspektrum nicht als Vorläuferionen ausgewählt werden und somit auch nicht über PFF identifiziert werden können. Die Auftrennung von komplexen Peptid-/Proteinmischungen über hochauflösende Trenntechniken ist deshalb vor der massenspektrometrischen Detektion unerlässlich, um eine möglichst hohe Identifikationsrate über data-dependent MS/MS zu erzielen. Die eindimensionale bzw. mehrdimensionale Hochleistungs-Flüssigchromatographie, welche sich durch ein hohes Auflösungsvermögen sowie eine hohe Peakkapazität auszeichnet und einfach mit der Massenspektrometrie zu koppeln ist, hat sich für diese Art von Analysen schon mehrfach bewährt.

Auch für das PFF stehen viele Programme zur Verfügung. Die prominentesten Vertreter für die Datenbanksuche stellen die Programme Sequest von Jimmy Eng und John Yates und Mascot von Matrix Science dar. Die Software von Matrix Science, welche für alle Datenbanksuchen in dieser Arbeit verwendet wurde, benutzt eine wahrscheinlichkeitsbasierte Integration des MOWSE (Molecular weight search)-Scoring-Algorithmus^[14;79]. Der Grad der Übereinstimmung der simulierten und gemessenen Spektren wird durch einen spezifischen Wert (Score) angegeben,

welcher die Wahrscheinlichkeit für einen Zufallstreffer bei der Protein/Peptid-Identifizierung ausdrückt. Je höher dieser Wert ist, desto niedriger ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem identifizierten Peptid/Protein um einen Zufallstreffer handelt. Die Höhe des angegebenen Wertes hängt hierbei von der Zahl an Fragmentationen ab, die im MS/MS-Spektrum dem entsprechenden Peptid zugeordnet werden können. Die genaue Definition für den angegebenen Score ist $-10 \cdot \log (P)$, wobei P für die Wahrscheinlichkeit eines Zufallstreffers steht. So wäre z.B. bei einem Score von 200 für die Identifizierung eines Peptides die Wahrscheinlichkeit 10^{-20} , dass es sich um einen Zufallstreffer handelt.

Neben der Identifizierung von bereits bekannten Proteinen ist es auch möglich mit Hilfe von MS/MS-Spektren völlig unbekannte Peptidsequenzen zu analysieren und zu bestimmen. Da sich dieses de novo Sequenzieren von Hand, je nach Spektrum, als sehr zeitaufwendig und schwierig darstellen kann, sind für diese Anwendung ebenfalls einige Softwarepakete erhältlich. Doch bei relativ komplexen Proben sind auch diese meist überfordert, da die Kombinationsmöglichkeiten einfach zu groß sind. Aus diesem Grund gestaltet sich eine zuverlässige de novo Sequenzierung von komplexen Proteinmischungen anhand der gemessenen MS/MS-Spektren noch als äußerst schwierig.

4. Literatur

1. *Specificity of proteolysis*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1992.
2. A. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of proteolytic enzymes*, Academic Press, 1998.
3. Y. Oda, T. Nagasu, B. T. Chait, *Nat. Biotechnol.*, 19 (2001), 379-82.
4. M. Adamczyk, J. C. Gebler, J. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15 (2001), 1481-8.
5. S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotech.*, 17 (1999), 994-999.
6. B. Moritz, H. E. Meyer, *Proteomics*, 3 (2003), 2208-20.
7. C. K. Meng, M. Mann, J. B. Fenn, *Z. Phys.*, 10 (1988), 361-368.
8. M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 60 (1988), 2299-2301.
9. F. Lottspeich, *Angew. Chem. Int Ed.*, 38 (1999), 2476-2492.
10. G. J. Opiteck, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem.*, 69 (1997), 1518-1524.
11. N. L. Kelleher, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 197A-203A.
12. K. M. Millea, I. S. Krull, S. A. Cohen, J. C. Gebler, S. J. Berger, *J. Proteome Res.*, 5 (2006), 135-46.
13. P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.*, 250 (1975), 4007-4021.
14. D. J. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.*, 3 (1993), 327-32.
15. M. Mann, P. Hojrup, P. Roepstorff, *Biol. Mass Spectrom.*, 22 (1993), 338-45.
16. M. Mann, M. Wilm, *Anal. Chem.*, 66 (1994), 4390-9.
17. J. K. Eng, A. L. McCormack, J. R. I. Yates, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 5

- (1994), 976-989.
18. T. E. Creighton , *Proteins: Structures and molecular properties*, 2nd ed. W. H. Freeman and Company, New York 1993.
 19. D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 5683-5690.
 20. Z. Deyl, I. Miksik, F. Tagliaro, E. Tesarova, *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Elsevier, Amsterdam 1998.
 21. M. Kastner, *Protein liquid chromatography*, Elsevier, Amsterdam 2000.
 22. M. T. W. Hearn, *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, VCH Publishers, New York 1991.
 23. C. T. Mant, R. S. Hodges, *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Ranton 1991.
 24. E. D. Katz, *High-Performance Liquid Chromatography: Principles and Methods in Biotechnology*, (Scott, R. P. W., Simpson, C. F., and Katz, E. D.) John Wiley and Sons, Chichester 1996.
 25. X. Geng, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 296 (1984), 15-30.
 26. E. Heftman, *Chromatography, 5th edition*, Elsevier, Amsterdam 1992.
 27. G. Thevenon, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 476 (1989), 499-511.
 28. C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *J. Chromatogr.*, 125 (1976), 129-156.
 29. M. Patthy, *J. Chromatogr. A*, 660 (1994), 17-23.
 30. W. R. Melander, Z. El Rassi, C. Horváth, *J. Chromatogr.*, 469 (1989), 3.
 31. A. Bartha, J. Stahlberg, *J. Chromatogr.*, 535 (1990), 181-187.
 32. A. Bartha, J. Stahlberg, *J. Chromatogr. A*, 668 (1994), 255-284.
 33. Chen J.-G., S. G. Weber, L. L. Glavina, F. F. Cantwell, *J. Chromatogr. A*, 656 (1993), 549-576.

34. C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, 57 (1985), 675-679.
35. J. F. Banks, *J. Chromatogr. A*, 743 (1996), 99-104.
36. M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 78 (1987), 53-68.
37. P. E. Andren, M. R. Emmett, R. M. Caprioli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5 (1994), 867-869.
38. W. Kopaciewicz, M. A. Rounds, J. Fausnaugh, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 266 (1983), 3-21.
39. K. Kalghatgi, C. Horváth, in *Analytical Biotechnology-Capillary Electrophoresis and Chromatography* Eds.: C. Horváth, J. G. Nikelly), American Chemical Society, Washington, DC 1990, p. pp. 163-180.
40. L. C. Hansen, R. E. Sievers, *J. Chromatogr.*, 99 (1974), 123-133.
41. S. Hjerten, J.-L. Liao, R. Zhang, *J. Chromatogr.*, 473 (1989), 273-275.
42. F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 64 (1992), 820-822.
43. H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 68 (1996), 3498-3501.
44. C. Viklund, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Chem. Mater.*, 8 (1996), 744-750.
45. M. Petro, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, 752 (1996), 59-66.
46. H. Oberacher, A. Premstaller, C. G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004), 201-8.
47. F. C. Leinweber, U. Tallarek, *J. Chromatogr. A*, 1006 (2003), 207-28.
48. K.-E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.*, 60 (1988), 1662-1665.
49. R. T. Kennedy, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 61 (1989), 1128-1135.
50. H. Oberacher, A. Krajete, W. Parson, C. G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 893

- (2000), 23-35.
51. R. P. W. Scott, C. F. Simpson, *J. Chromatogr. Sci.*, 20 (1982), 62-66.
 52. M. Novotny, *Anal. Chem.*, 60 (1988), 500A-510A.
 53. R. P. W. Scott, *Adv. Chromatogr.*, 22 (1983), 246-295.
 54. I. Z. Atamna, G. M. Muschick, H. J. Issaq, *J. Liq. Chromatogr.*, 12 (1989), 285-298.
 55. J. P. Chervet, M. Ursem, J. P. Salzmann, *Anal. Chem.*, 68 (1996), 1507-1512.
 56. J. P. C. Vissers, H. Claessens, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997), 1-28.
 57. Y. Shen, Y. J. Yang, M. T. Lee, *Anal. Chem.*, 69 (1997), 628-635.
 58. R. T. Kennedy, I. German, J. E. thompson, S. R. Witowski, *Chem. Rev.*, 99 (1999), 3081-3131.
 59. A. T. Beisler, K. E. Schaefer, S. G. Weber, *J. Chromatogr. A*, 986 (2002), 247-251.
 60. J. P. Chervet, C. J. Meijvogel, M. Ursem, J. P. Salzmann, *LC GC*, 10 (1992), 140-148.
 61. Chervet, J. P. and van Soest, R. E. J., 0597552A1, 93.
 62. L. Tao, R. T. Kennedy, *Trends Anal. Chem.*, 17 (1998), 464-491.
 63. K. B. Tomer, M. A. Moseley, L. J. Deterding, C. E. Parker, *Mass Spectrom. Rev.*, 13 (1994), 431-457.
 64. H. J. Cortes, *J. Chromatogr.*, 626 (1992), 3-23.
 65. J. C. Giddings, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995), 3-15.
 66. S. L. Wu, H. Amato, R. Biringer, G. Choudhary, P. Shieh, W. S. Hancock, *J. Proteome Res.*, 1 (2002), 459-65.

67. M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.*, 49 (1968), 2240.
68. M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Chem. Phys.*, 88 (1984), 4451-4459.
69. M. S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, 136 (1994), 167-180.
70. D. C. Taflin, T. L. Ward, E. J. Davis, *Langmuir*, 5 (1989), 376-384.
71. A. Gomez, K. Tang, *Phys. Fluids*, 6 (1994), 404-414.
72. Paul W. and Steinwedel, H. S., 60.
73. G. C. Stafford Jr., P. E. Kelley, J. E. Skya, W. E. Reynolds, J. F. Todd, *Int. J. Mass Spectrom Ion Processes*, 60 (1984), 85.
74. S. A. McLuckey, G. J. Van Berkel, D. E. Goeringer, G. L. Glish, *Anal. Chem.*, 66 (1994), 689-696.
75. Wang P., Kish M. M., Wesdemiotis C., *Encyclopedia of mass spectrometry*, 2 (2004), 139-151.
76. J. A. Marto, C. J. Brame, S. B. Ficarro, F. M. White, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Encyclopedia of mass spectrometry*, 2 (2004), 165-176.
77. P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11 (1984), 601.
78. K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 16 (1988), 99-111.
79. D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis*, 20 (1999), 3551-67.

Kapitel III

Entwicklung eines zwei-
dimensionalen HPLC-Systems und
Charakterisierung der einzelnen
Dimensionen

III. Entwicklung eines zweidimensionalen HPLC-Systems und Charakterisierung der einzelnen Dimensionen

1. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein multidimensionales HPLC System durch Kopplung von unabhängigen chromatographischen Trenntechniken entwickelt werden. Ziel war letztendlich die Analyse eines bakteriellen Proteoms unter Verwendung der gekoppelten chromatographischen Systeme in Kombination mit der Massenspektrometrie.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwei Arten von multidimensionalen HPLC-Systemen, on-line und off-line Systeme. Bei den on-line Systemen werden die einzelnen Trenntechniken direkt in Serie miteinander gekoppelt (nur eine HPLC-Anlage). Dies geschieht entweder durch Kombination von individuellen Trennsäulen über geeignete Schaltventile^[1] oder durch Verwenden einer Säule, die Segmente mit unterschiedlichen stationären Phasen enthält^[2]. Dieses Setup garantiert zum einen eine vollständige Automatisierung und einen geringen Verlust an Probe beim Transfer zwischen den einzelnen Dimensionen. Andererseits müssen jedoch die Flussraten und die Zusammensetzung der mobilen Phasen an alle chromatographischen Dimensionen angepasst werden und die Trennungen können nicht unabhängig voneinander durchgeführt werden. Die off-line Methode kombiniert voneinander komplett unabhängige Trennsysteme, wobei die jeweils in einer Dimension aufgetrennten Analyten durch manuelle oder automatische Fraktionierung und anschließende Reinjektion in die nächste Dimension überführt werden^[3]. Dieser Ansatz ermöglicht eine einfache und unabhängige Optimierung der einzelnen Trenndimensionen, eine Überwachung der einzelnen Dimensionen über UV-Detektion, sowie eine zusätzliche Manipulation der gesammelten Fraktionen (z.B. Aufkonzentrierung, Entfernen von organischen Additiven oder Änderung des Puffers in welchem die Fraktionen vorliegen) bevor sie in die nächste Dimension überführt werden. Da die Säulendimensionen der individuellen Systeme nicht aufeinander abgestimmt sein müssen, ist es des Weiteren möglich, durch die Verwendung einer

größeren Säule (4.0 mm I.D.) in der 1. Dimension sehr große Probemengen aufzugeben (mg-Bereich). Dies gewährleistet eine bessere Detektion der niedrig-abundanten Peptide/Proteine in den nachfolgenden Dimensionen. Ein weiterer Vorteil den die off-line Methoden bieten, ist die Möglichkeit, lineare Gradienten in der 1. Dimension zur Probenelution einzusetzen, wodurch eine effiziente Trennung gewährleistet wird.

Unser multidimensionales HPLC-System sollte zwei Trenntechniken, starke Kationenaustausch- und Ionenpaar-Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie miteinander kombinieren. Die Wahl fiel auf diese beiden Chromatographiemodi, da diese Analyten aufgrund unterschiedlicher und voneinander unabhängigen chemischen/physikalischen Eigenschaften auftrennen (SCX: elektrostatische WW, IP-RP: solvophobe WW) und sich schon bei vielen multidimensionalen Kopplungen, on-line wie off-line, bewährt haben^[1;4-9].

Die Kationenaustauschchromatographie sollte in der 1. Dimension und die Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie in der 2. Dimension verwendet werden. Die IP-RP-HPLC in der 2. Dimension einzusetzen bietet den Vorteil, dass diese, bei Verwendung von mobilen Phasen mit flüchtigen Komponenten, direkt mit der ESI-Massenspektrometrie gekoppelt werden kann^[10;11]. Außerdem zeichnet sich diese Trenntechnik durch ein hohes Auflösungsvermögen und eine große Trenneffizienz aus. Als Trennmedium sollten hier unpolare monolithische Poly(Styrol-Divinylbenzol) (PS/DVB) Kapillarsäulen (60 x 0.20 bzw. 0.10 mm I.D.) eingesetzt werden. Diese haben sich bereits mehrfach als stationäre Phasen für schnelle und effiziente Trennung von Biomolekülen bewährt^[12-14]. Jedoch konnten diese Säulen bisher noch nicht in multidimensionalen Chromatographiesystemen verwendet werden, da keine geeigneten Anreicherungssäulen^[15] zur Verfügung standen. Die Aufgabe der Anreicherungssäulen in multidimensionalen Systemen besteht darin, Fraktionen einer Trenndimension von störenden Komponenten im Eluat zu befreien (z.B. Entsalzen) und die Analyten zusätzlich aufzukonzentrieren, bevor sie in die nächste Dimension zur weiteren Auftrennung transferiert werden. Gerade bei der Verwendung von Trenntechniken, die hohe Salzkonzentrationen in den Eluenten benötigen, ist das Entsalzen der einzelnen Fraktionen unerlässlich, bevor man die Trennung in der darauf folgenden Dimension fortsetzt. Dies gilt speziell wenn die Fraktionen nachfolgend massenspektrometrisch detektiert werden sollen, da hier die Salze durch Kristallisation die Quelle stark verschmutzen und durch

Adduktionenbildung die Detektion stören^[9;16]. Auch in der eindimensionalen Mikro-HPLC werden Anreicherungsäulen des Öfteren verwendet um große Probenvolumina injizieren zu können. Die verdünnten Proben können an der Anreicherungsäule fokussiert und anschließend nach dem Transfer zur analytischen Trennsäule ohne Einbußen in der Trennleistung analysiert werden. Allgemein muss man bei der Verwendung von Anreicherungsäulen jedoch zwei grundlegende Voraussetzungen beachten. Zum einen muss die stationäre Phase in der Anreicherungsäule ein hohes Retentionsvermögen besitzen und die Probe muss in einem Lösungsmittel mit niedriger Elutionskraft aufgegeben werden, um einen Verlust an Probe beim Beladungsschritt zu verhindern. Zum anderen muss die Retentionskraft der Anreicherungsäule an die der analytischen Trennsäule angepasst werden, d.h. diese muss entweder gleich groß oder niedriger sein, damit die Analyten nach der Elution von der Anreicherungsäule noch Adsorption an der analytischen Trennsäule zeigen. Diese Bedingungen werden erfüllt, wenn man die gleiche stationäre Phase in Anreicherungs- und Trennsäule verwendet.

Da wir in der 2. Dimension monolithische Poly(Styrol-Divinylbenzol) Säulen (PS-DVB) aufgrund ihrer hohen Trennleistung für Proteine^[12;17;18] und Peptide^[13;14;19;20], einsetzen wollten, musste die Anreicherungsäule dementsprechend angepasst werden. Wie bereits gezeigt, sind oktadekylierte PS-DVB Phasen hydrophober als reine PS-DVB Phasen^[21], wodurch ein Einsatz der häufig bei Anreicherungsäulen verwendeten oktadekyl-derivatisierten stationären Phasen in Kombination mit einer underivatisierten PS-DVB Trennsäule ausgeschlossen ist. Aus diesem Grund entschlossen wir uns für eine Anreicherungsäule, die auf der gleichen stationären Phase wie die analytische Trennsäule basieren sollte.

Da die Anreicherungsäulen relativ kurz sein müssen, um somit eine Beladung mit Probe bei hohen Flussraten und niedrigen Druckabfällen zu gewährleisten, können herkömmliche Verbindungen bzw. Säulengehäuse für die Einbindung in ein HPLC-System nicht verwendet werden. Aus diesem Grund entwickelten wir ein spezielles Gehäuse für Kapillar-Anreicherungsäulen, das in der 2. Dimension eingesetzt werden sollte. Eine detaillierte Beschreibung und Charakterisierung dieser Anreicherungsäule erfolgt in Kapitel 3.2.

Für die Kopplung der 1. mit der 2. Dimension mussten wir uns zwischen einer on-line bzw. off-line Variante entscheiden. Aus diesem Grund charakterisierten wir eine analytische SCX-Säule (ProPac SCX-10) mit konventionellen Maßen (250 x 4.0 mm

I.D.), welche in einer off-line Variante eingesetzt werden könnte, und drei verschiedene SCX-Kapillarsäulen, welche on-line mit den monolithischen Kapillarsäulen in der 2. Dimension kombiniert werden könnten. Zwei der SCX-Kapillarsäulen (60 bzw. 250 x 0.20 mm I.D.) wurden selbst gepackt und besaßen die gleiche stationäre Phase wie die analytische SCX-Säule. Bei der dritten SCX-Kapillarsäule handelte es sich um eine Poros 10S SCX-Säule (100 x 0.30 mm I.D.) von Dionex (Idstein, Amsterdam). Neben den SCX-Säulen wurden zusätzlich noch monolithische PS-DVB Kapillarsäulen bezüglich ihrer Trennleistung für Peptide untersucht. Des Weiteren wurden die HPLC-Anlagen, die für das zweidimensionale System in Frage kamen (konventionelle und Mikro-HPLC Anlagen), charakterisiert. Hierbei wurden die Mikro-HPLC Anlagen besonders ausführlich getestet, da diese aufgrund der niedrigen Flussraten, die sie generieren müssen, wesentlich anfälliger als konventionelle HPLC-Anlagen sind. Im Rahmen dieser Tests wurde eine neu entwickelte Mikro-HPLC Anlage mit elektronischer Splitregulierung (LCPackings - A Dionex Company) charakterisiert und mit dem Vorgängermodell verglichen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Kapitel 3.1 aufgeführt.

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Materialien

Das in den Experimenten verwendete Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Schweiz) aufbereitet. Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat (p. a.) und Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat (p. a.) wurden bei Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft und Natriumchlorid (p. a.) sowie Kaliumchlorid (99.5 %) bei Grüssing (Filsim, Deutschland). Acetonitril (E Chromasolv), Methanol (99.8%), Dithiothreitol (min. 99%), 2-Mercaptoethanol (> 98%), benzoyleierte Dialyseschläuche (Ausschlussgrenze: $M \approx 2000$ Da), Cytochrom C (Type V-A, Rinderherz), Lysozym (Hühnereiweiß, 95%), Myoglobin (Pferd, 95-100%), Transferrin (Rind, 98%), α -Lactalbumin (Typ I, Rindermilch, 85%), Ribonuklease A (Type I-AS, Rinderbauchspeicheldrüse), Trypsinogen (Rinderbauchspeicheldrüse) α -Chymotrypsinogen A (Type II, Rinderbauchspeicheldrüse), Serum Albumin (Rind), Catalase (Rinderleber), β -Lactoglobulin A (Rindermilch), Carboanhydrase (Rind), Leucin-Enkephalin, Bombesin, Oxytocin, LHRH, Bradykinin, Substanz P und eine Peptidmischung aus neun bioaktiven Peptiden (P2693 mit Bradykinin Fragment 1-5, Oxytocin, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, [Arg⁸]-Vasopressin, Bombesin, Luteinizing Hormone Releasing Hormone, Bradykinin, Substanz P) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Harnstoff ($\geq 99.5\%$), Ammoniumhydrogencarbonat ($\geq 99.5\%$), Iodessigsäure (p.a. $\geq 99.5\%$), Ameisensäure (FA, p.a.), Trifluoressigsäure (TFA, $\geq 99.5\%$), Heptafluorbuttersäure (HFBA, $\geq 99.0\%$) und Aceton (pract.) waren von Fluka (Buchs, Schweiz). Koffeinstandards gelöst in Wasser, lyophilisierte Cytochrom C (Rind) Verdauung und ein Gemisch von fünf polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs: Naphthalin (63.2 $\mu\text{g/ml}$), Biphenyl (50.6 $\mu\text{g/ml}$), Anthracen (40.0 $\mu\text{g/ml}$), Fluoren (9.0 $\mu\text{g/ml}$) und Uracil (4.7 $\mu\text{g/ml}$) gelöst in Wasser/Acetonitril 30:70 (v/v) wurden von LCPackings – A Dionex Company (Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Modifiziertes Trypsin wurde bei Promega (Madison, WI, USA) gekauft. Quarzkapillaren waren von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) und PEEK (Polyetheretherketon) Kapillaren, Nano-Titanfritten, Sleeves, Unions sowie Fittings waren von Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA).

2.2 Geräte

Das HPLC-System für die Kationenaustauschchromatographie bestand aus einer Niederdruck-Gradientenpumpe (Modell M480G, Gynkotek, Germering, Deutschland), einem 2-Kanal Vakuum-Entgaser (Modell K-5002, Knauer, Berlin, Deutschland), einem manuellen Injektor mit externer Probenschleife (Modell 7125, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), einer starken Kationenaustauschersäule mit pellicularen Poly(Ethylstyrol-Divinylbenzol) Partikeln (ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D., Dionex, Idstein, Deutschland) und einem UV-Detektor (Modell 731.87, Knauer, Berlin, Deutschland) mit einer 12 µl Flusszelle (optischer Lichtweg: 10 mm).

Für die Mikro-HPLC standen zwei Anlagen der Firma LCPackings - A Dionex Company (Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung:

1. Ein UltiMate Capillary/Nano LC System ausgestattet mit einer Mikro-Niederdruck-Gradientenpumpe mit passivem Flussplit-System, Säulenofen, UV-Detektor mit Z-förmiger 3 bzw. 45 nl Zelle und Helium-Entgasungsmodul (UltiMate), ein Säulenschaltmodul mit Beladungspumpe und zwei 10-Wege Ventilen (Switchos) und ein Mikro-Autosampler (Famos).

2. Ein Capillary/Nano LC System (Modell UltiMate 3000) ausgestattet mit zwei Mikro-Niederdruck-Gradientenpumpen und elektronischem Feedback Flussplit-System (Modell LPG-3600), Säulenofen mit zwei integrierten 10-Wege Ventilen (Modell FLM-3100), UV-Detektor mit Z-förmiger 3 bzw. 45 nl Zelle (Modell UVD 3000), Mikro-Autosampler (Modell WPS-3000) und Vakuum Entgaser (Modell SRD-3600).

Als SCX-Kapillarsäulen wurden die kommerziell erhältliche Poros 10S (100 x 0.30 mm I.D., Partikelgröße: 10 µm) von Dionex (Idstein, Deutschland) und selbst gepackte SCX-Kapillarsäulen (60 bzw. 250 x 0.20 mm I.D.) eingesetzt. Die selbst gepackten Säulen enthielten das ProPac SCX-10 Material (10 µm Teilchen), ebenfalls von Dionex, als stationäre Phase. Als Packungspumpe diente eine pneumatisch betriebene Pumpe von Knauer (Modell K-1900, Berlin, Deutschland).

Die verwendeten monolithischen Poly(Styrol-Divinylbenzol) Anreicherungs- (10 x 0.20 mm I.D.) und Trennsäulen (60 bzw. 50 x 0.20 mm I.D.) wurden nach dem Protokoll von Premstaller et al.^[22] in unserem Arbeitskreis angefertigt (auch kommerziell bei LC Packings – A Dionex Company erhältlich). Detaillierte Charakterisierungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Phasen wurden bereits veröffentlicht^[14;22;23].

Des Weiteren wurde noch eine gepackte C18 Kapillarsäule (Pepmap C18, 3 μm , 100 \AA) in den Dimensionen 150 x 0.075 mm I.D. und 150 x 0.30 mm I.D verwendet. Diese beiden Säulen wurden freundlicherweise von LCPackings - A Dionex Company zur Verfügung gestellt.

Zur Detektion der Analyten wurde entweder der UV-Detektor mit einer Z-förmigen 3 nl Zelle (die Verwendung der 45 nl Zelle ist in den entsprechenden Kapiteln speziell vermerkt) oder ein Elektrospray-Ionenfallen Massenspektrometer von Bruker Daltonics (Modell Esquire HCT, Bremen, Deutschland) mit modifizierter ESI-Quelle (Spraynadel: Quarzkapillare, 0.090 mm O.D., 0.020 mm I.D.) benutzt. Die massenspektrometrischen Einstellungen waren abhängig von den untersuchten Proben (Peptide oder Proteine). Für Peptidanalysen wurden folgende MS Parameter verwendet: Scanmodus, Ultrascan (50 – 3000 m/z); Scangeschwindigkeit, 26000 m/z pro s; Fullscan, 500 – 1500 m/z; Ionenpolarität, positiv; Trap drive, 93.2; Oktapol RF Amplitude, 88.5 Vpp; Linse 2, -36.1 V; Kapillarenausgang, 253.8 V; Temperatur der Glaskapillare, 300°C; Nebulizerspray, 15 psi; Trockengas, 4 l/min; Elektrosprayspannung, -3500 V; Offset der Endplatte, -500 V; ICC, 70000; maximale Akkumulationszeit, 200 ms; Scans pro Spektrum, 5. Die MS Einstellungen für Proteinanalysen waren: Fullscan, 1500 – 3000 m/z; Trap drive, 179.1; Oktapol RF Amplitude, 167.2 Vpp; Linse 2, -31.1 V; Kapillarenausgang, 340.0 V; Nebulizerspray, 20 psi; maximale Akkumulationszeit, 150 ms. Die restlichen MS Parameter waren die gleichen, wie die für die Peptidanalysen.

Zum Aufkonzentrieren von Proben wurde ein Eppendorf Vakuum-Konzentrator (Model 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) benutzt.

2.3 Kopplung der Mikro-HPLC mit dem Elektrospray-Massenspektrometer

Um die Bandenverbreiterung aufgrund von Extrasäulenvolumen nach der Trennsäule möglichst gering zu halten, hat sich eine Modifikation des herkömmlichen kommerziellen Quellendesigns bewährt. In herkömmlichen Elektrosprayquellen werden normalerweise Metallnadeln, die robust und leicht zu handhaben sind, eingesetzt. Diese besitzen aber im Allgemeinen einen viel zu großen Innendurchmesser, wodurch die hohe Trennleistung der Kapillarsäulen, aufgrund von diffusionsbedingter Bandenverbreiterung, stark herabgesetzt wird. Ersetzt man die

Metallnadel durch eine Quarzkapillare mit kleinem Innendurchmesser (20 μm I.D.), kann dieser Effekt minimiert werden. Um weiterhin einen stabilen Spray zu gewährleisten, wird bei der verwendeten Kapillare die Polyimidschicht an der Spitze entfernt und ein sauberer, gerader Schnitt mit dem Kapillarschneider vollzogen. Der elektrische Kontakt mit dem Eluenten, welcher beim herkömmlichen Quellendesign über die Metallnadel selbst geschlossen werden kann, erfolgt hier über ein Metallverbindungsstück zwischen Säulenausgang und Spraykapillare. Dieser modifizierte Elektrosprayer (Abbildung 1) hat sich bei niedrigen Flussraten (200 nl/min - 3 $\mu\text{l}/\text{min}$) durch eine hohe Spraystabilität und eine gute massenspektrometrische Empfindlichkeit ausgezeichnet und wurde aus diesem Grund in allen Mikro-HPLC-MS Messungen, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, eingesetzt.

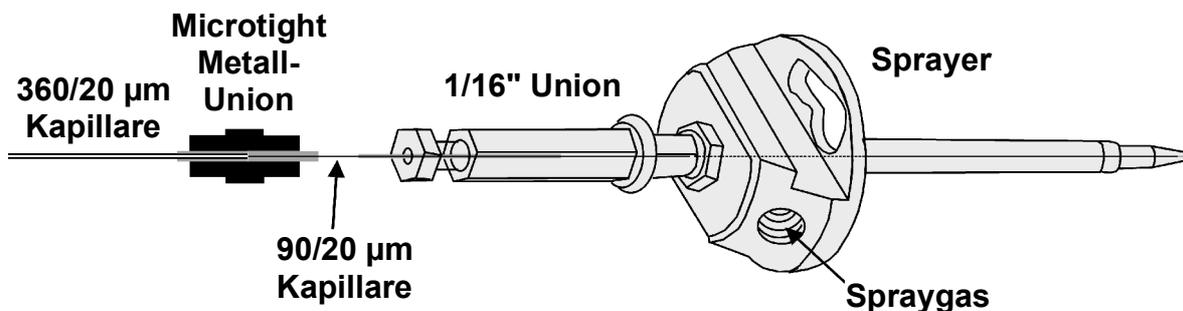


Abbildung 1. Modifizierter Elektrosprayer für die Kopplung mit der Kapillar-HPLC.

2.4 Enzymatischer Proteinverdau

Da die starke Kationenaustauschersäule unter anderem mit tryptischen Peptiden von Serum Albumin (Rind) getestet werden sollte, wurde das intakte Protein mit Trypsin enzymatisch verdaut. Hierfür wurden 5 mg BSA (75 nmol) in 400 μl einer Lösung von 8 mol/l Harnstoff und 0.5 mol/l Ammoniumhydrogencarbonat gelöst und für 30 min bei 37°C unter Schütteln denaturiert. Die Disulfidbrücken im Protein wurden mit 200 μl einer 30 mM Dithiothreitol-Lösung für 4 h bei 37°C in einem Thermomixer (Modell Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) reduziert und anschließend mit 200 mM Iodessigsäure (100 μl) für 15 min bei Raumtemperatur carboxymethyliert. Das überschüssige Alkylierungsmittel wurde durch Zugabe von 200 μl einer 100 mM 2-Mercaptoethanol-Lösung entfernt (15 min). Die Aufreinigung der Lösung erfolgte mittels 12-stündiger Dialyse gegen 1.0 l destilliertes Wasser. Hierfür wurde die

Proteinlösung quantitativ in einen speziellen Dialyseschlauch (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 2000 Da überführt. Die dialysierte Proteinlösung wurde anschließend mit 100 µg Trypsin, das für 30 min bei 37°C in einer 50 mM Essigsäure-Lösung (100 µl) aktiviert wurde, verdaut. Abschließend wurde der Verdau durch Zugabe von 1.0 Vol% Trifluoressigsäure abgebrochen. Die Endkonzentration des tryptisch verdauten BSA betrug 67.6 pmol/µl.

2.5 Packen der SCX-Kapillarsäulen mit der ProPac SCX

Phase

Der Packungstopf, auch Slurry-Reservoir genannt, bestand aus einer 60 mm langen Edelstahlsäule mit einem Innendurchmesser von 2.0 mm ($V = 188.5 \mu\text{l}$). An das untere Ende des Packungstopfes wurde die Kapillare (100 bzw. 270 x 0.20 mm I.D.) mit Hilfe eines Edelstahl Fittings so befestigt, dass noch ungefähr 2 mm der Kapillare in den Packungstopf hineinragten. Das andere Ende der Kapillare wurde mit einer Titanfritte (Dicke: 0.25 mm; Durchmesser: 0.50 mm; Porengröße: 1 µm) versehen, um die stationäre Phase in der Säule zurückzuhalten.

Nachdem alle Teile der Packvorrichtung sorgfältig mit destilliertem Wasser und Methanol gereinigt und anschließend im Ofen getrocknet worden waren, wurden 10 bzw. 15 mg der stationären Phase in 200 bzw. 260 µl einer 50 mM KCl-Lösung bestehend aus einem 1:1 Wasser/Acetonitril Gemisch (v:v) suspendiert. Diese Suspension wurde 10 – 15 min im Ultraschallbad behandelt und dann vorsichtig mit einer Spritze in das Reservoir überführt. Mit Hilfe eines Edelstahl Fittings wurde an das obere Ende des Packungstopfes eine pneumatisch betriebene Pumpe angeschlossen, die mit Methanol als Pumpmedium die Kapillarsäule bei einem extern angelegten Druck von 800 bar (60 mm Säule: 700 bar) mit der stationären Phase füllte. Die Kapillare befand sich während der gesamten Packprozedur in einem thermostatisierten Wasserbad bei 45°C. Nach 30 min wurde der von der Pumpe geförderte Methanolfluss gestoppt und der generierte Druck sank innerhalb von 10 min auf Atmosphärendruck ab. Die Säule wurde anschließend mit destilliertem Wasser bei einem Druck von 800 bar für 150 min (bei 60 mm Säule: 700 bar für 20 min) gespült. Das Spülen mit Wasser sollte ein zusätzliches Schrumpfen der Polymerpartikel in Gegenwart des hydrophilen wässrigen Mediums hervorrufen,

wodurch eine Reduktion des Zwischenkornvolumens und dadurch eine dichtere Packung der stationären Phase in der Säule erhalten werden sollte. Abschließend wurde die Kapillare am oberen Ende mit Hilfe eines Kapillarschneiders auf die gewünschte Länge gekürzt (100 mm auf 60 mm, 270 mm auf 250 mm) und mit einer weiteren Fritte aus Titan versehen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der individuellen chromatographischen Dimensionen

In diesem Kapitel werden die chromatographischen Trenntechniken und HPLC-Anlagen, die für die zweidimensionale Kopplung zur Wahl standen, vorgestellt und individuell charakterisiert. Da Mikro-HPLC-Anlagen Gradienten bei niedrigen Flussraten erzeugen müssen und jedes zusätzliche Extrasäulenvolumen im System große Auswirkungen auf die Trennleistung hat, arbeiten diese nicht ganz so robust und reproduzierbar, wie die etablierten konventionellen HPLC-Anlagen. Aus diesem Grund wurden neben der Charakterisierung der einzelnen Trenntechniken auch speziell noch die Mikro-HPLC-Systeme, die in der 2. Dimension eingesetzt werden sollten, einigen Tests bezüglich der Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Robustheit unterzogen.

3.1.1 Charakterisierung der analytischen starken Kationenaustauschersäule

Die Kationenaustauschchromatographie, welche für den Einsatz im zweidimensionalen HPLC-System geplant war, wurde individuell für die Peptid- und Proteintrennung charakterisiert. Anhand der Ergebnisse der analytischen SCX-Säule und der SCX-Kapillarsäulen sollte letztendlich entschieden werden, welcher multidimensionale Ansatz, on- oder off-line, verwirklicht werden sollte.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Charakterisierung der analytischen SCX-Säule aufgeführt, welche in Kapitel 3.1.2 mit den Ergebnissen der SCX-Kapillarsäulen verglichen werden. Die stationäre Phase der analytischen SCX-Säule basiert auf einer pellicularen Polymerphase aus mikroporösen Poly(Ethylstyrol-Divinylbenzol) Partikeln mit 10 µm Teilchendurchmesser. Die Partikel sind an der Oberfläche zusätzlich noch von einem dünnen Film aus kovalent aufgebunden hydrophilen Polymerketten umgeben, um sekundäre solvophobe Wechselwirkungen zu unterbinden. Diese Polymerketten tragen, je nach Art des Ionenaustauschers, die benötigten funktionellen Gruppen, in unserem Fall Sulfonatgruppen für den starken Kationenaustausch. Die Verwendung der gleichen stationären Phasen in der analytischen SCX-Säule und den zwei selbst gepackten SCX-Kapillarsäulen erlaubte

einen direkten Vergleich ihrer Effizienz und Selektivität bezüglich der Trennung von Peptiden und Proteinen. Mittels Standardproben wurde die Trennleistung der analytischen SCX-Säule für Peptide und Proteine ermittelt. Des Weiteren wurde untersucht, wie stark sekundäre solvophobe Wechselwirkungen bei den Trennungen eine Rolle spielen und wie diese unterdrückt werden können. Auch ein Zusammenhang zwischen der Elutionsreihenfolge der Peptide und ihren pI-Werten bzw. der Anzahl an basischen funktionellen Gruppen in ihren Aminosäuresequenzen wurde überprüft.

SCX-Trennung von Peptiden

Um die Selektivität und Effizienz der ProPac SCX-Säule für Peptidtrennungen evaluieren zu können, analysierten wir eine Peptidmischung bestehend aus neun Standardpeptiden: Bradykinin Fragment 1-5, Oxytocin, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, [Arg⁸]-Vasopressin, Bombesin, LHRH, Bradykinin und Substanz P. Zusätzlich versuchten wir zu ermitteln, inwieweit sekundäre solvophobe Wechselwirkungen eine Rolle bei der Verwendung dieser Säule spielen. Dies wurde durch die Zugabe von verschiedenen Anteilen an organischem Lösungsmittel, in diesem Fall Acetonitril, in den SCX-Eluenten getestet.

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse für die kationenaustauschchromatographischen Peptidtrennungen unter Verwendung von 0, 5 und 20% Acetonitril in den SCX-Laufmitteln dargestellt. Die Elution der Peptide (jeweils 100 ng) erfolgte durch einen linearen Natriumchlorid(NaCl)-Gradienten bei einem pH-Wert von 3.0. Bei den Eluenten mit Acetonitril wurde der pH-Wert vor der Zugabe des organischen Lösungsmittels in der rein wässrigen Phase eingestellt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass wir bereits bei 0% Acetonitril die neun Peptide mit einer verhältnismäßig guten Effizienz in sieben Peaks (breiter Peak bei 2.75 min stellt eine Verunreinigung dar) auftrennen können. Nur der letzte Peak bei 10 min eluiert als sehr breiter Peak. Die Erhöhung der Acetonitrilkonzentration auf 5 bzw. 20% führt zu einer allgemeinen Abnahme der Peakhalbwertsbreiten, was besonders bei dem letzten Peak deutlich wird. Bei 20% sind wir sogar in der Lage, alle neun Peptide nahezu basisliniengetreunt aufzulösen. Dieser Einfluss des organischen Modifiers auf die Trennleistung der SCX-Säule zeigt, dass, obwohl die Poly(Ethylstyrol-Divinylbenzol) Partikel noch zusätzlich mit einer hydrophilen Polymerschicht überzogen sind, immer noch sekundäre solvophobe Wechselwirkungen von der stationären Phase

ausgehen, die durch den Einsatz von organischen Laufmittelzusätzen unterdrückt werden können.

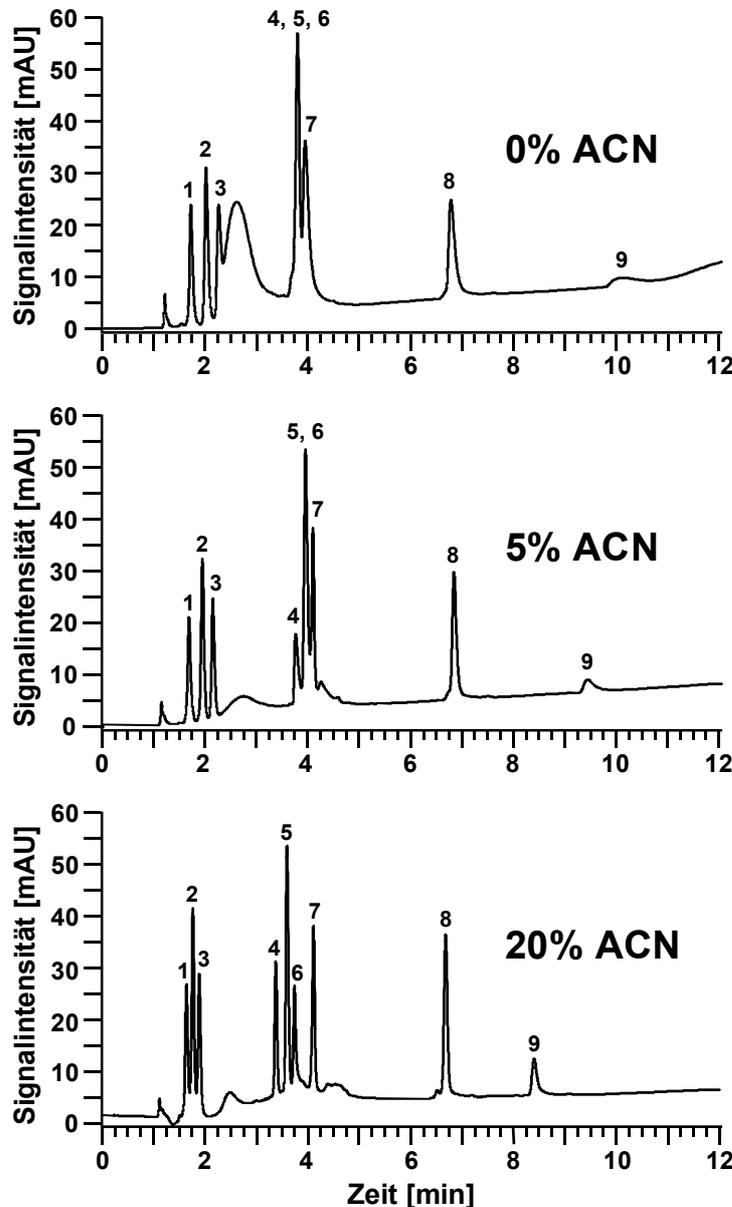


Abbildung 2. Kationenaustauschchromatographie der 9er Peptidmischung (P2693) unter Verwendung von verschiedenen Vol%-Anteilen an Acetonitril in den Eluenten. Säule, ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D.; Mobile Phase, (A) 0.005 M NaH₂PO₄-Puffer in Wasser/Acetonitril 100:0, 95:5, 80:20 (v:v), pH 3.0, (B) 0.5 M NaCl in (A); Flussrate, 1.0 ml/min; Gradient, 0-50% B in 10 min; Temperatur: 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 9er Peptidstandard (P2693), 1. Oxytocin, 2. Methionin-Enkephalin 3. Leucin-Enkephalin, 4. Bradykinin Fragment 1-5, 5. Bombesin, 6. [Arg⁸]-Vasopressin, 7. LHRH, 8. Bradykinin, 9. Substanz P; Injektion, 100 ng.

Die Peakhalbwertsbreiten (w_h) und Retentionszeiten (t_R) der Peptide sind für alle drei Messungen inklusive der Standardabweichung (jeweils drei Wiederholungsmessungen) in Tabelle 1 aufgelistet. Durch Aufstockung der einzelnen Peptidkonzentrationen in der Standardmischung konnten die Peptide den entsprechenden Peaks im UV-Chromatogramm zugeordnet werden (siehe Abbildung 2). Aus der Tabelle 1 wird deutlich, dass sich die Acetonitrilkonzentration, neben der Auftrennung der vier Peaks bei 4 min, besonders auf die Trenneffizienz der SCX-Säule für die letzten beiden Peaks auswirkt. Auch anhand der aufgelisteten Retentionszeiten kann eine Abhängigkeit zum Acetonitrilgehalt in den Eluenten aufgezeigt werden. Während 5% Acetonitril noch wenig Auswirkung auf die Retentionzeiten haben, zeigen 20% Acetonitril in den Eluenten schon eine deutliche Verschiebung der Retentionszeiten hin zu kleineren Werten. Dieser Sachverhalt bestätigt das Vorhandensein von sekundären solvophoben Wechselwirkungen. Die zusätzlich berechneten Standardabweichungen der Retentionszeiten belegen eine gute Reproduzierbarkeit der Gradientenelution für die verwendete Kationenaustauschchromatographie. Dies ist besonders für eine reproduzierbare off-line Fraktionierung wichtig. Mit Abweichungen in den Retentionszeiten von 0.24 bis maximal 2.9 sec wird dies gewährleistet. Weitere SCX-Analysen der Peptidmischung mit bis zu 9 Wiederholungsmessungen bestätigten die hohe Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten sowie die große Trennleistung des analytischen IEX-HPLC-Systems.

Tabelle 1. Mittelwerte der für die SCX-Trennungen erhaltenen Peakhalbwertsbreiten und Retentionszeiten der neun Peptide inklusive der Standardabweichungen (drei Wiederholungsmessungen).

Peptid	w_h [min] \pm SD			t_R [min] \pm SD		
	0% ACN	5% ACN	20% ACN	0% ACN	5% ACN	20% ACN
Oxytocin	0.062 \pm 0.000	0.061 \pm 0.002	0.053 \pm 0.005	1.685 \pm 0.004	1.681 \pm 0.018	1.609 \pm 0.049
Methionin-Enkephalin	0.071 \pm 0.000	0.061 \pm 0.001	0.050 \pm 0.004	1.983 \pm 0.006	1.943 \pm 0.020	1.736 \pm 0.048
Leucin-Enkephalin	0.083 \pm 0.018	0.062 \pm 0.001	0.055 \pm 0.004	2.221 \pm 0.008	2.145 \pm 0.016	1.861 \pm 0.047
Bradykinin Fragment 1-5	/	/	0.047 \pm 0.000	/	/	3.383 \pm 0.004
Bombesin	/	/	0.053 \pm 0.001	/	/	3.600 \pm 0.005
[Arg8]-Vasopressin	/	/	0.051 \pm 0.006	/	/	3.749 \pm 0.007
LHRH	/	/	0.051 \pm 0.002	/	/	4.124 \pm 0.016
Bradykinin	0.121 \pm 0.006	0.086 \pm 0.002	0.071 \pm 0.002	6.745 \pm 0.010	6.812 \pm 0.006	6.685 \pm 0.021
Substanz P	0.492 \pm 0.025	0.222 \pm 0.006	0.103 \pm 0.003	10.062 \pm 0.022	9.388 \pm 0.015	8.410 \pm 0.021

Nach der Elutionsreihenfolge bei der SCX-Trennung kann man die Peaks grob in drei Gruppen aufteilen: Gruppe 1 mit Oxytocin, Methionin-Enkephalin und Leucin-Enkephalin (Elutionsfenster: 1.5 - 2.0 min), Gruppe 2 mit Bradykinin Fragment 1-5, Bombesin, [Arg⁸]-Vasopressin und LHRH (Elutionsfenster: 3.3 - 4.2 min) und Gruppe 3 mit Bradykinin und Substanz P (Elutionsfenster: 6.8 - 10.2 min). Diese Elutionsreihenfolge entspricht in etwa den pI-Werten der Peptide bzw. der Anzahl an funktionellen Gruppen mit basischem Charakter in den Peptiden. Je kleiner der pI-Wert ist bzw. je weniger positive Ladungsträger für die elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Sulfonatgruppen zur Verfügung stehen, desto früher sollte das Peptid bei der Verwendung eines Salzgradienten von der SCX-Säule eluieren. Die neun Peptide sind in Tabelle 2 zusammen mit ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Anzahl an basischen funktionellen Gruppen und ihren theoretischen pI-Werten in der gemessenen Elutionsreihenfolge aufgelistet. Die theoretischen pI-Werte wurden mit Hilfe des Peptid-/Protein-Charakterisierungsalgorithmus PeptideMass, der auf dem ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server vom Schweizer Institut für Bioinformatik zur Verfügung gestellt wird (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>), bestimmt. Innerhalb der drei Elutionsgruppen eluieren jedoch manche Peptide mit höheren pI-Werten vor Peptiden mit kleineren pI-Werten. Verantwortlich hierfür könnten zusätzliche solvophobe Wechselwirkungen oder aber unterschiedliche sterische Zugänglichkeit der positiv geladenen funktionellen Gruppen sein.

Tabelle 2. Aminosäuresequenz, Anzahl an basischen funktionellen Gruppen und theoretische pI-Werte der neun Standardpeptide.

Peptid	Aminosäuresequenz	theoretischer pI-Wert	Anzahl basischer funktionellen Gruppen
Oxytocin	CYIQNCPLG-NH ₂	5,51	1
Methionin-Enkephalin	YGGFM	5,52	1
Leucin-Enkephalin	YGGFL	5,52	1
Bradykinin Fragment 1-5	RPPGF	9,75	2
Bombesin	pEQRLGNQWAVGHLM-NH ₂	6,85	2
[Arg ⁸]-Vasopressin	CYFQNCPRG-NH ₂	8,06	2
LHRH	pEHWSYGLRPG-NH ₂	6,85	2
Bradykinin	RPPGFSPFR	12,00	3
Substanz P	RPKPQQFFGLM	11,00	3

C = Cystine, pE = pyro-Glutaminsäure

Als Beispiel für eine etwas komplexere Probe wurde ein tryptischer Verdau von Serum Albumin chromatographisch mit der ProPac SCX-Säule analysiert. Das Gemisch aus theoretisch 54 tryptischen Peptiden (unter Annahme von vollständigem Verdau, d.h. alle möglichen Spaltstellen sind geschnitten) wird mit einer zufriedenstellenden Effizienz getrennt (siehe Abbildung 3). Auch hier sind grob drei Elutionsbereiche zu erkennen, einen im vorderen Teil des Chromatogramms (Minute: 0-2), einen im mittleren Teil des Chromatogramms (Minute: 3-8) und einen relativ breiten im hinteren Teil des Chromatogramms (Minute: 8-18). Man kann, wie bei der 9er Peptidmischung, davon ausgehen, dass es sich hierbei um Peptide mit jeweils ähnlichen pI-Werten bzw. um Peptide mit jeweils gleicher Anzahl an positiven Ladungsträgern handelt.

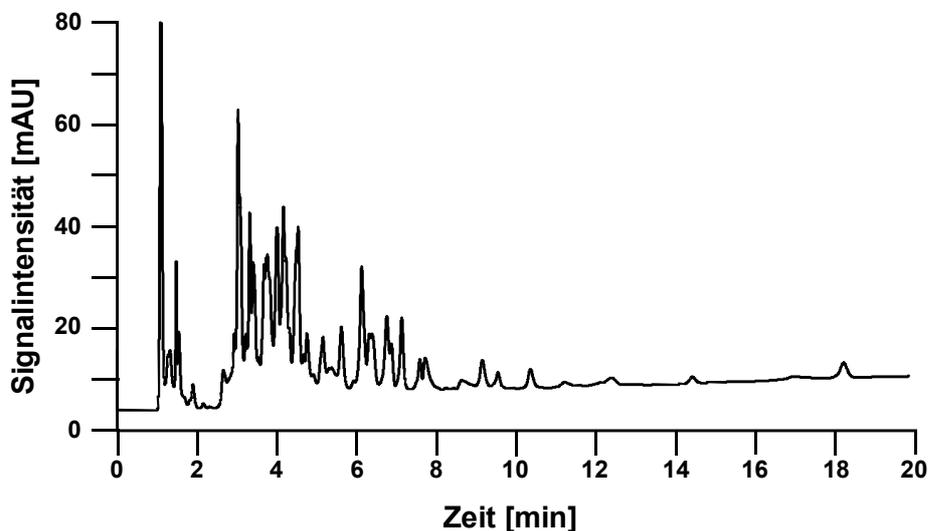


Abbildung 3. SCX-Trennung eines tryptischen Serum Albumin Verdaus mit der ProPac SCX-10 Säule.

Säule, ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D.; Mobile Phase, (A) 0.005 M NaH_2PO_4 -Puffer in Wasser/Acetonitril 80:20 (v:v), pH 3.0, (B) 0.5 M NaCl in (A); Flussrate, 1.0 ml/min; Gradient, 0-100% B in 45 min; Temperatur: 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, tryptischer Serum Albumin (Rind) Verdau; Injektion, 100 pmol.

SCX-Trennung von Proteinen

Um die Trennleistung der SCX-Phase auch für Proteine zu testen, wurde eine einfache Mischung, bestehend aus fünf Proteinen (Trypsinogen, α -Chymotrypsinogen A, Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym), analysiert. Die Trennung in Abbildung 4 zeigt, dass die ProPac SCX-Phase sich auch bei der Analyse von Proteinen durch eine gute Selektivität und Trenneffizienz auszeichnet

(siehe auch Tabelle 3). Dieser Aspekt ist wichtig für Top-Down Proteomanalysen, wo die Proteine zuerst auf intakter Ebene fraktioniert werden. Anhand des erhaltenen Ergebnisses wäre ein Einsatz dieser SCX-Säule auch bei einem solchen multidimensionalen Ansatz denkbar.

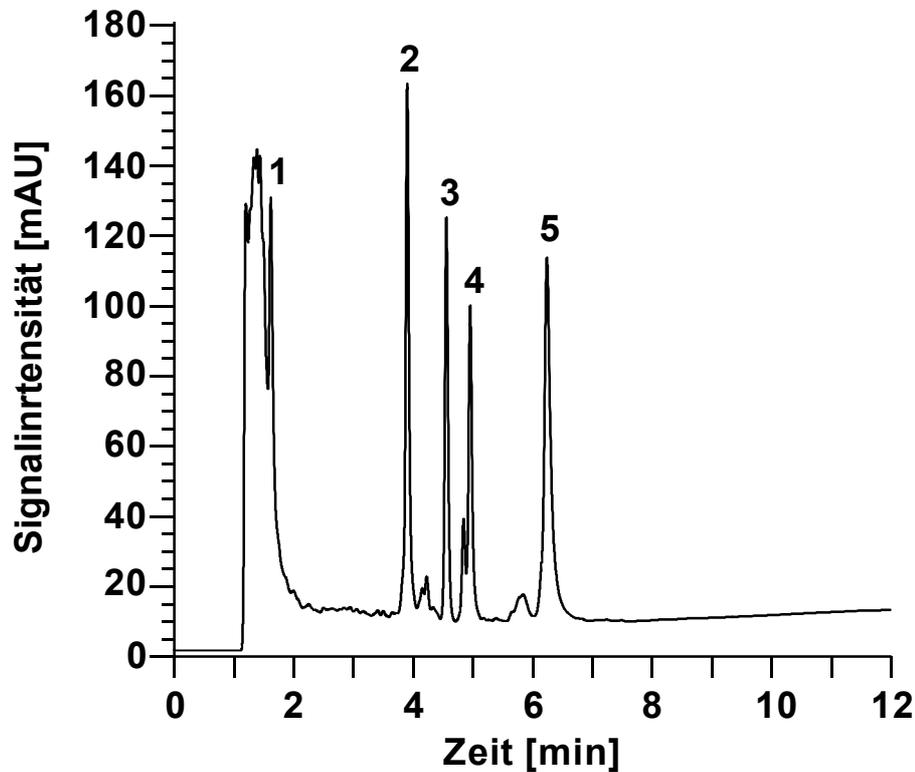


Abbildung 4. Trennung von fünf Proteinen auf der ProPac SCX-10 Kationenaustausch-Phase.

Säule, ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D.; Mobile Phase, (A) 0.05 M wässriger Na_2HPO_4 -Puffer, pH 6.0, (B) 0.5 M NaCl in (A); Flussrate, 1.0 ml/min; Gradient, 0-100% B in 10 min; Temperatur: 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, Mischung aus fünf Proteinen, 1. Trypsinogen (400 $\mu\text{g/ml}$), 2. α -Chymotrypsinogen A (100 $\mu\text{g/ml}$), 3. Ribonuklease A (300 $\mu\text{g/ml}$), 4. Cytochrom C (100 $\mu\text{g/ml}$), 5. Lysozym (100 $\mu\text{g/ml}$); Injektion, 10 μl .

Über die Durchführung von vier Wiederholungsanalysen der 5er Proteinmischung konnte die hohe Reproduzierbarkeit der Gradientenelution für das verwendete SCX-HPLC-System, die schon für Peptide demonstriert werden konnte, auch für Proteine bestätigt werden. Die Retentionszeiten weichen lediglich 0.78 bis 1.9 sec vom berechneten Mittelwert ab (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Mittelwerte mit Standardabweichungen der Peakhalbwertsbreiten und Retentionszeiten der fünf Proteine für die Kationenaustauschchromatographie (vier Wiederholungsmessungen).

Protein	w_h [min] \pm SD	t_R [min]] \pm SD
Trypsinogen	0.073 \pm 0.005	1.636 \pm 0.013
α -Chymotrypsinogen A	0.080 \pm 0.001	5.045 \pm 0.021
Ribonuklease A	0.084 \pm 0.001	6.273 \pm 0.029
Cytochrom C	0.090 \pm 0.000	6.954 \pm 0.031
Lysozym	0.172 \pm 0.005	9.223 \pm 0.015

Die Ergebnisse der SCX-Analysen für die Peptide sowie Proteine, bezüglich der Retentionszeiten und deren Abweichungen, belegen somit, dass das verwendete analytische HPLC-System sich durch eine hohe Flusskonstanz (bei einer Flussrate von 1.0 ml/min) und eine gute Reproduzierbarkeit der Gradientenformierung auszeichnet. Aus diesen Gründen wäre die hier verwendete analytische HPLC-Anlage optimal geeignet für den Einsatz in einem off-line 2D-HPLC-System.

3.1.2 Herstellung und Charakterisierung von SCX-Kapillarsäulen

Die Trenneffizienz der SCX-Kapillarsäulen, welche potentielle Kandidaten für ein multidimensionales System mit on-line Kopplung wären, sollte anhand der gleichen Peptid- und Proteinproben ermittelt und mit den Ergebnissen der analytischen ProPac Säule verglichen werden. Bei den untersuchten SCX-Kapillarsäulen handelte es sich um eine kommerziell erhältliche Säule (Poros 10S), sowie um zwei selbst gepackte Säulen. Die selbst hergestellten SCX-Kapillarsäulen wurden mit der stationären Phase, auf der auch die analytische ProPac SCX-Säule basiert, gepackt und unterschieden sich lediglich in ihrer Länge (60 bzw. 250 mm). Die stationäre Phase der gekauften SCX-Säule (Poros 10S) basiert auf einer Poly(Styrol-Divinylbenzol) Polymerphase mit 10 μ m Teilchendurchmesser und Sulfonatgruppen als Kationenaustauschgruppen. Im Gegensatz zur ProPac Phase, welche auf pellicularen Partikeln beruht, handelt es sich bei dem Poros Material um poröse Partikel mit einer bimodalen Porenverteilung. Diese enthalten neben Diffusionsporen (1000-1500 Å) noch zusätzlich Durchflusssporen (6000-8000 Å), die als durchgängige Kanäle die Partikel durchqueren. Die konvektive Strömung durch die Partikel sorgt

für einen schnellen Massentransfer, was gerade für eine effiziente Trennung von Biomolekülen, die aufgrund ihrer molekularen Größe meist niedrige Diffusionskoeffizienten besitzen, Grundvoraussetzung ist. Ein Vergleich zwischen der Beschaffenheit der pellicularen ProPac Phase und der bimodalen Poros Phase ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

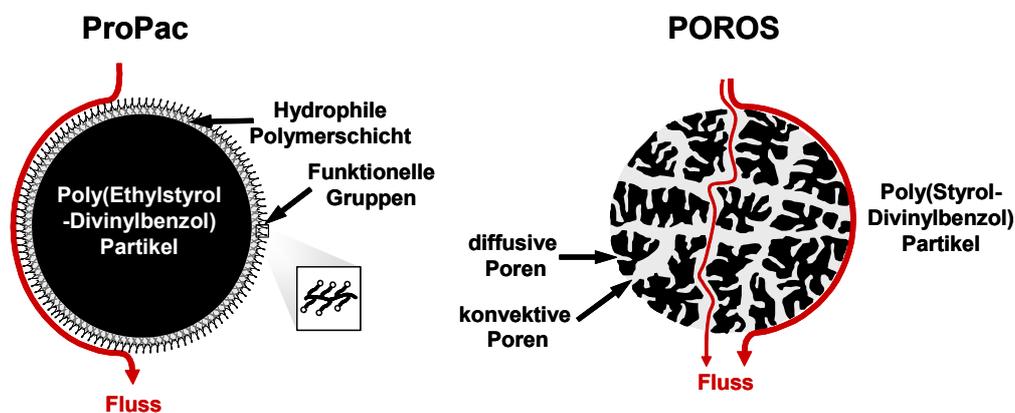


Abbildung 5. Schematische Darstellung der stationären SCX-Phasen ProPac und Poros.

Qualität der Säulenpackung

Bevor die selbst gepackten Kapillarsäulen für Peptid- und Protein-Analysen verwendet wurden, wurde die Güte der Packung bzw. der Packungsdichte über die totale Porosität ϵ_T der Säulen bestimmt. Da es sich bei der ProPac-Phase um unporöse Teilchen handelt, setzt sich die totale Porosität in diesem Fall nur aus dem Zwischenkornvolumen zusammen. Somit kann über die Bestimmung der totalen Porosität direkt eine Aussage über die Teilchendichte in der Säule getroffen werden. Zur Bestimmung der totalen Porosität wurde das Volumen der mobilen Phase in der Säule über die Durchflusszeit t_M einer Inertsubstanz, die keine Retention an SCX-Phasen aufweist, ermittelt. Als Inertprobe injizierten wir 0.5 μ l schweres Wasser (D_2O), welches anschließend im UV-Spektrometer über eine Änderung des Brechungsindex des verwendeten Eluenten detektiert werden konnte. Die mobile Phase entsprach dem für die Peptidtrennung üblicherweise verwendeten 0.005 M NaH_2PO_4 -Puffer gelöst in 95:5 Wasser/Acetonitril (v:v) mit pH 3.0. Für jede Säule wurde die Durchflusszeit mit jeweils sechs Wiederholungsmessungen bestimmt. Mit der ermittelten Durchflusszeit der Inertsubstanz konnte über die eingestellte Flussrate (2.5 μ l/min) das Volumen der mobilen Phase in der Säule berechnet werden. Bei der Berechnung wurde zusätzlich noch das Volumen der Zu- und

Ableitungen berücksichtigt, d.h. vom ermittelten Volumen der mobilen Phase abgezogen. Die Division durch das Leersäulenvolumen ergab schließlich die totale Porosität der Säule. Um einen Anhaltspunkt für die totale Porosität zu bekommen, ermittelten wir ebenfalls das Volumen der mobilen Phase in der analytischen ProPac SCX-Säule durch Bestimmung der Durchflusszeit von schwerem Wasser (Injektionsvolumen: 20 µl, Flussrate: 1 ml/min). Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4. Ermittelte totale Porosität der verwendeten SCX-Säulen.

Säule	ϵ_T
60 x 0.2 mm I.D.	0.50
250 x 0.2 mm I.D.	0.37
250 x 4.0 mm I.D.	0.37

Die Werte zeigen, dass für die 250 mm Kapillarsäule die gleiche totale Porosität erhalten wird, wie für die analytische Säule. Diese liegen auch ungefähr in dem Bereich, der in der Literatur für unporöse stationäre Phasen angegeben wird (ϵ_T (unporöse Partikel): 0.38; ϵ_T (poröse Partikel): 0.80^[24]). Lediglich bei der kürzeren 60-mm Kapillarsäule liegt eine größere totale Porosität vor. Da es sich bei dem Säulenmaterial um unporöse Partikel handelt, ist dies ein Hinweis darauf, dass in dieser Säule das Zwischenkornvolumen größer ist. Als Gründe für die geringere Packungsdichte gegenüber der 250 mm Kapillarsäule können der bei der Packprozedur um 100 bar niedrigere Druck sowie die kürzere Packungsdauer angeführt werden.

Trennleistung der gepackten Kapillarsäulen für Peptide und Proteine

Da der prozentuale Anteil an stationärer Phase für die 250 mm Kapillarsäule und die analytische Säule gleich ist, kann man davon ausgehen, dass zumindest die 250 mm Kapillarsäule optimal gepackt ist. Aufgrund der kleinen Innendurchmesser sind die Mikro-Säulen bzw. deren Trennleistungen im Vergleich zu den konventionellen Säulen jedoch extrem empfindlich gegenüber kleinsten Inhomogenitäten in der Säulenpackung. Aus diesem Grund wurden die Trennleistungen der selbst hergestellten Kapillarsäulen getestet und mit einer kommerziellen SCX-Kapillarsäule

und der analytischen ProPac-Säule verglichen. In Kapitel 3.1.1 konnten wir bereits zeigen, dass sich die analytische ProPac SCX-Säule bei Peptid- und Proteintrennungen durch eine hohe Selektivität und Trenneffizienz auszeichnet. Abbildung 6 zeigt die SCX-Trennungen der 9er Peptidmischung und der 5er Proteinmischung, die für beide SCX-Säulen erhalten wurden.

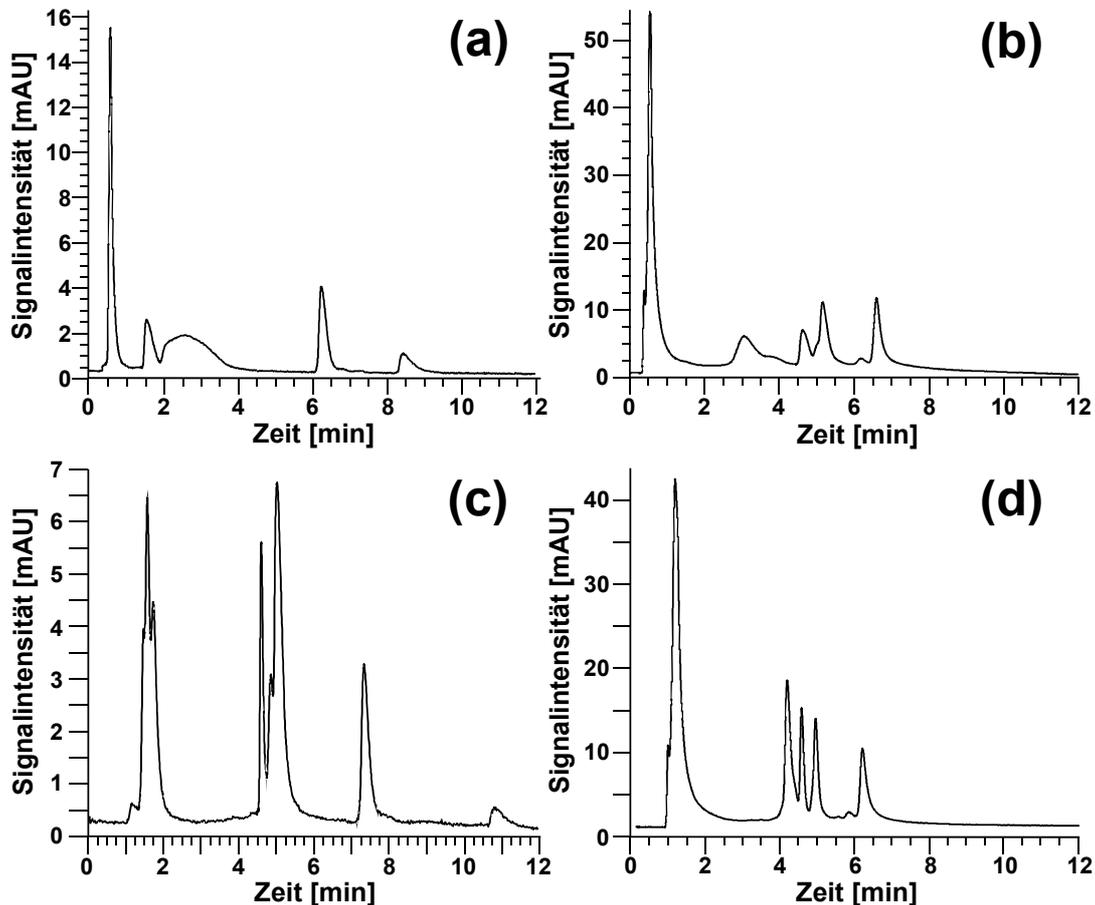


Abbildung 6. SCX-Trennung der 9er Peptidmischung (P2693) und der 5er Proteinmischung unter Verwendung der selbst gepackten Kapillarsäulen.

(a) Säule, ProPac SCX-10, 60 x 0.20 mm I.D.; Mobile Phase, (A) 0.005 M NaH_2PO_4 -Puffer in Wasser/Acetonitril 95:5 (v:v), pH 3.0, (B) 0.5 M NaCl in (A); Flussrate, 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$; Gradient, 0-50% B in 10 min; Temperatur: 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 9er Peptidstandard (P2693); Injektion, 5 ng.

(b) Säule, ProPac SCX-10, 60 x 0.20 mm I.D.; Mobile Phase, (A) 0.05 M wässriger Na_2HPO_4 -Puffer, pH 6.0, (B) 0.5 M NaCl in (A); Flussrate, 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$; Gradient, 0-100% B in 10 min; Temperatur: 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 5er Proteinmischung, Zusammensetzung siehe Abbildung 4, Injektion, 0.5 μl .

(c) Säule, ProPac SCX-10, 250 x 0.20 mm I.D. ; restliche Bedingungen wie in (a).

(d) Säule, ProPac SCX-10, 250 x 0.20 mm I.D. ; restliche Bedingungen wie in (b).

Das Chromatogramm in Abbildung 6 (a) lässt erkennen, dass die Peptide mit Ausnahme von Bradykinin und Substanz P nur wenig an der stationären Phase retardieren und nahezu direkt nach dem Injektionspeak eluieren. Auch die Peakhalbwertsbreiten und die Auflösung der Peaks lassen zu Wünschen übrig und sind in keiner Weise mit der Peptidtrennung der analytischen ProPac-Säule vergleichbar (Abbildung 2). Des Weiteren zeigten Wiederholungsmessungen, dass die Retentionszeiten der Peaks nicht reproduzierbar waren. Die gleichen Ergebnisse bezüglich der Auflösung und Trenneffizienz erhielt man für die Proteintrennung (Abbildung 6 (b)). Verantwortlich für die schlechte Performance der 60-mm SCX-Kapillarsäule könnte die geringe Packungsdichte der stationären Phase sein.

Die 250 mm SCX-Kapillarsäule liefert hingegen sowohl für die Peptid- als auch für die Proteintrennung ein annähernd gleiches Elutionsmuster (Abbildung 6 (c), (d)), wie die analytische SCX-Säule (Abbildung 2 bzw. Abbildung 4). Die Trenneffizienz der analytischen SCX-Säule konnte jedoch nicht erreicht werden, was exemplarisch an der Peakhalbwertsbreite für Bradykinin gezeigt werden kann. Diese liegt für die Kapillarsäule bei 0.20 min und für die konventionelle Säule bei 0.08 min. Also ist auch hier noch eine Optimierung bei der Packprozedur vonnöten. Vergleicht man jedoch die Performance der 250-mm ProPac SCX-Kapillarsäule mit einer kommerziell erhältlichen SCX-Kapillarsäule (Poros 10S, 100 x 0.30 mm I.D.), so erkennt man, dass diese ebenfalls nicht besser ist. In Abbildung 7 ist eine chromatographische Trennung des 9er Peptidstandards unter Verwendung der Poros-Kapillarsäule gezeigt. Hier ist ein ähnliches Elutionsmuster zu erkennen wie bei den SCX-Analysen mit der ProPac Säule. Das erhaltene UV-Chromatogramm weist zwei basisliniengetrennte Signale im vorderen Elutionsbereich, vier nahezu aufgetrennte Signale im mittleren und zwei sehr breite basisliniengetrennte Signale im hinteren Elutionsbereich auf. Zwei Peptide der Mischung koeluieren bei dieser SCX-Trennung. Man kann davon ausgehen, dass es sich hierbei um einen der ersten beiden Peaks im Chromatogramm handelt, die aller Wahrscheinlichkeit nach die Peptide Oxytocin, Methionin-Enkephalin sowie Leucin-Enkephalin repräsentieren. Trotz der relativ guten Selektivität der bimodalen Poros-Phase ist die Trenneffizienz dieser SCX-Kapillarsäule nicht mit der zu vergleichen, die mit der analytischen ProPac-Säule erreicht werden kann. Somit verdeutlichen diese Ergebnisse, dass man mit Hilfe der analytischen SCX-Säule, Peptide wie Proteine wesentlich effizienter auftrennen kann als mit den gepackten SCX-Kapillarsäulen.

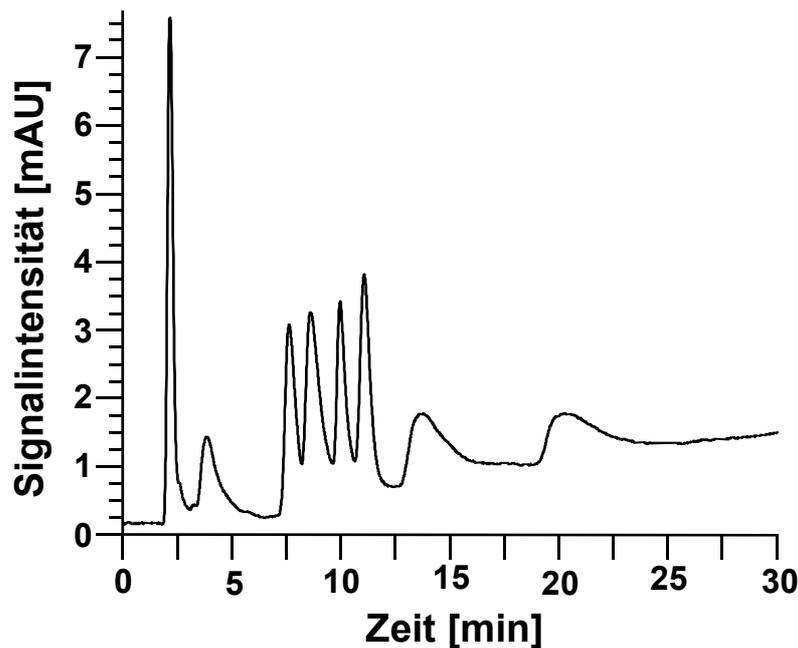


Abbildung 7. Kationenaustauschchromatographische Trennung der 9er Peptidmischung (P2693) unter Verwendung der Poros 10S SCX-Kapillarsäule. Säule, Poros 10S, 100 x 0.30 mm I.D.; Mobile Phase, (A) 0.010 M NaH_2PO_4 -Puffer in Wasser/Acetonitril 95:5 (v:v), pH 3.0, (B) 1.0 M NaCl in (A); Flussrate, 6.0 $\mu\text{l}/\text{min}$; Gradient, 0-35% B in 30 min; Temperatur: 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 9er Peptidstandard (P2693); Injektion, 10 ng.

3.1.3 Charakterisierung der Mikro-HPLC Anlagen

Für die Mikro-HPLC, die in der 2. Dimension mit monolithischen Kapillarsäulen eingesetzt werden sollte, standen zwei Anlagen der Firma LCPackings - A Dionex Company (Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung:

1) UltiMate Capillary/Nano LC System ausgestattet mit einer Mikro-Niederdruck-Gradienten-Pumpe und passivem Flusssplit-System, Säulenofen, UV-Detektor und Helium-Entgasungsmodul (Modell UltiMate), Säulenschaltmodul mit zwei 10-Wege Ventilen und Beladungspumpe (Modell Switchos) und Mikro-Autosampler (Modell Famos).

2) UltiMate 3000 Capillary/Nano LC System ausgestattet mit zwei Mikro-Niederdruck-Gradienten-Pumpen und elektronischem Feedback Flussplit-System (Modell LPG-3600), Säulenofen mit zwei integrierten 10-Wege Ventilen (Modell FLM-3100), UV-Detektor (Modell UVD 3000), Mikro-Autosampller (Modell WPS-3000) und Vakuum Entgaser (Modell SRD-3600).

Während das unter 1) aufgeführte Modell noch eine Mikro-HPLC Anlage der 1. Generation mit passivem Splitsystem repräsentiert (siehe Kapitel II, 2.3.3), handelt es sich bei der zweiten HPLC-Anlage um ein Gerät der neueren Generation, welches bereits ein elektronisch reguliertes Splitsystem verwendet. Dieses Splitsystem basiert auf einem völlig neuartigen Konzept. Elektronisch regulierte Splitanordnungen mit Flusssensor, der Änderungen in der Säulenpermeabilität registriert, und variablem Restriktor, der diese gegebenenfalls kompensiert (siehe Kapitel II, 2.3.3), sind patentrechtlich von der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) geschützt. Um dieses Patentrecht nicht zu verletzen entwickelte die Firma LCPackings - A Dionex Company ein Splitsystem für Mikro-HPLC-Systeme, welches beruhend auf einem neuem Prinzip die Konstanz des Splitverhältnisses gewährleistet. Die Funktionsweise dieses Splitsystems ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

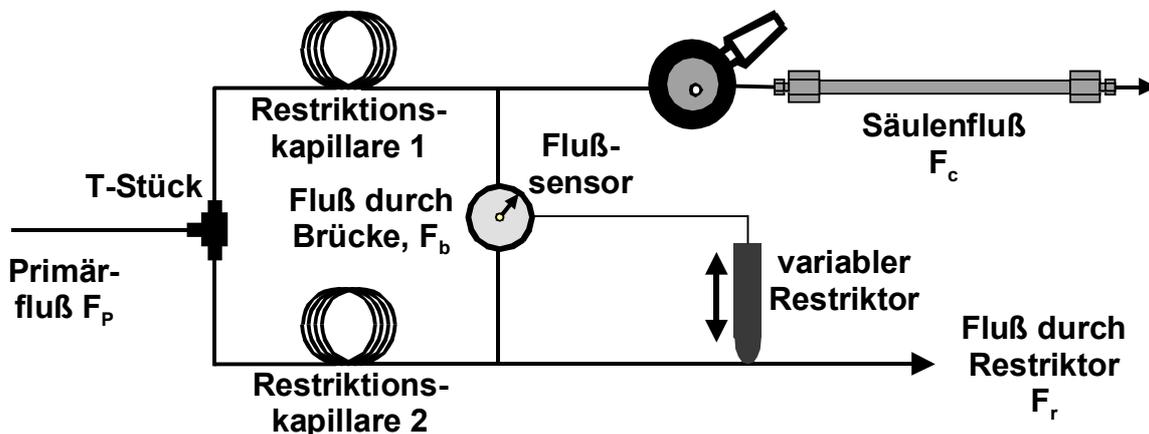


Abbildung 8. Elektronisch reguliertes Splitsystem mit Flussbrücke (LCPackings - A Dionex Company Amsterdam, Niederlande).

Bei diesem System werden Änderungen in der Säulenpermeabilität durch die Flussrate über eine Flussbrücke registriert und über einen variablen Restriktor, welcher theoretisch die gleiche Permeabilität wie die Säule aufweisen soll, kompensiert. Sind die Permeabilitäten von Restriktor und Säule gleich, so ist kein

Fluss über die Brücke zu registrieren (ähnlich zur Wheatstoneschen Messbrücke). Das Splitverhältnis des Systems ist durch die beiden Restriktionskapillaren 1 und 2 vorgegeben und kann somit auch über diese variiert werden.

Um die Performance der Mikro-HPLC-Anlagen, welche wesentlich anfälliger als konventionelle HPLC-Anlagen sind, abschätzen und vergleichen zu können, wurden mit diesen verschiedene Tests durchgeführt, die Aussagen über die Reproduzierbarkeit sowie Linearität des Injektionsvolumen, die Verschleppung von Probe zwischen aufeinander folgenden Injektionen, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Gradientenerzeugung, die Flusskonstanz bei Flussraten im $\mu\text{l}/\text{min}$ -Bereich, die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten unter Verwendung von monolithischen Säulen und die Flussregulierung mittels aktivem Flusssplit-System (nur bei UltiMate 3000) zuließen. Da es sich bei dem UltiMate 3000 System um eine beta-Version handelte, die im Rahmen einer Kooperation mit LCPackings – A Dionex Company in unserem Labor getestet werden sollte, wurden alle Experimente nach einer Vorschrift von LCPackings – A Dionex Company durchgeführt. Diese beta-Tests für das UltiMate 3000 System wurden anschließend für das ältere UltiMate System (Vorgängermodell) adaptiert. Beim Vergleich der Performance der beiden HPLC-Systeme ist zu berücksichtigen, dass das Modell der 1. Generation, im Gegensatz zum UltiMate 3000 System, schon über einen längeren Zeitraum in unserem Arbeitskreis verwendet wurde. Trotz regelmäßiger Wartung kann man davon ausgehen, dass diese HPLC-Anlage nicht die gleiche Performance wie ein fabrikneues System liefert.

Reproduzierbarkeit des Injektionsvolumens

Die Reproduzierbarkeit des Injektionsvolumens wurde durch acht Wiederholungsinjektionen von je 10 ng Koffein überprüft. Von den mittels UV-Detektion erhaltenen Peakflächen wurden die relativen Standardabweichungen berechnet und miteinander verglichen. Bei diesem Versuch wurde keine Säule verwendet, sondern nur eine Restriktionskapillare, die einen gewissen Druckabfall zur Gewährleistung einer konstanten Flussrate erzeugen sollte. Des Weiteren galten folgende Messbedingungen:

Säule: Restriktionskapillare (3.2 m x 30 μm I.D.)
Eluent: Wasser + 0.1 Vol% Trifluoressigsäure

Elutionsmodus:	isokratisch
Flussrate:	4.0 µl/min
Probenschleife:	1.0 µl
Injektionsmodus:	full Loop (1.0 µl) bzw. partial Loop (0.5 µl)
Probe:	10 µg/ml bzw. 20 µg/ml Koffeinlösung in Wasser
Säulenofentemperatur:	40°C
Autosamplertemperatur:	5°C
Detektion:	UV bei 272 nm mit 45 nl Detektorzelle

Die erhaltenen Werte für die relativen Standardabweichungen der Peakflächen in Tabelle 5 zeigen deutlich, dass das neuere Autosamplermodeill WPS-3000 für beide Injektionsmodi die präzisere Reproduzierbarkeit der Injektionsvolumina liefert. Des Weiteren ist zu erkennen, dass der Injektionsmodus bei dem die Probenschleife komplett gefüllt wird für beide Geräte die höchste Reproduzierbarkeit aufweist. Der Vorteil wenn die Probenschleife nur teilweise befüllt wird (partial Loop) ist die bessere Genauigkeit des Injektionsvolumen, da dieses dann von der Genauigkeit der Injektionsspritze und nicht von der Genauigkeit der Probenschleife, die im allgemeinen geringer ist, abhängt. Die relativ hohen Abweichungen bei den Injektionen mit dem Famos Autosampller sind besonders zu berücksichtigen bei quantitativen Fragestellungen. In diesem Fall könnte eine Verbesserung der Injektionsreproduzierbarkeit, durch eine Verringerung der Geschwindigkeit mit der die Injektionsspritze die Probe aufsaugt, erreicht werden. Da das Minimum der Ansauggeschwindigkeit für den Famos Autosampller bei 52.2 nl/s für eine 25 µl Injektionsspritze liegt (max. Geschw. 1563.3 nl/s) und die eingestellte Geschwindigkeit für den Versuch schon bei 156.5 nl/s lag, kann das Aufziehen der Probe jedoch nur noch um einen Faktor von drei verlangsamt werden. Bei den Versuchen mit dem UltiMate 3000 System, welches Ansauggeschwindigkeiten von 10.0 – 8000 nl/s erlaubt, wurde die Probe mit 60 nl/s in die Schleife überführt. Somit kann der Unterschied in den Standardabweichungen der Peakflächen zwischen dem Famos und dem WPS-3000 Autosampller zum Teil auch über die unterschiedlichen Ansauggeschwindigkeiten erklärt werden. Da der Famos Autosampller nicht speziell für die Versuche gewartet wurde, können die Abweichungen der Reproduzierbarkeit des Injektionsvolumens auch auf eine Abnutzung der Injektionsspritze, genauer gesagt der Stempeldichtung in der Spritze, zurückgeführt werden. Aus diesem Grund

kann man davon ausgehen, dass ein Austausch der Injektionsspritze zu einer Steigerung der Genauigkeit des Injektionsvolumens führen würde.

Tabelle 5. Relative Standardabweichung der Peakflächen resultierend aus jeweils acht Injektionen von 10 ng Koffein ermittelt für die Injektionsmodi partial Loop und full Loop an den Mikro-Autosamplern Famos und WPS-3000.

Injektionsmethode	Famos RSD [%]	WPS 3000 RSD [%]
partial Loop	2.239	0.460
full Loop	1.971	0.213

Linearität des Injektionsvolumens

Die Linearität des Injektionsvolumens wurde durch Injektion von verschiedenen Mengen an Koffein ermittelt. Die mittels UV detektierten Peakflächen wurden anschließend gegen das entsprechende Injektionsvolumen aufgetragen. Anhand der resultierenden Kalibriergeraden bzw. der Korrelationskoeffizienten konnten Aussagen über die Linearität der Injektion getroffen werden. Von einer wässrigen Koffeidlösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml wurden jeweils dreimal 25, 50, 100, 200, 300, 400 und 500 nl injiziert. Ansonsten wurden die Experimente unter den gleichen Bedingungen wie für die Reproduzierbarkeitstests des Injektionsvolumens durchgeführt.

Die erhaltenen Regressionsgeraden (Abbildung 9) weisen eine hohe Linearität für beide Autosampler auf, wobei auch hier der Autosampler Famos im Vergleich etwas schlechter abschneidet, was durch einen Vergleich der Korrelationskoeffizienten ersichtlich wird (Famos: $R = 0.99915$; WPS-3000: $R = 0.99991$).

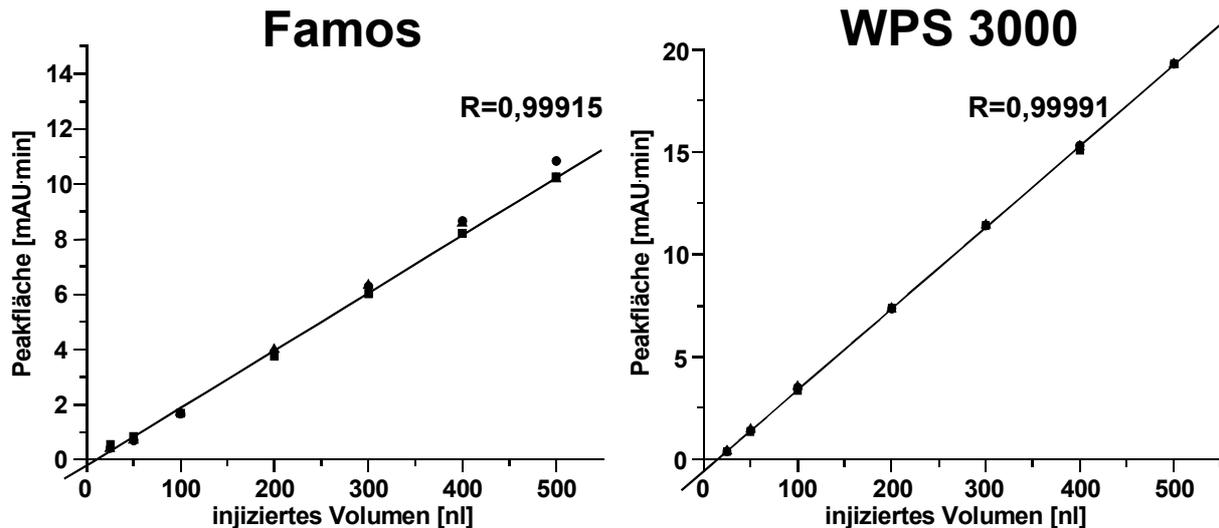


Abbildung 9. Regressionsgeraden zur Ermittlung der Injektionslinearität von Famos und WPS-3000 erhalten aus den Peakflächen und Injektionsvolumina.

Verschleppung von Probe

Um die Verschleppung von Probe bei aufeinander folgenden Injektionen abschätzen zu können, wurden drei Blindproben (Wasser + 0.1 Vol% Ameisensäure) nach Injektion einer konzentrierten wässrigen Koffeinelösung (1000 ng) gemessen. Mit Hilfe eines 10 µg/ml Koffeinstandards konnte nachträglich die Verschleppung über Ein-Punkt-Kalibrierung ausgewertet werden. Die Peakfläche der konzentrierten Koffeinelösung konnte dafür nicht verwendet werden, da das erhaltene Signal den Linearitätsbereich des Detektors überschritt. Die weiteren Bedingungen der Messungen entsprachen denen, wie sie bereits für die Reproduzierbarkeitstests des Injektionsvolumens verwendet wurden. Die Analysen wurden jeweils dreimal durchgeführt.

Auch hier wird deutlich, dass das Modell WPS-3000 im Vergleich zum Modell Famos besser abschneidet (Tabelle 6). Allerdings ist auch zu erkennen, dass die Verschleppung beim WPS-3000 über die drei Wiederholungsversuche von 0.64% bis zu 2.21% hin für die jeweils erste Blindprobe ansteigt. Im Gegensatz zum Famos nimmt die Verschleppung jedoch nach der jeweils zweiten und dritten Blindprobe deutlich ab und ist nur noch minimal (0.58 - 0.21%). Die Koffeinverschleppung beim Famos liegt im Mittel bei 2.32% für die erste Blindprobe und nimmt über die nachfolgenden Injektionen nur minimal ab. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass nach der Analyse von hochkonzentrierten Proben immer eine Blindprobe zur Kontrolle des Systems erfolgen sollte. Auf der anderen Seite sind die erhaltenen

Ergebnisse nicht zu kritisch zu betrachten, da eine so hohe Probenmenge, wie sie für diesen Versuch eingesetzt wurde (1000 ng Koffein), in der Regel nicht den verwendeten und zur Verfügung stehenden Probenmengen in der Mikro-HPLC entspricht.

Tabelle 6. Prozentuale Verschleppung von Koffein über drei aufeinander folgende Blindproben.

Blindprobe	Famos Verschleppung [%]	WPS 3000 Verschleppung [%]
1.1	2.09	0.64
1.2	1.84	0.58
1.3	1.97	0.21
2.1	2.01	1.52
2.2	2.02	0.32
2.3	1.93	0.33
3.1	2.87	2.21
3.2	1.78	0.29
3.3	1.84	0.23

Flusskonstanz bei Flussraten im $\mu\text{l}/\text{min}$ -Bereich

Nach den Autosamplern wurden die Pumpeneinheiten der zur Verfügung stehenden Mikro-Anlagen getestet. Um die Konstanz des von den Pumpen generierten Flusses zu überprüfen, wurde eine Mischung von fünf polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) isokratisch auf einer C18-Phase getrennt. Anschließend wurde die Reproduzierbarkeit der entsprechenden Retentionszeiten von zehn Wiederholungsmessungen überprüft. Zusätzlich zu den fünf PAKs enthielt die Probe noch Uracil, welches in der Umkehrphasenchromatographie häufig als Inertsubstanz dient und somit Aussagen über die Durchflusszeit zulässt. Die genauen Versuchsbedingungen waren die folgenden:

Säule: Kapillarsäule (150 x 0.30 mm I.D.)
Stationäre Phase: Pepmap C18, 3 μm , 100 Å
Eluent: Wasser/Acetonitril 30:70 (v/v)
Elutionsmodus: isokratisch
Flussrate: 3.0 $\mu\text{l}/\text{min}$

Probenschleife: 1.0 μl
 Injektionsmodus: partial Loop (0.1 μl)
 Probe: PAK-Mischung bestehend aus, Naphthalin (63.2 $\mu\text{g/ml}$), Biphenyl (50.6 $\mu\text{g/ml}$), Anthracen (40.0 $\mu\text{g/ml}$), Fluoren (9.0 $\mu\text{g/ml}$), Fluoranthen (20.4 $\mu\text{g/ml}$) und der Inertsubstanz Uracil (4.7 $\mu\text{g/ml}$) gelöst in Wasser/Acetonitril 30:70 (v/v)
 Säulenofentemperatur: 40°C
 Autosamplertemperatur: 5°C
 Detektion: UV bei 254 nm mit 45 nl Detektorzelle

In Abbildung 10 ist exemplarisch eine umkehrphasenchromatographische Trennung der fünf PAKs und Uracil dargestellt. Da alle Analyten basisliniengetrennt sind, können die genauen Retentionszeiten für alle sechs Analyten ohne Schwierigkeiten ermittelt werden.

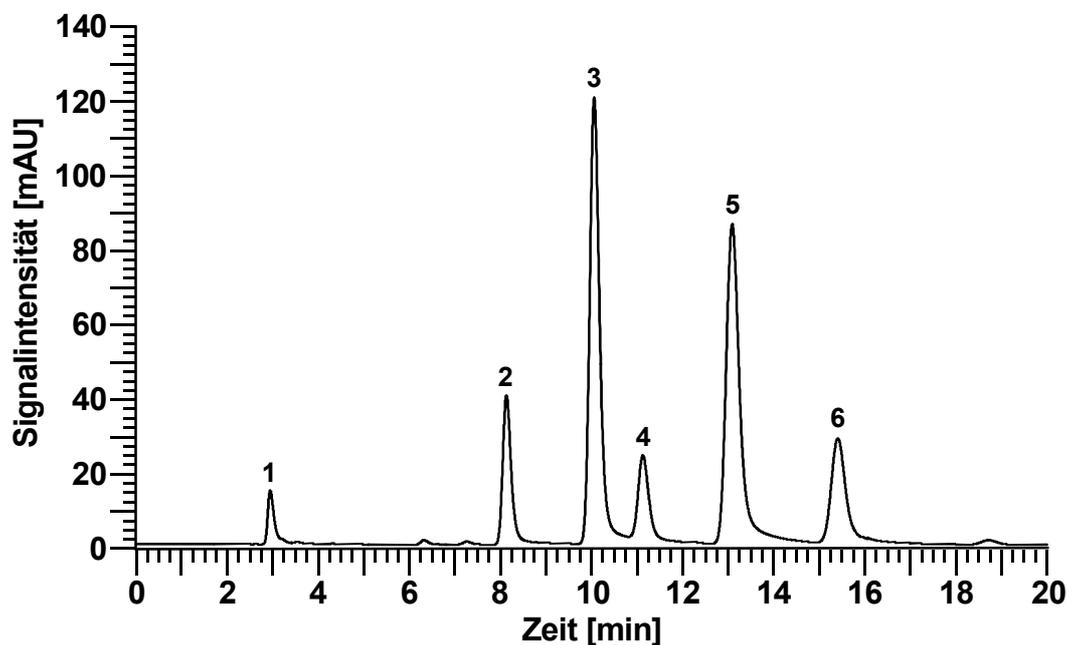


Abbildung 10. UV-Chromatogramm einer Umkehrphasen-Trennung von Uracil (1), Naphthalin (2), Fluoren (3), Biphenyl (4), Anthracen (5) und Fluoranthen (6) gemessen am UltiMate 3000 System.

Die Standardabweichungen der Retentionszeiten, berechnet aus insgesamt zehn Messungen, sind in Tabelle 7 aufgelistet. Für das UltiMate System schwanken die

Werte um 0.06 min. Hier konnte man jedoch anhand der einzelnen Messungen erkennen, dass sich nach der fünften Messung die Retentionszeiten aller Analyten hin zu höheren Werten verschoben hatten. Ein Grund hierfür könnte in einer Abnahme der Permeabilität der Trennsäule, z.B. hervorgerufen durch leichtes verstopfen, liegen, was aufgrund des passiven Flusssplit-Systems mit einer Abnahme des Flusses über die Säule einhergeht. Dieses Problem stellt sich bei dem UltiMate 3000 System nicht, da hier auch die Änderungen in der Permeabilität der Säule über das elektronische Feedback Splitsystem nachreguliert werden und somit das gewünschte Splitverhältnis immer erhalten bleibt. Betrachtet man nun die Retentionszeiten der ersten fünf Messungen und der letzten fünf Messungen getrennt voneinander, so erkennt man, dass die Abweichungen innerhalb der beiden Gruppen wesentlich geringer sind und zwischen 0.0059 - 0.025 min liegen (Tabelle 8). Diese Werte liegen ungefähr in dem Bereich, der auch mit der Pumpeneinheit LPG-3600 vom UltiMate 3000 System erhalten wird, wobei diese jedoch im Mittel immer noch um die Hälfte niedriger sind (gemittelte SD: UltiMate, 0.015 bzw. 0.016 min; UltiMate 3000, 0.0072 min).

Anhand dieser Ergebnisse wird der Vorteil eines Flusssplit-Systems deutlich, das direkt auf Druckänderungen reagieren kann (siehe auch Theoretischer Teil, Kapitel II, 2.3.3) und somit das Splitverhältnis durchgehend konstant hält. Bei Pumpeneinheiten, die ein passives Splitsystem verwenden, ist ein regelmäßiges kontrollieren der Druckverhältnisse und der Flussrate unerlässlich.

Tabelle 7. Standardabweichung der Retentionszeiten unter isokratischen Bedingungen ermittelt für das UltiMate und UltiMate 3000 System anhand von zehn Wiederholungsmessungen.

	Ultimate SD [min]	LPG 3600 SD [min]
Peak 1	0.017	0.0057
Peak 2	0.051	0.0067
Peak 3	0.065	0.0072
Peak 4	0.072	0.0076
Peak 5	0.088	0.0079
Peak 6	0.11	0.0081

Tabelle 8. Standardabweichung der Retentionszeiten unter isokratischen Bedingungen ermittelt für das Ultimate System anhand der ersten fünf und letzten fünf Wiederholungsmessungen.

	Ultimate	
	Messung 1-5 SD [min]	Messung 6-10 SD [min]
Peak 1	0.0080	0.0059
Peak 2	0.011	0.012
Peak 3	0.013	0.018
Peak 4	0.014	0.018
Peak 5	0.020	0.019
Peak 6	0.025	0.022

Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Gradientenbildung

Ein weiterer Test, dem die Pumpenmodule unterzogen wurden, sollte ermitteln, wie genau und reproduzierbar die Eluenten bei der Gradientenbildung abgemischt werden. Hierzu wurde ein fünfstufiger Gradient programmiert, wobei 0.1 Vol% TFA in Wasser (Eluent A) mit 0.1 Vol% TFA plus 0.2 Vol% Aceton in Wasser (Eluent B) gemischt wurden. Der Verlauf des Stufengradienten war wie folgt: 0-25 min 0% B, 25-50 min 10% B, 50-75 min 50% B, 75-100 min 90% B, 100-125 min 100% B und 125-185 min 0% B. Der steigende Gehalt an Aceton wurde bei 265 nm mit einem UV-Detektor aufgezeichnet. Die weiteren Bedingungen für diesen Test entsprachen denen vom Versuch zur Reproduzierbarkeit des Injektionsvolumens.

Abbildung 11 zeigt die für jedes Gerät gemessenen Stufengradienten. Eine hohe Genauigkeit bei der Eluentenabmischung kann anhand der Gesamterscheinungsform der Stufengradienten für beide Pumpenmodule bewiesen werden. Kleine Abweichungen sind für die Pumpe LPG-3600 bei 10% Eluent B zu erkennen. Hier zeigen sich beim ersten Plateau gewisse Schwankungen. Besonders die erste Stufengradientenmessung zeigt nach Erreichen eines konstanten Wertes bei 10% B innerhalb von wenigen Minuten einen relativ starken Einbruch. Dieses Phänomen könnte mit den in der Pumpe verwendeten Zuleitungsschläuchen für die Eluenten zusammenhängen. An diesen Plastikschläuchen könnte das zur Detektion eingesetzte Aceton teilweise adsorbieren, was zu einer Konzentrationsabnahme führen würde. Da die Zuleitungen direkt vor dem Schaltventil aus Edelstahl sind und somit relativ inert, könnte somit auch das zwischenzeitliche Erreichen des Plateaus

erklärt werden. Bei den darauf folgenden Messungen ist der Intensitätseinbruch nicht mehr so deutlich, da die Oberfläche der Plastikschläuche bereits „abgesättigt“ ist. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass das Aceton in den semi-permeablen Schläuchen im Entgaser teilweise verdampft und abgeführt wird. Der stärkere Einbruch des UV-Signals bei der ersten Messung kann hierbei mit der längeren Standzeit des Eluenten in den Entgaserschläuchen begründet werden. Somit scheint aller Wahrscheinlichkeit nach dieses Phänomen nicht direkt mit der Gradientenerzeugung korreliert zu sein.

Die Reproduzierbarkeit der Eluentenmischung wurde durch Vergleich von je fünf Wiederholungsmessungen anhand der vier Plateaus bei 10, 50, 90 und 100% überprüft. Die Standardabweichungen der Signalintensitäten sind in Tabelle 9 aufgelistet. Im Vergleich der Geräte untereinander schneidet das neuere Modell auch hier wieder besser ab, was deutlich wird an den um Faktor 2-3 niedrigeren Standardabweichungen.

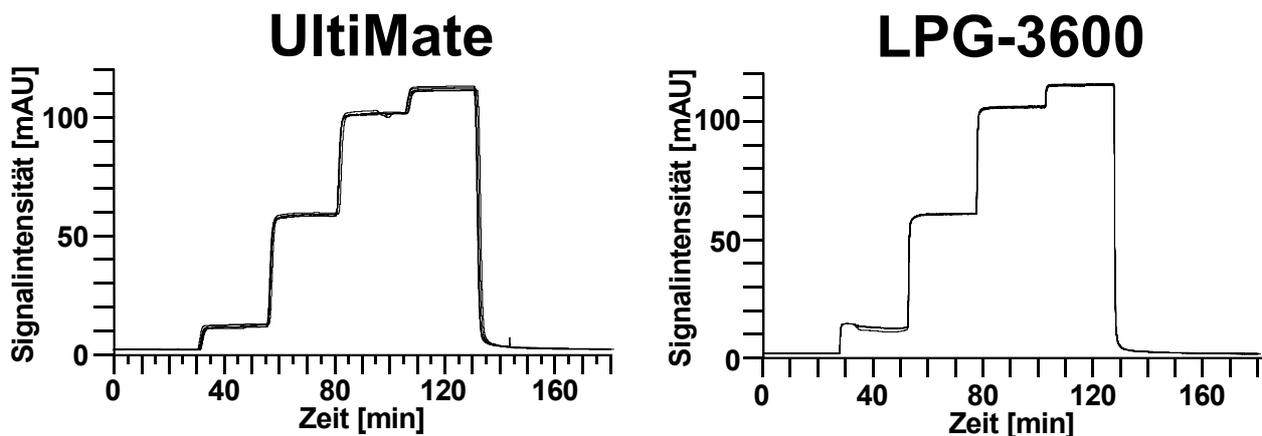


Abbildung 11. UV-Aufnahmen von jeweils fünf übereinander gelegten Stufengradienten generiert mit Hilfe einer UltiMate bzw. LPG 3600 Pumpe.

Tabelle 9. Standardabweichungen der Plateaus der Stufengradienten.

Eluent B [%]	UltiMate SD [mAU]	LPG 3600 SD [mAU]
10%	0.886	0.483
50%	0.491	0.143
90%	0.665	0.311
100%	0.910	0.293

Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten unter Verwendung von monolithischen Säulen

Für beide Anlagen wurde die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten von tryptischen Peptiden eines Cytochrom C (Rind) Verdau bei Verwendung von monolithischen PS/DVB-Säulen getestet. Diese Säulen sollten auch später in dem zweidimensionalen HPLC-System zum Einsatz kommen. Um eine aussagekräftige statistische Auswertung der Retentionszeiten aufstellen zu können, wurde der Verdau mit 30 Wiederholungen an jedem Gerät analysiert. Die weiteren Bedingungen für das Experiment sind nachfolgend aufgelistet:

Säule:	Kapillarsäule (50 x 0.20 mm I.D.)
Stationäre Phase:	PS/DVB Monolith
Eluenten:	A: Wasser + 0.05 Vol% TFA B: Wasser/Acetonitril (50:50) + 0.04 Vol% TFA
Gradient:	0-70% B in 7.5 min
Flussrate:	2.5 µl/min
Probenschleife:	1.0 µl
Injektionsmodus:	partial Loop (0.5 µl)
Probe:	Cytochrom C (Rind) Verdau (c = 1.0 pmol/µl)
Säulenofentemperatur:	40°C
Autosamplertemperatur:	5°C
Detektion:	UV bei 214 nm mit 3 nl Detektorzelle

Abbildung 12 zeigt exemplarisch alle 30 Ionenpaar-Umkehrphasen-Trennungen des Proteinverdau gemessen am UltiMate 3000 System. Von den neun eindeutig zu detektierenden tryptischen Peptiden wurden die Retentionszeiten für alle 30 Läufe ermittelt und ausgewertet. Die berechneten Standardabweichungen der jeweiligen Retentionszeiten sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Werte der UltiMate Anlage liegen zwischen 0.026 und 0.037 min, die der UltiMate 3000 Anlage zwischen 0.009 und 0.014 min, also ungefähr einen Faktor zwei niedriger. Insgesamt gesehen sind die Abweichungen der Retentionszeiten für beide Geräte, mit einer maximalen Abweichung von 2,2 sec, jedoch nur minimal und somit eignen sich die Systeme optimal für die Mikro-HPLC.

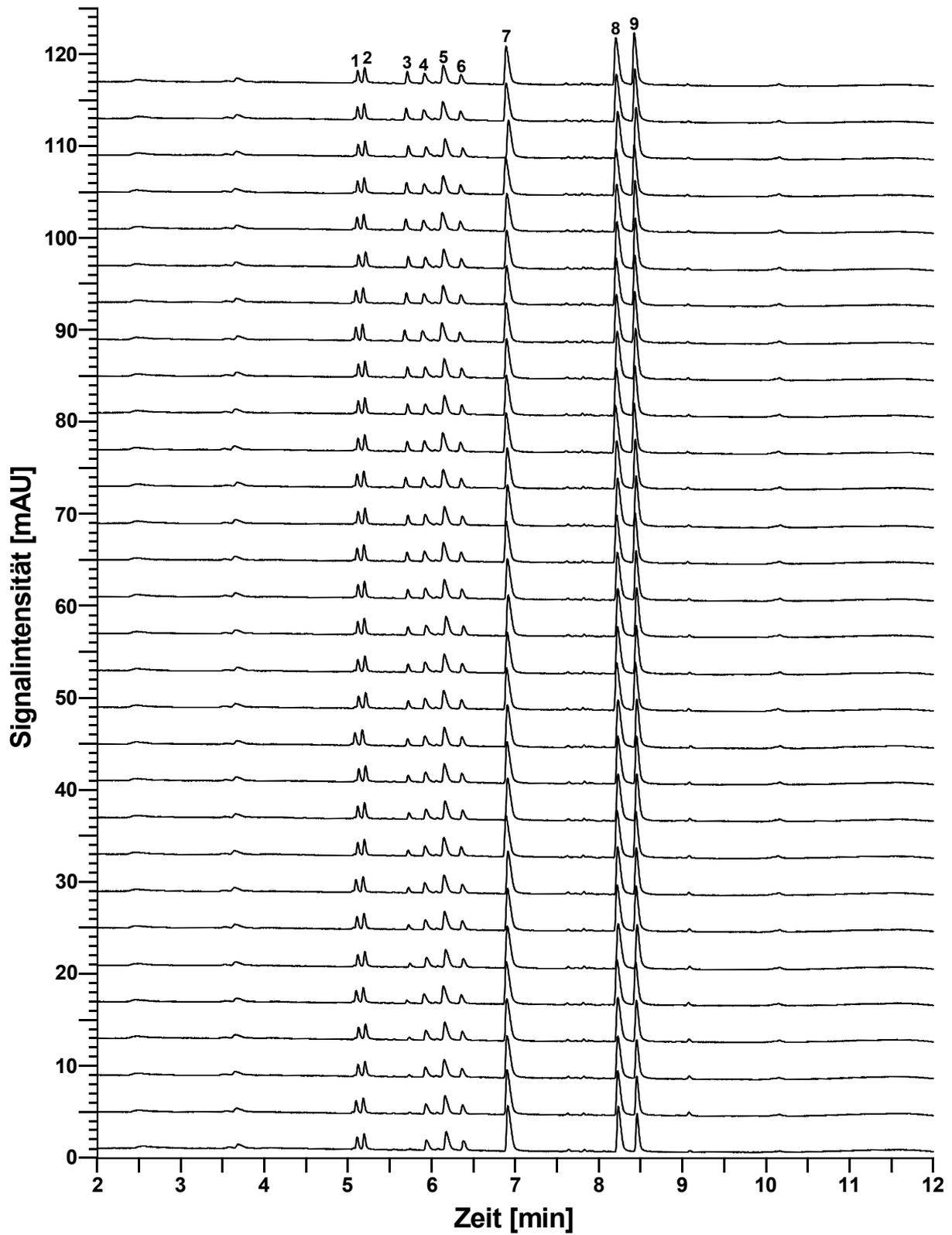


Abbildung 12. Übereinanderlegung von allen 30 IP-RP-HPLC Trennungen eines tryptischen Cytochrom C Verdaus gemessen am UltiMate 3000 System.

Tabelle 10. Standardabweichung der Retentionszeiten der neun detektierten tryptischen Peptide (30 Wiederholungsmessungen).

Peak Nr.	UltiMate SD [min]	U3000 SD [min]
1	0.032	0.012
2	0.033	0.011
3	0.031	0.014
4	0.031	0.012
5	0.029	0.012
6	0.027	0.012
7	0.026	0.0091
8	0.033	0.010
9	0.037	0.011

Anhand dieses Experimentes kann neben der guten Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten auch zusätzlich die hohe Trennleistung der monolithischen PS-DVB Kapillarsäulen, deren Einsatz in der 2. Dimension des 2D-HPLC-Systems geplant war, belegt werden. In Tabelle 11 sind die Mittelwerte der Peakhalbwertsbreiten der neun detektierten tryptischen Peptide von Cytochrom C aufgelistet. Die hohe Trenneffizienz der PS-DVB Monolithen spiegelt sich in Peakhalbwertsbreiten von 0.029 bis 0.056 min wider. Neben Peptiden konnte die Trennleistung der Monolithen auch schon für Proteine demonstriert werden^[11;14]. Aufgrund dieses hohen Leistungsvermögens eignen sich die monolithischen Säulen optimal für ein- und multidimensionale bioanalytische Untersuchungen.

Tabelle 11. Mittelwerte der Peakhalbwertsbreiten inklusive Standardabweichung der neun detektierten tryptischen Peptide (30 Wiederholungsmessungen).

Peak Nr.	w_h [min] \pm SD
1	0.029 \pm 0.001
2	0.031 \pm 0.001
3	0.032 \pm 0.001
4	0.045 \pm 0.001
5	0.051 \pm 0.001
6	0.041 \pm 0.001
7	0.056 \pm 0.002
8	0.055 \pm 0.001
9	0.045 \pm 0.002

Flussregulierung mittels elektronisch reguliertem Splitsystem (UltiMate 3000)

Schließlich wurde auch das elektronische Feedback-Splitsystem des UltiMate 3000 Gerätes getestet. Hierfür wurde eine Änderung der Permeabilität, genauer gesagt eine Erniedrigung dieser, mit Hilfe einer Restriktionskapillare (2000 x 0.020 mm I.D.) simuliert, die einen zusätzlichen Gegendruck von ca. 25 bar generierte. Für den Test wurde ein Cytochrom C Verdau fünfmal unter „normalen“ Bedingungen und direkt anschließend fünfmal unter leicht erhöhtem Gegendruck analysiert. Die Restriktionskapillare wurde nach der UV-Detektorzelle angeschlossen und beeinflusste somit nicht die Performance der Trennung aufgrund von zusätzlichem Extrasäulenvolumen. Zur Auswertung wurde anschließend die Änderung der Retentionszeiten der neun detektierten Peaks des tryptischen Cytochrom C Verdaus herangezogen. Bei einer optimalen Funktionsweise des elektronisch regulierten Splitsystems sollten sich die Retentionszeiten nur unwesentlich voneinander unterscheiden, da das Splitsystem über den elektronischen Feedback das Splitverhältnis konstant halten sollte, auch oder gerade bei Änderungen in den Druckverhältnissen. Die genauen Bedingungen für diesen Versuch sind nachfolgend aufgelistet:

Säule:	Kapillarsäule (150 x 0.075 mm I.D.)
Stationäre Phase:	Pepmap C18, 3 µm, 100 Å
Eluenten:	A: Wasser/Acetonitril (95:5) + 0.05 Vol% TFA B: Wasser/Acetonitril (20:80) + 0.04 Vol% TFA
Gradient:	0-50% B in 30 min, 50-90% B in 1 min, 90% B 5min
Flussrate:	300 nl/min
Probenschleife:	1.0 µl
Injektionsmodus:	full Loop (1.0 µl)
Probe:	Cytochrom C (Rind) Verdau (c = 1.0 pmol/µl)
Säulenofentemperatur:	40°C
Autosamplertemperatur:	5°C
Detektion:	UV bei 214 nm mit 3 nl Detektorzelle

In Abbildung 13 sind für die neun detektierten tryptischen Peptide die Retentionszeiten von allen zehn Messungen (fünf unter „normalen Bedingungen und fünf unter erhöhtem Druckabfall über die Säule) aufgetragen. Die mittlere

durchgezogene Linie stellt den Mittelwert aller Messungen dar und die oberhalb und unterhalb eingezeichneten gestrichelten Linien stellen die einfache bzw. zweifache Standardabweichung dar. Alle Retentionszeiten zeigen für die ersten fünf Messungen relativ konstante Werte. Diese steigen jedoch sobald die Messungen mit dem um ca. 25 bar erhöhten Säulendruck durchgeführt werden. Bei der siebten bzw. achten Messung erreichen die Retentionszeiten ihren Maximalwert und nähern sich dann erst wieder, bis zur zehnten Messung hin, ungefähr der Ausgangsretentionszeit. Es scheint also, dass die Anlage eine bestimmte Anlaufzeit benötigt um den zusätzlichen Druckabfall wirklich kompensieren zu können. Nichtsdestotrotz liegen die Abweichungen der Retentionszeiten der Peptide zwischen den beiden unterschiedlichen Druckbedingungen maximal um 0.2 min auseinander, was zumindest eine annähernde Kompensation beweist.

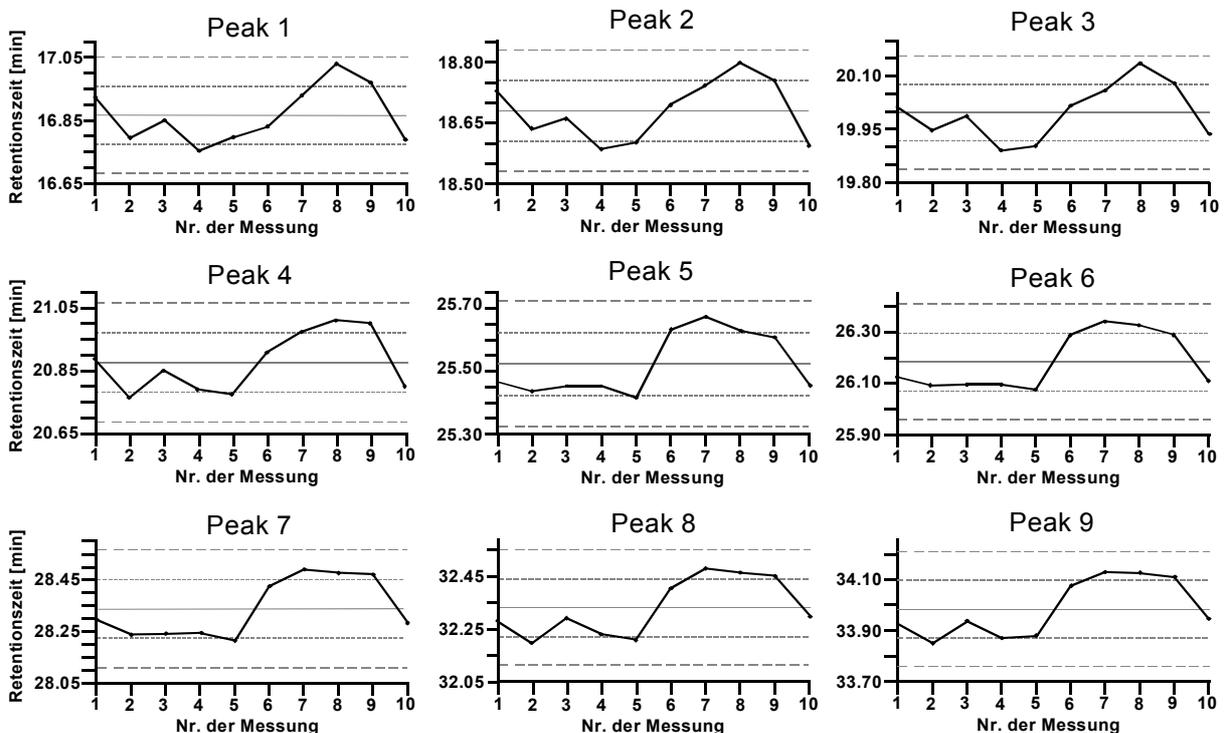


Abbildung 13. Charakterisierung des elektronisch regulierten Splitsystems (UltiMate 3000) bezüglich der Kompensation von Änderungen in der Säulenpermeabilität anhand der Retentionszeiten von neun tryptischen Cytochrom C Peptiden getrennt unter „normalem“ und erhöhtem Säulendruck.

3.2 Entwicklung und Charakterisierung eines Mikro-HPLC-Systems zum Entsalzen und Aufkonzentrieren von Peptiden und Proteinen

Nachfolgend wird die Entwicklung einer monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule mit entsprechender Säulenhalterung vorgestellt, welche im Anschluss individuell und in Kombination mit monolithischen Trennsäulen charakterisiert wurde.

3.2.1 Entwicklung und Charakterisierung einer PS-DVB Anreicherungssäule

Monolithische Kapillarsäulen werden normalerweise durch *in situ* Polymerisation von geeigneten Monomer-Porogen Mischungen direkt in den entsprechenden Quarzkapillaren erzeugt^[12;22;25;26]. Nach abschließendem Entfernen der Porogenlösung und der überschüssigen Monomerlösung kann die hergestellte Kapillarsäule direkt über herkömmliche oder miniaturisierte Anschlusstechniken, die von vielen unterschiedlichen Anbietern kommerziell erhältlich sind, an entsprechenden HPLC-Anlagen angeschlossen und verwendet werden. Das Hauptproblem bei der Verwendung von Anreicherungssäulen, welche auf monolithischen Kapillarsäulen basieren, ist deren Anschluss an die HPLC-Anlage bzw. an das entsprechende Schaltventil. Da die Anreicherungssäulen relativ kurz sein müssen, damit die Aufkonzentrierung und Entsalzung der Proben bei hohen Flussraten und geringen Druckabfällen stattfinden kann, können herkömmliche Verbindungen nicht benutzt werden. Die Länge der Säulen reicht hier nicht aus, um an Säuleneingang und -ausgang jeweils eine Verbindung für die Zu- und Ableitung anzuschließen (erforderliche Säulenmindestlänge > 20 mm). Aus diesem Grund mussten wir eine spezielle Säulenhalterung entwickeln, die es uns erlaubte, kurze monolithische PS-DVB Anreicherungssäulen in Kombination mit monolithischen PS-DVB Trennsäulen einzusetzen.

In diesem Kapitel wird die Entwicklung und systematische Charakterisierung einer PS-DVB Anreicherungssäule, die in Kombination mit einer PS-DVB Trennsäule die 2. Dimension des 2D-Systems bilden sollte, beschrieben. Die Experimente für die Charakterisierung der Anreicherungssäule beinhalteten Tests zur Druckstabilität, zur

Trenn- und Anreicherungseffizienz bei unterschiedlichen Temperaturen und zur Beladungskapazität.

Entwicklung einer Halterung für Kapillar-Anreicherungssäulen

Unser Ziel war der Einsatz einer 10 mm langen monolithischen Kapillarsäule zum Aufkonzentrieren und Entsalzen von Proben. Diese Länge bietet den Vorteil, dass die Säule bei einer relativ hohen Flussrate betrieben werden kann, aber dennoch genügend stationäre Phase für eine angemessene Beladungskapazität bietet. Eine schematische Skizze sowie eine Photographie der von uns entwickelten Säulenhalterung ist in Abbildung 14 gezeigt.

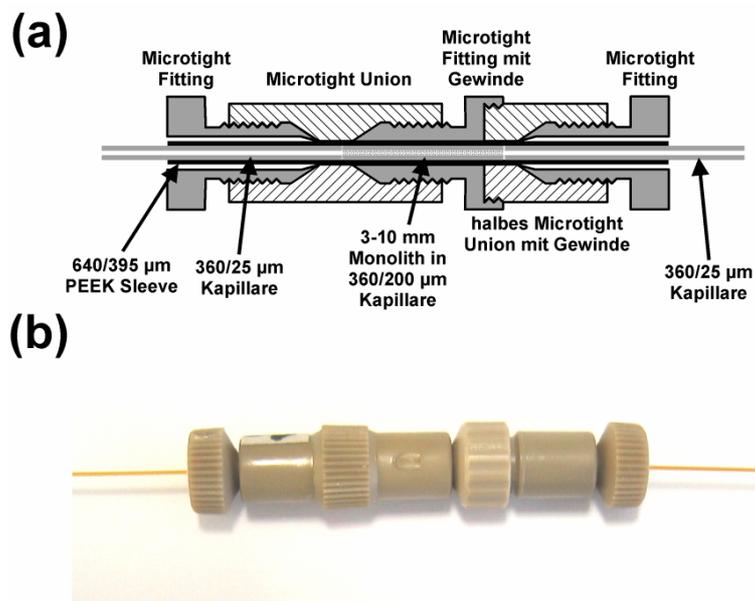


Abbildung 14. Schematische Zeichnung (a) und Photo (b) der entwickelten Anreicherungssäulenhalterung.

In dieser Halterung wird die Anreicherungssäule über ein Anschlussstück (Microtight Fitting), in das zusätzlich ein Gewinde an der Rückseite geschnitten ist, in einem Verbindungsstück (Microtight Union) fixiert. Neben dem zusätzlichen Gewinde ist das Fitting der Anreicherungssäule auch noch so modifiziert, dass der Durchmesser der Bohrung genau an den Außendurchmesser der Anschluss-hülse (Sleeve) angepasst ist. Diese Modifikation soll die Druckstabilität des Setups erhöhen. Der Anschluss der Quarzkapillaren für die Zu- und Ableitung erfolgt über zwei weitere Fittings, wobei die eine Kapillare in demselben Union wie die Anreicherungssäule fixiert wird und die andere in einem halbierten Union, welches in das Fitting der Anreicherungssäule

geschraubt wird. Um die Dichtheit des Setups zu gewährleisten ist es wichtig, dass sowohl die Anreicherungssäule als auch die Zu- und Ableitungskapillaren in ein und derselben Anschlusshülse fixiert sind. Das entwickelte Setup ermöglicht den Anschluss von 3 – 10 mm langen Kapillarsäulen mit einem Außendurchmesser von 360 µm. Die Bandbreite an Innendurchmessern für 360 µm Kapillaren reicht hierbei von 5 – 250 µm. Um zusätzliches Extrasäulenvolumen zwischen der Anreicherungssäule und den Anschlusskapillaren zu vermeiden, müssen ihre Enden einen sauberen, geraden Schnitt aufweisen. Dies kann mit einem Kapillar-Diamantschneider bewerkstelligt werden.

Da bei der Verwendung von Anreicherungssäulen eine Säulenschaltung vonnöten ist, müssen diese abrupten Änderungen in der Flussrate und im Gegendruck standhalten. Aus diesem Grund wurde die Anreicherungssäule auf ihre Druckstabilität getestet. Die Tests wurden an einer 10 x 0.20 mm I.D. monolithischen PS-DVB Säule, wie sie später auch für die 2D-Analysen verwendet werden sollte, für beide Flussrichtungen durchgeführt. Die Experimente umfassten einen Druckabfall von 250 bar für die Dauer von 2 h (Flussrate: 11.5 µl/min), 300 bar für 48 h (Flussrate: 14.0 µl/min) und einen einmaligen Druckabfall von 400 bar, welcher das Drucklimit der HPLC-Anlage darstellt. Unter all diesen Bedingungen war die Stabilität und Dichtheit des Anreicherungssäulensetups gewährleistet.

Trennleistung der monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule

Als nächstes wurde ein 9er Peptidstandard bei zwei verschiedenen Temperaturen (25°C und 60°C) nur mit der Anreicherungssäule als Trennsäule analysiert. Dieses Experiment sollte zum einen zeigen, ob die Verbindungen der Anschlusskapillaren mit der Anreicherungssäule möglichst frei von zusätzlichen Extrasäulenvolumina sind, wodurch später auch die Trennleistung bei der Kopplung mit der monolithischen Trennsäule beeinflusst würde und zum anderen inwieweit die Anreicherungseffizienz von der Temperatur beeinflusst wird. In Abbildung 15 sind die erhaltenen UV-Chromatogramme für die Peptidtrennung bei 25°C und bei 60°C dargestellt. Man erkennt anhand des Chromatogramms bei 25°C, dass bereits mit einer Säulenlänge von 10 mm eine gewisse Trenneffizienz und Selektivität mit den monolithischen Säulen erreicht werden kann. Man erhält für die neun Peptide sieben nahezu basisliniengetrennte Peaks, wobei jeweils 2 mal 2 Peptide koeluiieren und das Bradykinin Fragment 1-5 als sehr breiter Peak im isokratischen Teil der Trennung

eluiert. Diese gute Trenneffizienz beweist, dass die Verbindungen in der Säulenhalterung zwischen Anreicherungssäule und Anschlusskapillaren keine großen zusätzlichen Extrasäulenvolumina aufweisen können. Somit erlaubt die von uns entwickelte Halterung ein „sauberes“ Anschließen von kurzen Kapillarsäulen an entsprechende HPLC-Anlagen. Die Trennung bei erhöhter Temperatur (60°C) zeigt, dass hier zwei weitere Peaks im isokratischen Teil des Chromatogramms als relativ breite Peaks eluieren. Dies ist von Nachteil für den Einsatz dieser Säule als Anreicherungssäule, da bereits während dem Aufkonzentrieren und Entsalzen von Fraktionen eine große Menge an Analyten, die isokratisch von der Anreicherungssäule eluieren, verloren gehen können. Aus diesem Grund empfiehlt es sich unter den verwendeten Bedingungen, die Anreicherungssäule bei 25°C zu betreiben.

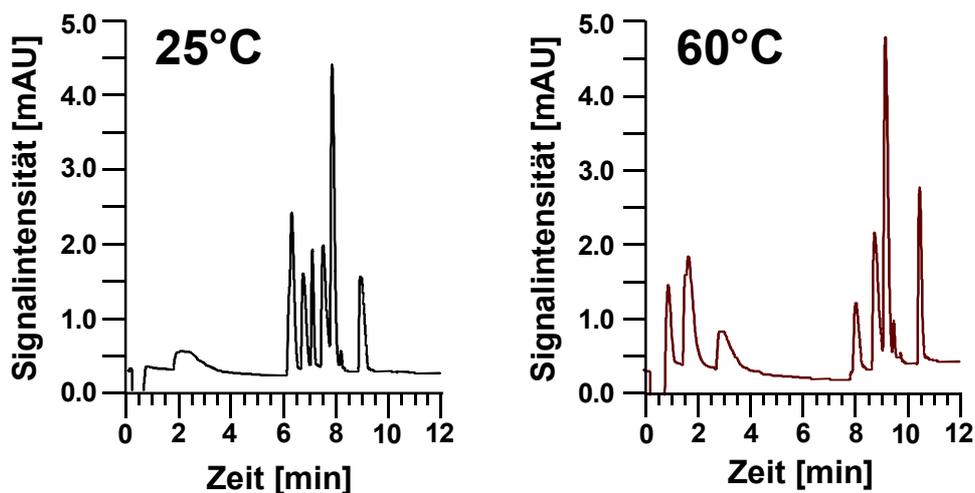


Abbildung 15. IP-RP-HPLC Analyse einer 9er Peptidmischung mit der 10 x 0.20 mm I.D. Anreicherungssäule bei 25°C und 60°C.

Säule, PS/DVB, 10 x 0.20 mm I.D.; mobile Phase, A) H₂O + 0.05% TFA, B) ACN + 0.05% TFA; Gradient, 0-50% B in 15 min; Flussrate, 2.5 µl/min; Temperatur, 25°C bzw. 60°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 9er Peptidmischung bestehend aus Bradykinin Fragment 1-5, [Arg⁸]-Vasopressin, Methionin Enkephalin, Leucin Enkephalin, Oxytocin, Bradykinin, LHRH, Bombesin, Substanz P, jeweils 1 ng injiziert.

Beladungskapazität der 10 x 0.20 mm I.D. Anreicherungssäulen

Die Menge an Probe, die später bei dem 2D-HPLC-System in der 2. Dimension reinjiziert werden kann, ist abhängig von der Beladungskapazität der monolithischen Anreicherungssäule. Die Beladungskapazität der Kationenaustauschersäule (ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I. D.), welche in der 1. Dimension eingesetzt werden sollte, liegt nach Angaben des Herstellers, je nach Protein, bei 10 – 100 µg Protein pro Säule. Um die Beladungskapazität der 10 x 0.20 mm I.D. PS-DVB Anreicherungssäule zu bestimmen, wurden so genannte Frontanalysen mit drei verschiedenen Proteinen (Cytochrom C, Carboanhydrase, Serum Albumin) und einer Mischung aus sechs Peptiden (Leucin-Enkephalin, Bombesin, Oxytocin, LHRH, Bradykinin, Substanz P) durchgeführt. Durch die Wahl der drei Proteine konnten wir einen relativ breiten Massenbereich von 12224.2 Da für Cytochrom C über 29006.7 Da für Carboanhydrase bis zu 66355.9 Da für Serum Albumin abdecken. Die molekularen Massen der ausgewählten Peptide liegen zwischen 555.3 und 1618.8 Da. Eine wichtige Voraussetzung, die diese Peptide erfüllen, ist, dass sie bei der Verwendung von rein wässrigen Eluenten nicht isokratisch von der monolithischen Säule eluieren. Für die Messungen wurden jeweils 5 µl der einzelnen Proteinlösungen mit den Konzentrationen 12.5, 25 und 50 pmol/µl und jeweils 5 µl der Peptidmischung mit den Konzentrationen 25, 50 und 100 pmol/µl (angegebene Konzentration bezieht sich auf jedes einzelne Peptid in der Mischung) auf die Anreicherungssäule injiziert. Anschließend wurden die Durchbruchskurven mittels UV-Detektion aufgezeichnet. Über die Wendepunkte der Durchbruchssignale, die eingestellte Flussrate und die injizierte Konzentration konnte die Beladungskapazität der Anreicherungssäule für alle Proben bestimmt werden. Nach dem Durchbruch der Proben wurden die an der Säule adsorbierten Analyten mit einem Acetonitril-Gradienten von der Säule gespült. Abbildung 16 zeigt exemplarisch für jede Probe die UV-Aufnahmen bei einer bestimmten Konzentration. Die sehr breiten Peaks am Anfang der Aufnahmen stellen jeweils die Durchbruchskurven dar und die anderen Peaks am Ende der Aufnahmen die von der Säule mittels Acetonitril desorbierten Proteine bzw. Peptide. Die ermittelten Wendepunkte sind mit einem Kreuz markiert.

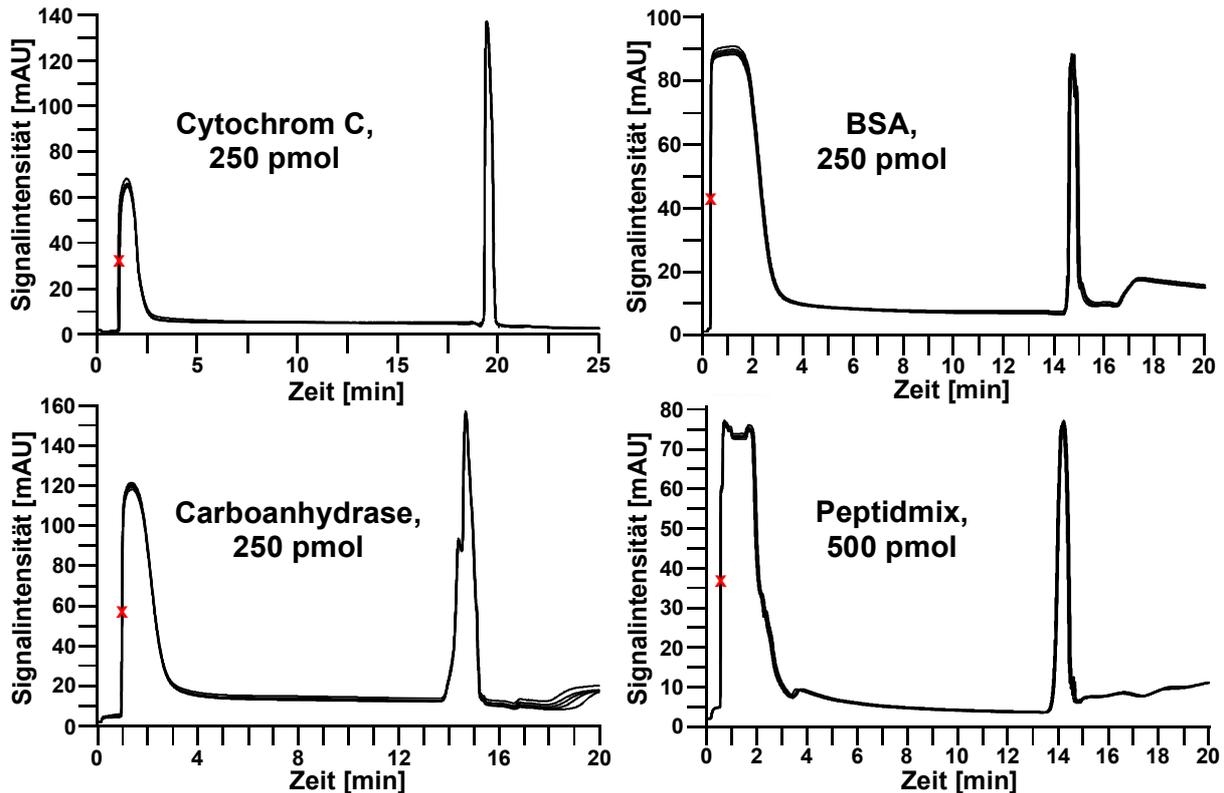


Abbildung 16. Bestimmung der Beladbarkeit von monolithischen PS-DVB Anreicherungssäulen (10 x 0.20 mm I.D.) über die Durchbruchkurven von Cytochrom C, Carboanhydrase, BSA und einem 6er Peptidmix.

Säule, PS/DVB, 10 x 0.20 mm I.D.; mobile Phase, A) H₂O + 0.05% TFA, B) ACN + 0.05% TFA; Gradient, 0% B für 10 bzw. 15 (Cyt C) min, 0-100% B in 3 min; Flussrate, 2.5 µl/min; Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, Cytochrom C, Carboanhydrase, Serum Albumin, 6er Peptidmischung bestehend aus Leucin Enkephalin, Oxytocin, Bradykinin, LHRH, Bombesin, Substanz P, jeweils 250 bzw. 500 (Peptidmix) pmol injiziert; Wiederholungsmessungen, 5.

Die anhand der Wendepunkte ermittelten Durchbruchzeiten wurden noch zusätzlich über die Durchflusszeit des Systems, welche durch fünfmaliges Messen der Inertsubstanz Uracil (5 ng) bestimmt wurde, entsprechend korrigiert ($t(\text{Wendepunkt}) - t_M(\text{Uracil}) = t(\text{Durchbruch})$). Durch die verschiedenen Konzentrationen, die wir pro Probe injizierten, war es uns möglich die Ergebnisse der Beladungskapazitäten zu vergleichen und statistisch auszuwerten. Zusätzlich wurden dazu noch jeweils fünf Wiederholungsmessungen pro Konzentration durchgeführt. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert der Beladungskapazität der Anreicherungssäule

zusammen mit dem zugehörigen Vertrauensbereich ($P=95\%$, $N=15$) für jedes einzelne Protein und die Peptidmischung berechnet. Um herauszufinden inwiefern Laufmitteladditive eine Rolle für die Beladbarkeit spielen, wurden die Proben jeweils mit der herkömmlich verwendeten wässrigen Trifluoressigsäure Lösung (0.050% TFA in Wasser) auf die Säule beladen und zum Vergleich noch zusätzlich mit einer wässrigen Heptafluorbuttersäure Lösung (0.10% HFBA in Wasser). Die erhaltenen Ergebnisse sind in einem Balkendiagramm in Abbildung 17 für jede Probe aufgetragen. Die relativ schmalen Vertrauensbereiche der ermittelten Beladbarkeiten belegen, dass die Ergebnisse für die einzelnen Proteine/Peptide, sowohl über die drei unterschiedlichen Probekonzentrationen als auch über die jeweils fünf Wiederholungsmessungen, mit einer verhältnismäßig hohen Präzision bestätigt werden konnten. Für die Proteine liegen die Beladungskapazitäten einer 10 x 0.20 mm I.D. monolithischen PS-DVB Säule im Bereich von 0.45 – 1.50 μg mit Trifluoressigsäure als Additiv und mit Heptafluorbuttersäure bei 0.93 – 1.58 μg . Diese Werte entsprechen, basierend auf den physikalischen Eigenschaften von monolithischen PS-DVB Säulen (Porosität, 60%; Dichte, 1.0 g/cm^3), Beladbarkeiten von 3.6 bis 12.5 mg Protein pro Gramm stationärer Phase. Die höchste Beladbarkeit konnte mit der Carboanhydrase erzielt werden. Diese zeigt im Vergleich zu den anderen beiden Proteinen auch die stärkste Retention auf monolithischen PS-DVB Phasen. Bei den Beladbarkeitstests mit Peptiden lagen die Werte bei 0.6 μg (≈ 600 fmol) und der Unterschied zwischen den beiden Laufmitteladditiven TFA und HFBA war nur sehr gering.

Ausgehend von einem ESI-MS(/MS) Massendetektionslimit von 1-3 pg (≈ 1 fmol) für Peptide und einer analytischen Peptid-Beladungskapazität von 600 – 800 pg (≈ 600 fmol; analytische Proteinbeladungskapazität: 10 – 20 ng (≈ 500 fmol)) für 60 x 0.20 mm I.D. PS-DVB Monolithen^[14], welche später direkt mit der Anreicherungssäule gekoppelt werden sollten, ist die Beladbarkeit der Anreicherungssäule völlig ausreichend und ermöglicht die Analyse eines breiten dynamischen Bereichs. Auch monolithische Trennsäulen mit kleinerem Innendurchmesser als 200 μm (z.B. 60 x 0.10 mm I.D. PS-DVB Monolithen, analytische Peptid-Beladungskapazität: 150 – 200 pg (≈ 150 fmol)) können noch ohne Probleme mit diesen Anreicherungssäulen kombiniert werden.

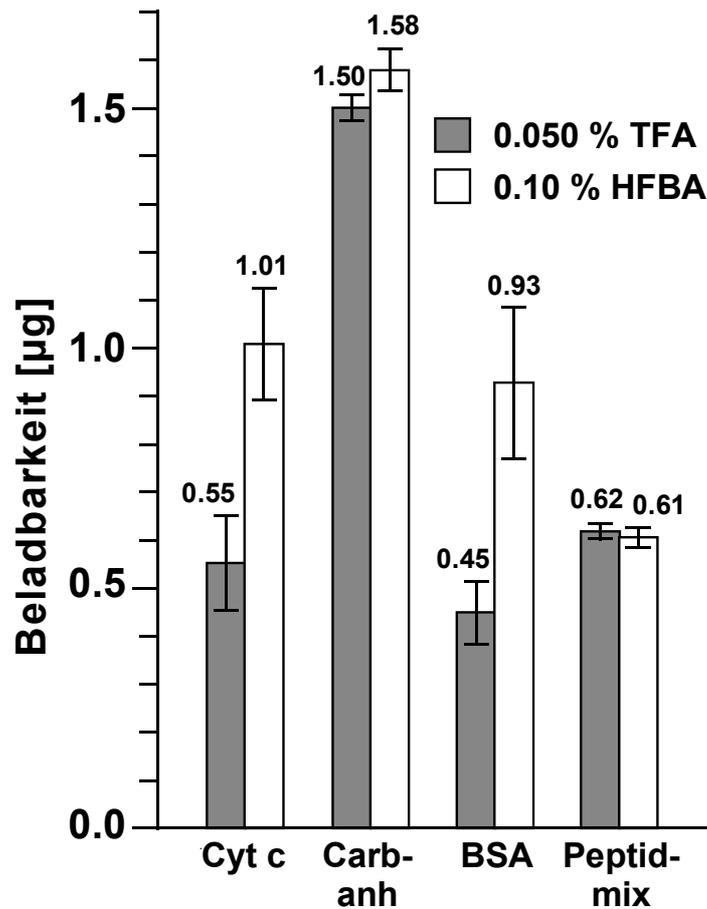


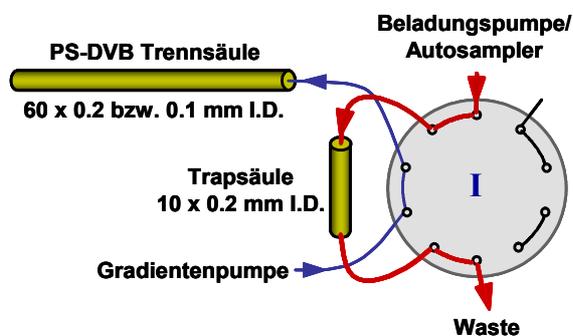
Abbildung 17. Beladungskapazität einer 10 x 0.20 mm I.D. monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule für Peptide und Proteine bei Verwendung von Trifluoressigsäure und Heptafluorbuttersäure im Beladungseluenten.

Säule, PS/DVB, 10 x 0.20 mm I.D.; mobile Phase, A) H₂O + 0.050% TFA bzw. H₂O + 0.10% HFBA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 0% B für 10 bzw. 15 (Cyt C) min, 0-100% B in 3 min; Flussrate, 2.5 µl/min; Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 62.5, 125 und 250 pmol von Cytochrom C (Cyt C), Carboanhydrase (Carbanh), Serum Albumin (BSA) und 125, 250, 500 pmol einer 6er Peptidmischung bestehend aus Leucin Enkephalin, Oxytocin, Bradykinin, LHRH, Bombesin, Substanz P. Abgebildete Beladungskapazitäten repräsentieren die Mittelwerte mit den dazugehörigen Vertrauensbereichen (P=95%) ermittelt aus fünf Wiederholungsmessungen für jede der drei Konzentrationen.

3.2.2 Kopplung der monolithischen Anreicherungssäule mit der monolithischen Trennsäule

Nach der individuellen Charakterisierung der PS-DVB Anreicherungssäule sollte diese anschließend in Kombination mit monolithischen PS-DVB Trennsäulen getestet werden. Die Anreicherungssäule wurde dazu über ein 10-Wege Ventil eines Säulenschaltmoduls in das HPLC-System integriert. An dieses Ventil wurden zusätzlich noch eine Beladungspumpe und eine Niederdruck-Gradientenpumpe angeschlossen. Die Anschlüsse wurden hierbei so vorgenommen, dass die Proben bei der Grundstellung des Schaltventils über die Beladungspumpe, welche an einen Autosampler gekoppelt war, auf die Anreicherungssäule transferiert werden konnten. Nach dem Probentransfer und entsprechender Aufkonzentrierung und Entsalzung konnte durch Umschalten des 10-Wege Ventils die Probe im Backflush-Modus auf die monolithische Trennsäule übertragen werden. Hier erfolgte die hochauflösende Trennung der Analyten mit anschließender Detektion (UV, MS, MS/MS). Die Anordnung der Anschlüsse am 10-Wege Ventil und die beiden möglichen Schaltpositionen (I und II) sind schematisch in Abbildung 18 skizziert.

I. Beladen:



II. Backflush Elution:

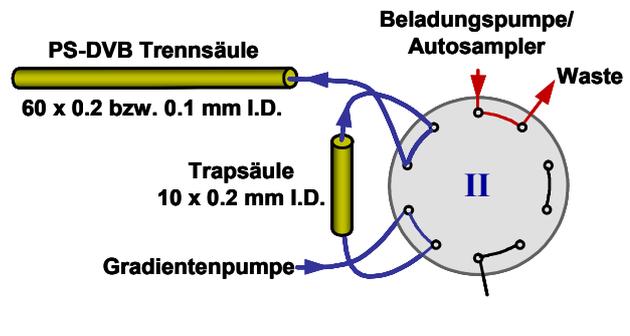


Abbildung 18. Anordnung der Anschlüsse am 10-Wege Ventil für die Kopplung von Anreicherungs- und Trennsäule.

Nachfolgend wurde geklärt inwieweit der Aufkonzentrierungsschritt Einfluss auf die Trennleistung der monolithischen Trennsäule ausübt. Des Weiteren wurde die Probenwiederfindung bei der Aufkonzentrierung von gleichen Probenmengen in unterschiedlich großen Probenvolumina überprüft. Da wir bereits feststellen konnten, dass ein gewisser Anteil an organischen Lösungsmitteln in den Eluenten der Kationenaustauschchromatographie vonnöten ist um sekundäre solvophobe Wechselwirkungen zu unterdrücken, untersuchten wir außerdem noch, inwieweit der

Einsatz von Acetonitril im Beladungseluenten die Anreicherungs- und Trenneffizienz des System beeinflusst.

Einfluss der Kopplung von monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule auf die Trennleistung von PS-DVB Säulen

Der Einfluss einer 10 x 0.20 mm I.D Anreicherungssäule auf die Trenneffizienz von monolithischen Trennsäulen wurde über die Analyse eines 9er Peptidstandards beurteilt. Hierfür wurden die Peptide zum einen nur mit der monolithischen Trennsäule und zum anderen mit der Kombination aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule (Backflush Modus) analysiert. Als Trennsäulen wurden 60 mm lange monolithische PS-DVB Säulen mit Innendurchmessern von 0.20 oder 0.10 mm eingesetzt. Die Trennung der Peptide erfolgte, bei einem auf die entsprechende Säule angepassten Fluss (100 µm I.D., Flussrate: 0.62 µl/min; 200 µm I.D., Flussrate: 2.0 µl/min), mit Hilfe eines Acetonitrilgradienten. Bei den Versuchen, die eine Kopplung der monolithischen Trenn- und Anreicherungssäule beinhalteten, wurden die Proben vor der Trennung zusätzlich an der Anreicherungssäule für 3 min aufkonzentriert und anschließend im Backflush-Modus auf die Trennsäule überführt. Es ist hier anzumerken, dass das Gradientenprogramm für die Trennung schon während des Aufkonzentrierungsschrittes gestartet wurde. Dadurch konnte die Zeit überbrückt werden, die der Gradient benötigt, um von der Mischkammer, wo er erzeugt wird, bis zur Säule zu gelangen (Dwell-Volumen). Dies hatte den Vorteil, dass nach dem Umschalten des 10-Wege Ventils die Probe mehr oder weniger direkt mit dem Acetonitrilgradienten auf die Trennsäule transferiert und dort getrennt werden konnte.

Zum Vergleich wurden die Messungen mit der 200 µm I.D Trennsäule, neben den Analysen bei 25°C, zusätzlich noch bei 50°C durchgeführt. Alle Messungen wurden insgesamt viermal wiederholt, damit eine gewisse statistische Sicherheit der gemessenen Chromatogramme gewährleistet werden konnte. Aus diesen Chromatogrammen wurden die Peakhalbwertsbreiten der Peptide zusammen mit den Vertrauensbereichen (P=95%, N=4) ermittelt, welche im Anschluss für alle Analysen verglichen wurden. Für den Vergleich wurden allerdings nur die Peakhalbwertsbreiten berücksichtigt, die eindeutig aus den Chromatogrammen bestimmt werden konnten. Dies galt für Peptide, die bei den Analysen basislinien-getrennt waren.

Die Auftragungen der Peakhalbwertsbreiten von sechs Peptiden in Abbildung 19 zeigen, dass die Trennungen mit Anreicherungssäule durchweg effizienter waren, als die ohne Anreicherungssäule. Für die 200 µm I.D. Trennsäule bei 25°C verringerte sich die durchschnittliche Peakhalbwertsbreite von 0.046 auf 0.041 min, d.h. um 11% (Abbildung 19a). Abbildung 19b bestätigt, dass die 10 x 0.20 mm I.D. Anreicherungssäule ebenfalls ohne Schwierigkeiten mit einer Trennsäule kombiniert werden kann, die einen Innendurchmesser von 0.10 mm besitzt. Auch hier wird der positive Einfluss der Anreicherungssäule auf die Trennperformance deutlich. Im Vergleich zur 200 µm I.D. Trennsäule fällt dieser Effekt sogar noch deutlicher aus, was durch eine Abnahme von 20% der durchschnittlichen Peakhalbwertsbreite belegt werden kann (Abnahme der durchschnittlichen Peakhalbwertsbreite von 0.060 auf 0.048 min). Die etwas größeren Peakhalbwertsbreiten, die bei der Verwendung der 100 µm I.D. Trennsäule erhalten werden, können auf die längere Verzögerung des Gradienten, die durch die niedrigere Flussrate hervorgerufen wird, zurückgeführt werden. Aufgrund der zusätzlichen Verzögerung sind die Analyten in der Trennsäule über einen längeren Zeitraum isokratischen Bedingungen ausgesetzt. Des Weiteren können leichte Abweichungen in den Trenneffizienzen von unterschiedlichen monolithischen Säulen, aufgrund der Herstellungsprozedur, nicht ausgeschlossen werden.

Eine weitere Bestätigung für die Erhöhung der Trenneffizienz bei Verwendung der monolithischen Anreicherungssäule konnte für die Messungen mit der 200 µm I.D. Trennsäule bei 50°C erhalten werden. Die Trennungen bei 50°C zeichneten sich insgesamt durch eine höhere Effizienz gegenüber den Messungen bei Raumtemperatur aus^[11]. Jedoch konnte auch hier die Trennleistung des Systems durch die Kopplung der PS-DVB Trennsäule mit der PS-DVB Anreicherungssäule gesteigert werden, was sich in einer Abnahme der durchschnittlichen Peakhalbwertsbreite von 0.045 auf 0.036 min (20%) widerspiegelt (Abbildung 19c).

Die größten Unterschiede in den Peakhalbwertsbreiten wurden jeweils für die Peptide festgestellt, die relativ früh eluierten. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Erhöhung der Trenneffizienz bei zusätzlicher Verwendung der Anreicherungssäule, auf der Fokussierung der Analyten in der Anreicherungssäule beruht. Dieser Effekt wirkt sich besonders auf die Analyten aus, die eine relativ geringe Retention an der stationären Phase aufweisen. Auch der Umstand, dass der Gradient bereits während des Aufkonzentrierungsschrittes gestartet wird, wirkt sich positiv auf die Trennperformance des 2D-Systems aus.

Beim Umschalten des 10-Wege Ventils hat der Gradient bereits weitestgehend das Dwell-Volumen der Anlage durchlaufen und kommt nahezu ohne Verzögerung an der Anreicherungssäule an. Durch Verkürzung bzw. Eliminierung der isokratischen Anfangsphase der Trennung kann somit eine zusätzliche Verbreiterung der Probenzonen in der Trennsäule vermieden werden.

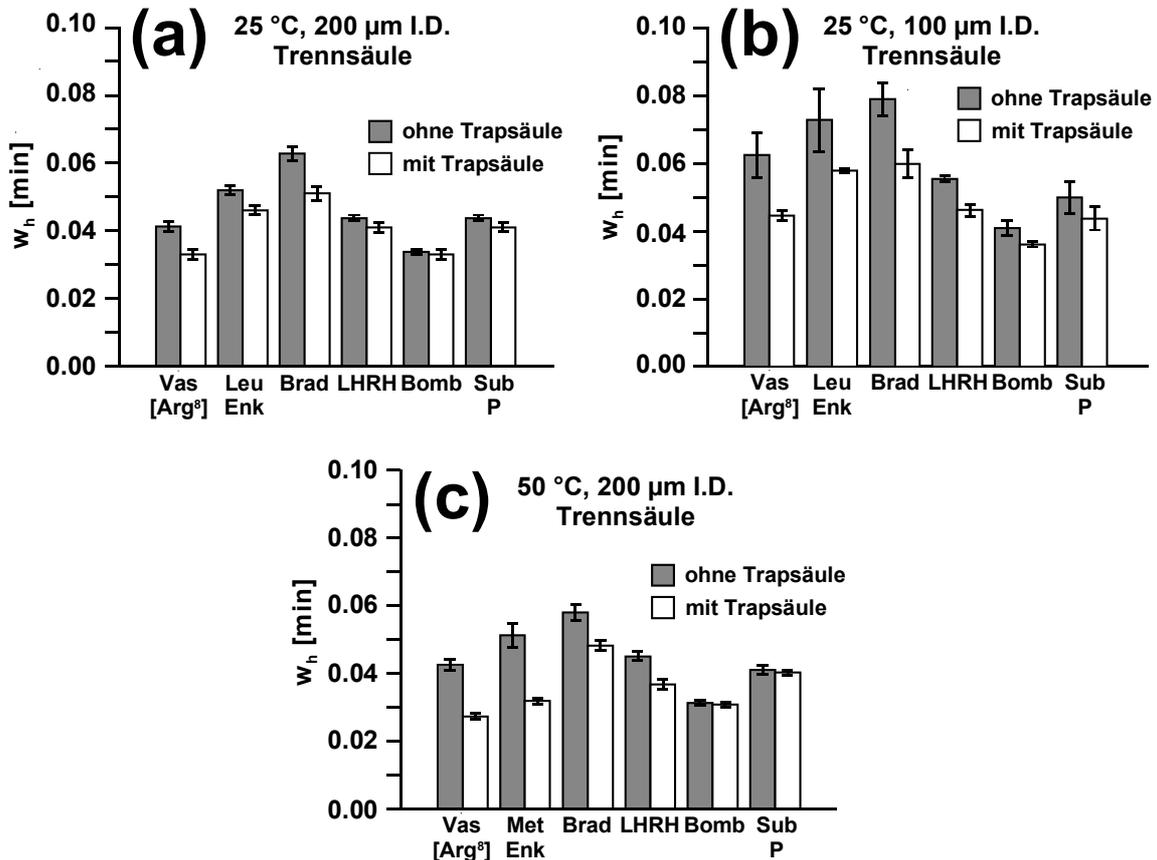


Abbildung 19. Vergleich der Peakhalbwertsbreiten (w_h) von Peptiden, die mit einer monolithischen Trennsäule bzw. mit der Kombination aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule getrennt wurden.

Säulen, 10 x 0.20 mm I.D. PS/DVB Anreicherungssäule und 60 x 0.20 (a, c) bzw. 0.10 mm I.D. (b) PS-DVB Trennsäule; Beladungseluent, 0.10% wässrige HFBA Lösung; Beladungsdauer, 3 min; Beladungsflussrate, 10 µl/min; mobile Phase, A) H₂O + 0.050% TFA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 0-50% B in 15 min; Flussrate, 2.0 (a, c) bzw. 0.62 µl/min (b); Temperatur von Anreicherungs- und Trennsäule, 25 (a, b) bzw. 50°C (c); Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 9er Peptidmischung (Zusammensetzung, siehe Abbildung 15); jeweils 0.50 (a, c) bzw. 0.20 ng (b) injiziert. Die aufgetragenen Peakhalbwertsbreiten repräsentieren den Mittelwert aus vier Wiederholungsmessungen ± 95% Vertrauensbereich.

Neben dem Einfluss der Anreicherungssäule auf die Trennperformance von 60 mm langen monolithischen Trennsäulen, konnten anhand der durchgeführten Experimente auch die 0.20 und 0.10 mm I.D. Trennsäulen direkt miteinander verglichen werden. Die Analysen mit der 0.10 mm I.D. Trennsäule sollten, aufgrund der geringeren Verdünnung der Proben während der Trennung, eine höhere Massenempfindlichkeit aufweisen. Über die Signalintensitäten der Peaks bzw. die entsprechenden Signal-zu-Rauschen Verhältnisse (S/N), die aus den UV-Chromatogrammen ermittelt wurden, konnte dies auch bestätigt werden. Bei Injektionen von 0.2 ng des Peptidstandards waren die Intensitäten für die 100 µm I.D. Säule im Durchschnitt um den Faktor 2 größer als bei der 200 µm Säule. Diese lieferte bei einer injizierten Probenmenge von 0.5 ng vergleichbare Signalintensitäten. Aus diesem Grund ist der Einsatz von monolithischen PS-DVB Trennsäulen mit einem Innendurchmesser von 0.10 mm vorteilhafter für Analysen von Proben, die in geringen Mengen vorliegen.

Aufkonzentrierung von intakten Proteinen

Als nächstes wurde die Möglichkeit der Aufkonzentrierung von verdünnten Proben an monolithischen Anreicherungssäulen mit anschließender Trennung in PS-DVB Säulen getestet. Da sich das System aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule bereits für die Analyse von Peptiden ausgezeichnet hatte, wurde es nun auf die Anwendbarkeit für intakte Proteine getestet. Aufgrund des schnellen Massentransfers in monolithischen Phasen^[27] sowie der hohen Wiederfindungsraten speziell für hydrophobe Makromoleküle^[28] eignen sich die PS-DVB Monolithen besonders für die Analyse von intakten Proteinen^[17;18;29]. Die Anwendbarkeit der Kombination aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule für die Analyse von intakten Proteinen wurde mit einer Mischung aus sieben Proteinen untersucht. Bei den Proteinen handelte es sich um Ribonuklease A, Cytochrom C, Myoglobin, β -Lactoglobulin B, Transferrin, Carboanhydrase und Lysozym. Die Mischung wurde auf einer 10 x 0.20 mm I.D. Anreicherungssäule aufkonzentriert und nach Backflush-Elution mit einer 60 x 0.10 mm I.D. Trennsäule aufgetrennt. Die anschließende Detektion erfolgte mit einem Elektrospray-Ionenfallen Massenspektrometer. Abbildung 20a zeigt das erhaltene rekonstruierte totale Ionenstrom Chromatogramm (RTICC) für die Proteinmischung inklusive Peakzuordnung. Zu dem Chromatogramm

sind zusätzlich noch die extrahierten Massenspektren, anhand dessen alle Proteine identifiziert werden konnten, abgebildet (Abbildung 20b-g).

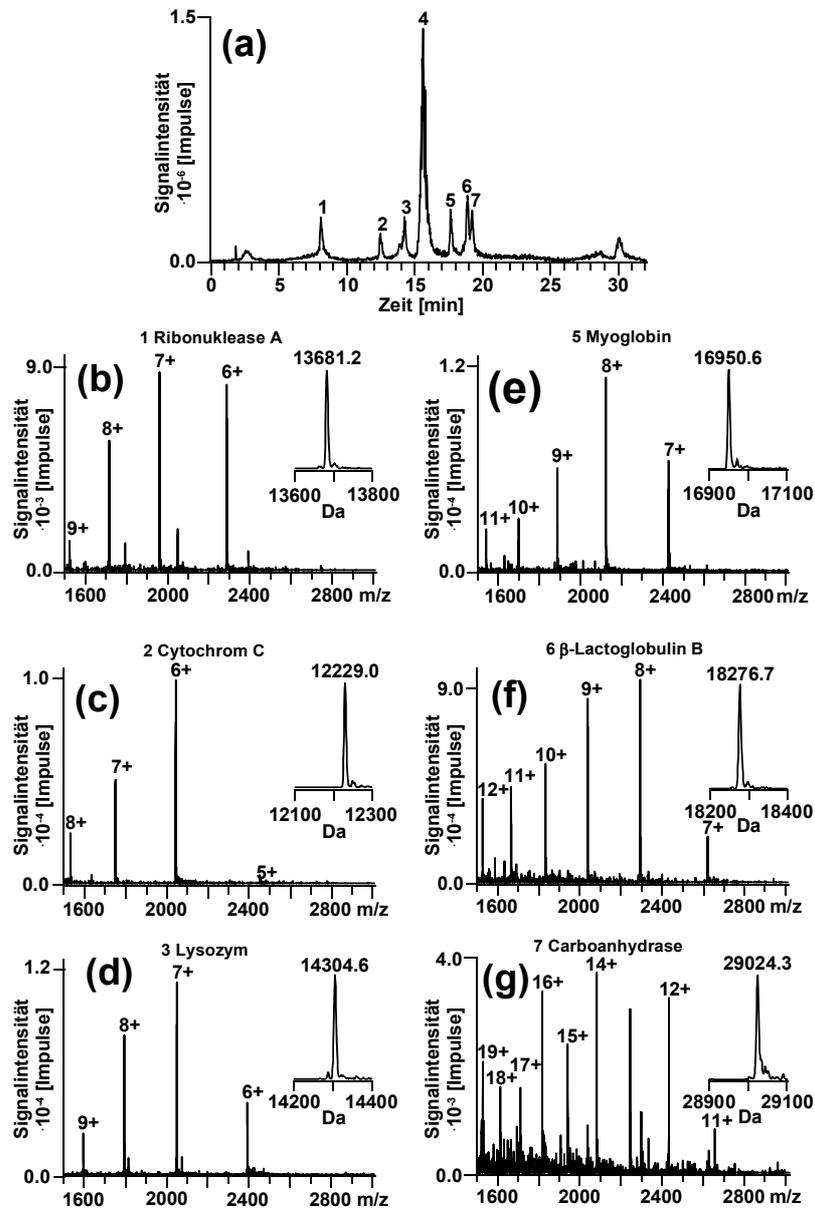


Abbildung 20. Aufkonzentrierung und anschließende Trennung von sieben intakten Proteinen mittels monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule.

Säulen, 10 x 0.20 mm I.D. PS/DVB Anreicherungs- und Trennsäule; Beladungseluent, 0.10% wässrige HFBA Lösung; Beladungsdauer, 3 min; Beladungsflussrate, 10 μ l/min; mobile Phase, A) H₂O + 0.050% TFA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 15-50% B in 25 min; Flussrate, 750 nl/min (b); Temperatur, 25°C; Detektion, ESI-MS; Probe, jeweils 150 fmol Cytochrom C (2), Myoglobin (5), β -Lactoglobulin B (6), Transferrin (4), Carboanhydrase (7) und jeweils 300 fmol Ribonuklease A (1), Lysozym (3); Injektionsvolumen, 5.0 μ l.

Die molaren Proteinmassen wurden durch Dekonvolution der Spektren erhalten. Obwohl man für Transferrin ein sehr intensives Signal im rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramm erhielt, war das Signal-zu-Rauschen Verhältnis im extrahierten Massenspektrum sehr niedrig. Aus diesem Grund konnten auch keine eindeutigen Informationen über die molare Masse erhalten werden. Dieses Phänomen der selektiven Detektion bei massenspektrometrischen Analysen von Proteinen ist bekannt^[30;31] und könnte in diesem Fall durch ein speziell für den höheren m/z-Scanbereich angepasstes MS-Tuning überwunden werden^[32]. Dessen ungeachtet belegen die durchgeführten Experimente, dass die Kombination aus monolithischer PS-DVB Anreicherungs- und Trennsäule auch für die Aufkonzentrierung und Analyse von intakten Proteinen geeignet ist.

Als nächstes wurde anhand dieser Proteinmischung die Wiederfindung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen getestet. Hierfür wurden jeweils 300 fmol von Cytochrom C, Myoglobin, β -Lactoglobulin B, Transferrin und Carboanhydrase und jeweils 600 fmol von Ribonuklease A und Lysozym in drei unterschiedlichen Volumina, 1.0, 10 und 100 μ l, gelöst. Die resultierenden Proteinkonzentrationen lagen somit in einem Bereich von 3 bis 600 fmol/ μ l. Um die Proteinwiederfindung zwischen den drei unterschiedlich verdünnten Proben vergleichen zu können, wurden immer die gleichen Mengen an Protein in das System, bestehend aus Anreicherungs- und Trennsäule, injiziert. Nach dem Transfer der Proben zur monolithischen Trennsäule und anschließender Trennung wurden die Proteine mittels UV detektiert. Aus den gemessenen Chromatogrammen konnten dann, durch Integration der Peaks, die jeweiligen Peakflächen für den Vergleich der Wiederfindungen bestimmt werden. Abbildung 21 belegt, dass die Wiederfindung der Proteine nahezu unabhängig von der Konzentration ist. Für die 10- sowie 100-fache Verdünnung der Probe konnten durch äquivalente Erhöhung des Injektionsvolumens nahezu die gleichen Peakflächen für die einzelnen Proteine erhalten werden wie für die unverdünnte Proteinprobe. Die individuellen Peakflächen von β -Lactoglobulin und Carboanhydrase konnten aufgrund unzureichender Trennung (siehe Abbildung 20) nicht ausgewertet werden. Jedoch zumindest die Peakhöhen bzw. die gemeinsamen Peakflächen der beiden Peptide waren auch hier für alle Messungen vergleichbar. Es ist anzumerken, dass die 100 μ l Probevolumen aufgrund des verwendeten

Autosampler, dessen maximales Injektionslimit bei 20 μl lag, durch fünf aufeinander folgende Injektionen von 20 μl erfolgte.

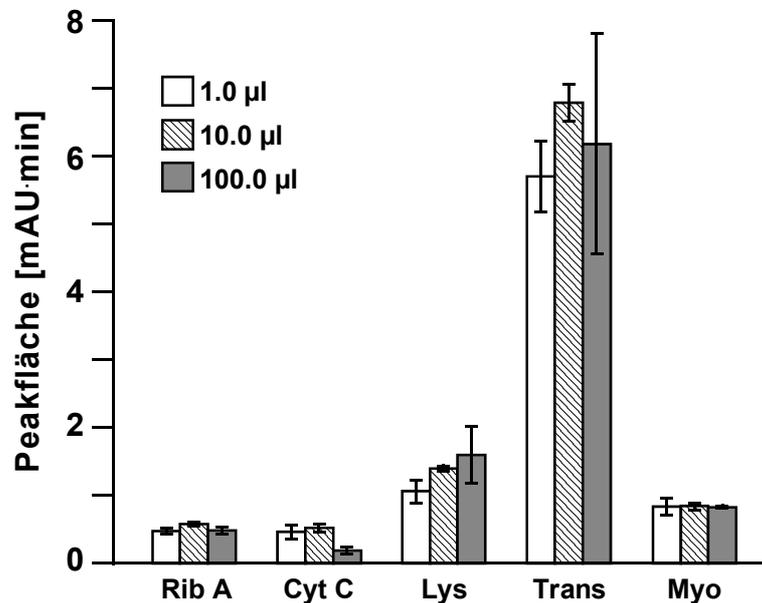


Abbildung 21. Aufkonzentrierung von konstanten Proteinmengen in unterschiedlichen Verdünnungen.

Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 300 fmol Cytochrom C (2), 300 fmol Myoglobin (5), 300 fmol β -Lactoglobulin B (6), 300 fmol Transferrin (4), 300 fmol Carboanhydrase (7), 600 fmol Ribonuklease A (1), 600 fmol Lysozym (3), gelöst in 1.0, 10.0, 100 μl H_2O + 0.050% TFA. Alle anderen Bedingungen entsprachen denen in Abbildung 20. Die aufgetragenen Peakflächen repräsentieren den Mittelwert von zwei Wiederholungsmessungen inklusive Spannweite.

Der Vorteil der Anreicherung spiegelt sich auch in den erhaltenen Trenneffizienzen wider. Für alle Proteine wurden unabhängig vom Injektionsvolumen nahezu die gleichen Peakhalbwertsbreiten erhalten (siehe Abbildung 22). Dieser Sachverhalt belegt, dass über die Aufkonzentrierung von stark verdünnten Proben an der monolithischen Anreicherungssäule, eine Volumenüberladung der Trennsäule vermieden werden kann. Lediglich die Peakhalbwertsbreiten von Transferrin und Myoglobin zeigten bei dem Injektionsvolumen von 100 μl größere Abweichungen. Da diese Werte jedoch extrem große Spannweiten aufweisen, kann man davon ausgehen, dass es sich bei jeweils einem der Werte der zwei Wiederholungsmessungen um einen Ausreißer handelt.

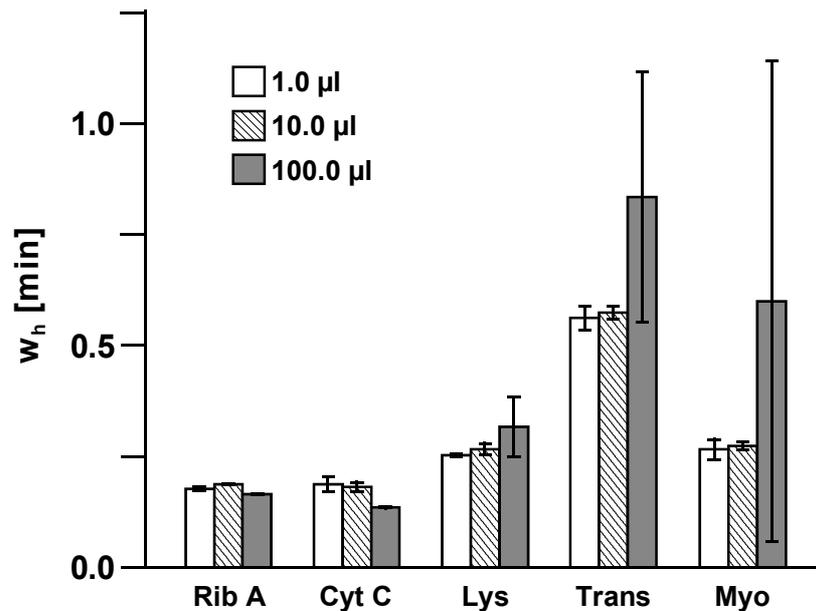


Abbildung 22. Erhaltene Peakhalbwertsbreiten (w_h) für die aufkonzentrierten Proteine.

Bedingungen, siehe Abbildung 21. Die aufgetragenen Peakhalbwertsbreiten repräsentieren den Mittelwert von zwei Wiederholungsmessungen inklusive Spannweite.

Diese Ergebnisse beweisen, dass auch große Probenvolumina ohne Verlust in der Wiederfindung von Analyten und ohne Abnahme der Effizienz der angekoppelten Trennsäule an der monolithischen Anreicherungsäule aufkonzentriert werden können. Diese Möglichkeit der Aufkonzentrierung von stark verdünnten Proben stellt neben dem Entsalzen von Proben die wichtigste Anwendung von Anreicherungsäulen dar.

Analysen des 9er Peptidstandards konnten die erhaltenen Ergebnisse auch für Peptide bestätigen (drei Wiederholungsmessungen). Hier lag die durchschnittliche Peakfläche der Peptide bei einer Konzentration von 0.5 ng/µl und einem Injektionsvolumen von 1.0 µl bei 0.07 mAU x min ($w_h = 0.04$ min). Die durchschnittlichen Peakflächen für eine 10-fach verdünnte Probe entsprachen bei einem Injektionsvolumen von 10 µl 0.09 mAU x min ($w_h = 0.06$ min).

Verwendung von unterschiedlichen Anteilen an Acetonitril im Beladungs-eluenten

In Kapitel 3.1.1 konnte bereits festgestellt werden, dass für die Kationenaustauschchromatographie mit der ProPac SCX Phase ein gewisser Anteil von organischen Lösungsmitteln zur Unterdrückung sekundärer solvophober Wechselwirkungen in den Eluenten nötig ist. Da für die zweidimensionalen Trennungen SCX-Fractionen gesammelt und anschließend mittels IP-RP-HPLC-MS analysiert werden sollten, wurde untersucht, inwiefern sich die Anwesenheit von Acetonitril in Proben auf die Trennperformance des Mikro-HPLC-Systems mit monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule auswirkt. Für dieses Experiment wurde der 9er Peptidstandard in Wasser und zum Vergleich in Wasser mit 5 Vol% Acetonitril aufgenommen. Diese beiden Proben wurden anschließend an der monolithischen Anreicherungssäule aufkonzentriert und nach Backflush Elution auf einer monolithischen 60 x 0.20 mm I.D. Säule getrennt. Die UV-Chromatogramme sind in Abbildung 23 dargestellt.

Abbildung 23(b) zeigt die Trennung des Peptidstandards, der in Wasser mit 5% Acetonitril gelöst war. Im Vergleich zur Trennung der Probe ohne Acetonitril (Abbildung 23(a)) erkennt man deutlich eine Abnahme der Trenneffizienz und Selektivität. Auch die Effizienz der Aufkonzentrierung an der Anreicherungssäule verschlechtert sich durch die Anwesenheit des organischen Lösungsmittels. Dies liegt daran, dass aufgrund des Acetonitrils die Retention der Peptide an der unpolaren PS-DVB Anreicherungssäule abnimmt. Dadurch besteht die Gefahr, dass gerade hydrophile Analyten während des Aufkonzentrierungsschrittes von der Anreicherungssäule eluieren und somit verloren gehen. Aus diesem Grund muss, wenn man für die SCX-Fraktionierung Acetonitril einsetzen will, der organische Anteil in den Probenlösungen bzw. Fraktionslösungen vor der IP-RP-HPLC Analyse entfernt werden. Eine Möglichkeit die sich hier bietet besteht darin, das gesamte Lösungsmittel, in dem die Probe vorliegt, zu verdampfen, um die Probe anschließend in reinem Wasser aufzunehmen. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass sie gerade bei hydrophoben Molekülen häufig zur irreversiblen Adsorption an den Wänden der Probenbehälter führt. Um dies zu vermeiden, ist es empfehlenswert die Proben nur bis auf ein bestimmtes Volumen einzuengen, in diesem Fall bis zur vollständigen Verdampfung des Acetonitril-Anteils in der wässrigen Lösung.

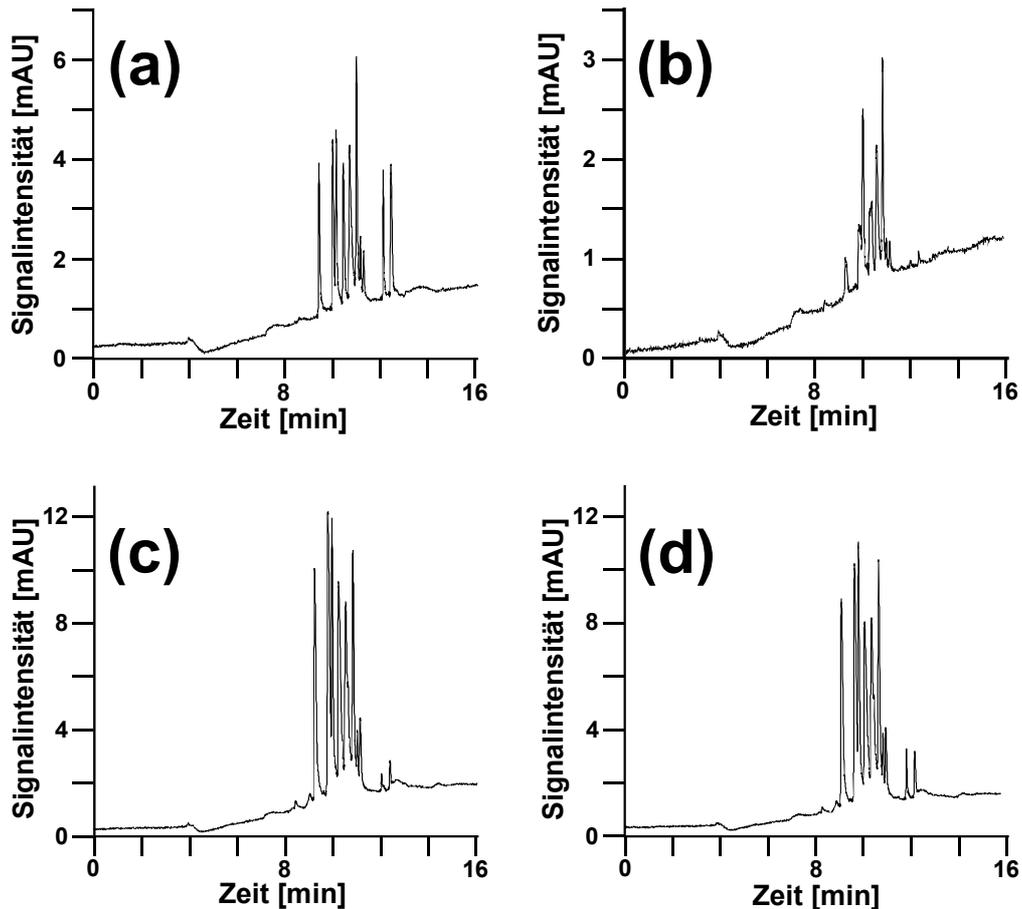


Abbildung 23. Einfluss des Acetonitrilgehalts in der Probe auf die Trennperformance mit monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule.

Säulen, PS-DVB Monolithen, 10 x 0.20 mm I.D. und 60 x 0.20 mm I.D.; Beladungseluent, 0.050% wässrige TFA Lösung; Beladungsdauer, 3 min; Beladungsflussrate, 10 $\mu\text{l}/\text{min}$; mobile Phase, A) H_2O + 0.050% TFA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 0-50% B in 15 min; Flussrate, 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$; Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 9er Peptidmischung, gelöst in H_2O + 0 (a, c) bzw. 5 Vol% ACN (b, d), jeweils 0.1 ng/ μl , 5-fach aufkonzentriert durch Verdampfung (c, d), 10 μl injiziert.

Da Wasser einen höheren Siedepunkt als Acetonitril besitzt (H_2O : $b_p = 100^\circ\text{C}$; ACN: $b_p = 81\text{-}82^\circ\text{C}$) und das binäre Gemisch erst bei einem Verhältnis von 15.88 Vol% H_2O zu 84.12 Vol% ACN ein azeotropes Gemisch bildet^[33], kann ein Gehalt von bis zu 80 Vol% Acetonitril durch Verdampfen aus einem Wasser/Acetonitril-Gemisch entfernt werden. Dies konnte auch für die Peptidprobe mit 5 Vol% Acetonitril bestätigt werden. Die Abbildung 23 zeigt die durch Evaporation 5-fach aufkonzentrierte

Peptidmischung, entweder mit (Abbildung 23 (d)) oder ohne Acetonitril (Abbildung 23 (c)). Damit die biologischen Proben beim Einengen des Volumens nicht zu hohen Temperaturen ausgesetzt werden mussten, wurden diese unter Vakuum mit Hilfe eines Vakuum-Konzentrators bei 30°C von 850 µl auf 170 µl aufkonzentriert. Beide UV-Chromatogramme weisen eine vergleichbare Effizienz und Selektivität der Peptidtrennungen auf, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass nach der 5-fachen Aufkonzentrierung kein Acetonitril in der entsprechenden Probe mehr vorhanden ist. Auch die Peakflächen der beiden Messungen sind nahezu identisch. Des Weiteren entsprechen diese Trennungen, abgesehen von den höheren Signalintensitäten bzw. Peakflächen, der Trennung in Abbildung 23 (a). Jedoch entspricht der Faktor der Aufkonzentrierung, ausgedrückt in den durchschnittlichen Peakflächen, nicht einem Wert von 5 sondern von 3, was durch partielle Adsorption der Peptide an der Oberfläche des verwendeten Probenbehälters erklärt werden kann.

Diese Experimente zeigen, dass ein Anteil von 5 Vol% Acetonitril in den Eluenten der starken Kationenaustauschchromatographie ohne Bedenken zur Fraktionierung eingesetzt werden kann, solange die gesammelten SCX-Fractionen vor der Reinjektion in die 2. Dimension zur IP-RP-Trennung über Evaporation aufkonzentriert werden. Weitere Experimente zur Probenaufkonzentrierung via Evaporation demonstrierten, dass Peptidproben durch 5-fache Reduktion ihres Volumens von bis zu 20 Vol% Acetonitril befreit werden können (Abbildung 24). Alle aufkonzentrierten Peptidproben (0-20 Vol% ACN) konnten nach der Backflush-Elution von der Anreicherungssäule mit der gleichen Effizienz und Selektivität an der monolithischen PS-DVB Säule getrennt werden. Die Peptide Bombesin und Substanz P, die normalerweise im hinteren Bereich der Chromatogramme eluieren, sind in manchen Chromatogrammen in Abbildung 24 nicht zu erkennen. Die Ursache hierfür ist jedoch nicht auf den Anteil an Acetonitril in der Probe oder auf die Evaporation der Probe zurückzuführen, sondern auf Adsorptionseffekte an den Wänden der Autosamplervials. Dieser Effekt konnte schon bei anderen Messungen mit diesem Peptidstandard beobachtet werden und kann durch die starke Hydrophobie der beiden Peptide erklärt werden.

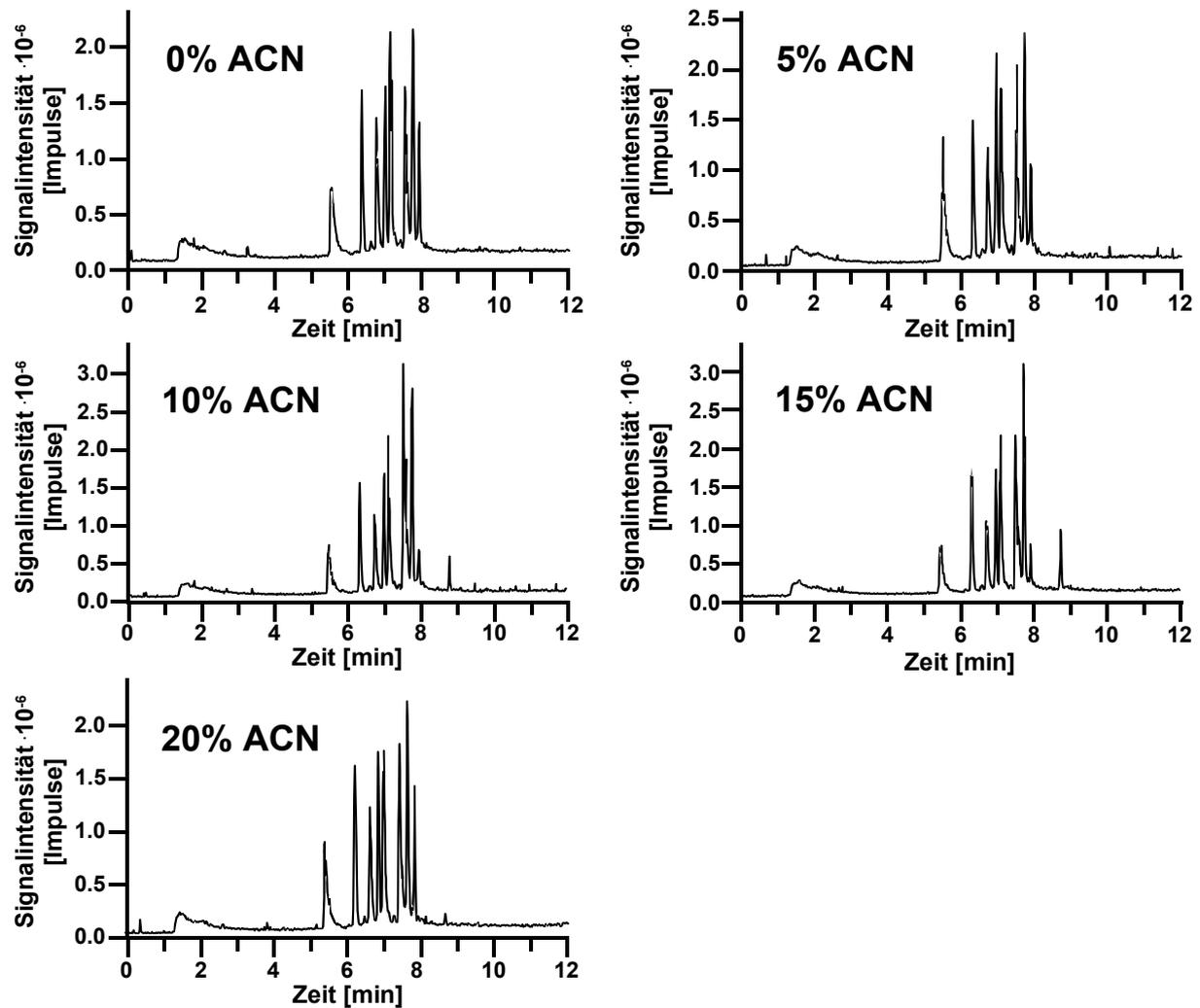


Abbildung 24. Aufkonzentrierung eines in Wasser mit verschiedenen hohen Volumenanteilen an Acetonitril gelösten Peptidstandards mit anschließender Trennung.

Säulen, PS-DVB Monolithen, 10 x 0.20 mm I.D. und 60 x 0.20 mm I.D.; Beladungseluent, 0.10% wässrige HFBA Lösung; Beladungsdauer, 3 min; Beladungsflussrate, 10 $\mu\text{l}/\text{min}$; mobile Phase, A) H_2O + 0.050% TFA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 0-50% B in 15 min; Flussrate, 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$; Temperatur, 25°C; Detektion, ESI-MS; Probe, 9er Peptidmischung, gelöst in H_2O + 0, 5, 10, 15 und 20% ACN (v:v), jeweils 0.1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 5-fach aufkonzentriert durch Verdampfung (1.0 ml auf 200 μl), 0.5 μl injiziert.

4. Zusammenfassung

Die durchgeführten Experimente zur Charakterisierung der individuellen Trenndimensionen erlauben eine umfassende Einschätzung des Leistungsvermögens der untersuchten SCX-Säulen sowie der getesteten Mikro-HPLC-Anlagen. Vergleicht man die Selektivität und Trennleistung der SCX-Säulen, so schneidet die analytische Säule mit den konventionellen Maßen (250 x 4.0 mm I.D.) am besten ab. Obwohl wir in der Lage waren die gleiche stationäre Phase auch in Kapillarsäulen zu packen, konnte die Performance der analytischen SCX-Säule nicht erreicht werden. Auch die Kapillarsäule der Firma Dionex (Poros 10S) konnte hier nicht überzeugen. Im Vergleich der SCX-Kapillarsäulen untereinander war ihre Effizienz bei der Trennung von Peptiden sogar schlechter als die der selbst hergestellten 250-mm SCX-Kapillarsäule. Aufgrund dieser Ergebnisse und der bereits oben genannten Vorteile entschieden wir uns für die Entwicklung einer off-line 2D-Methode mit zwei individuellen HPLC-Systemen, bestehend aus einem konventionellen HPLC-System mit analytischer ProPac SCX-Säule und einem Mikro-HPLC-System mit monolithischen Kapillarsäulen.

Durch die Experimente mit den Mikro-HPLC Anlagen, die für die 2. Dimension zur Verfügung standen, war es uns möglich deren Zuverlässigkeit bei der Probeninjektion, Fluss- und Gradientenerzeugung besser beurteilen zu können. Nicht unerwartet schneidet das Modell der neueren Generation insgesamt bei allen Tests deutlich besser ab. Zusätzlich ist bei dem Vergleich der beiden HPLC-Anlagen zu berücksichtigen, dass das UltiMate 3000 System fabrikneu war, wohingegen das UltiMate System schon über einen längeren Zeitraum in unserem Labor im Einsatz war. Des Weiteren gewährleistet das elektronisch geregelte Splitsystem im Gegensatz zum passiven Splitsystem, welches im UltiMate System verwendet wird, einen konstanten Fluss auch bei Änderungen in der Säulenpermeabilität. Auf der anderen Seite jedoch liegen die Ergebnisse für das Modell der älteren Generation auch alle in einem sehr guten Bereich, wodurch ein bedenklloser Einsatz in der 2. Dimension des 2D-Systems gewährleistet ist. Lediglich für quantitative Messungen sollte die UltiMate Anlage bzw. der Autosampler (Famos) nochmals optimiert werden. Ansonsten ist die Linearität des Injektionsvolumen, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Gradientenbildung, die Flusskonstanz im $\mu\text{l}/\text{min}$ -Bereich und die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten zufriedenstellend gewährleistet. Auch

die Verschleppung von Probe über mehrere Injektionen hinweg sollte bei den herkömmlichen injizierten Probenmengen in der Mikro-HPLC keine Probleme bereiten. Trotzdem sollte zur prinzipiellen Vermeidung von Probenverschleppung eine regelmäßige Kontrolle durch Messungen von Blindproben erfolgen.

Bezüglich der Entwicklung einer monolithischen Anreicherungsäule ist es uns im Rahmen dieser Arbeit gelungen eine Säulhalterung zu konstruieren, die es ermöglicht Kapillarsäulen mit einem Außendurchmesser von 360 μm und Längen von 3 – 10 mm zu fixieren und leckfrei mit entsprechenden Zu- und Ableitungskapillaren zu verbinden. Mit Hilfe dieses Setup können die Anreicherungsäulen über den Anschluss an entsprechende Schaltventile in HPLC-Systeme eingebunden werden. Obwohl eine Vielzahl von Anreicherungsäulen mit entsprechenden Halterungen bei unterschiedlichen Anbietern kommerziell verfügbar ist, standen bisher für die Kopplung mit monolithischen Kapillarsäulen keine geeigneten Anreicherungsäulen zur Verfügung.

In den durchgeführten Experimenten zeichnete sich die Anreicherungsäule durch eine hohe Robustheit und Druckstabilität aus. Große Extrasäulenvolumina zwischen der Anreicherungsäule und den Kapillaranschlüssen, hervorgerufen durch unsaubere Kopplung, konnten anhand der erhaltenen Trennleistung einer Peptidanalyse ausgeschlossen werden. Auch die Beladbarkeit der 10 x 0.20 mm I.D. monolithischen PS-DVB Säule für Peptide und Proteine erwies sich als optimal geeignet für die Kombination mit 60 x 0.20 bzw. 0.10 mm I.D. monolithischen Trennsäulen und der ESI-Massenspektrometrie.

Mit den aus den Experimenten gewonnen Erkenntnissen konnten wir nun einen Schritt weitergehen und die Kombination von monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule realisieren und anschließend charakterisieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination der beiden Säulen eine Erhöhung der Trenneffizienz erzielt werden kann. Für diese Steigerung der Trennleistung kann die zusätzliche Fokussierung der Analyten an der Anreicherungsäule verantwortlich gemacht werden. Der positive Einfluss der 10 x 0.20 mm I.D. Anreicherungsäule konnte sowohl für die Kopplung mit 0.20 mm I.D. als auch 0.10 mm I.D. Trennsäulen belegt werden. Des Weiteren ergaben die durchgeführten Experimente mit dem gekoppelten System aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule, dass auch stark verdünnte Proben, bestehend aus Proteinen oder Peptiden, mit einer hohen

Wiederfindungsrate aufkonzentriert und analysiert werden können. Abschließend wurde eine Möglichkeit zur Entfernung von organischen Lösungsmitteln aus wässrigen Probemischungen vorgestellt. Über Evaporation konnten bis zu 20 Vol% Acetonitril aus wässrigen Proben entfernt werden, was sich durch eine anschließende IP-RP-Analyse mit dem gekoppelten System aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule beweisen ließ. Dieser Versuch bezog sich auf die starke Kationenaustauschchromatographie, bei der es notwendig ist, gewisse Mengen an organischen Lösungsmitteln den Eluenten zuzugeben, um sekundäre solvophobe Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase zu unterdrücken. Will man die SCX-Fraktionen zusätzlich noch über IP-RP-HPLC auftrennen (2D-System), müssen die organischen Anteile in den Probenfraktionen entfernt werden.

5. Literatur

1. G. Mitulovic, C. Stingl, M. Smoluch, R. Swart, J. P. Chervet, I. Steinmacher, C. Gerner, K. Mechtler, *Proteomics*, 4 (2004), 2545-57.
2. J. K. Eng, A. L. McCormack, J. R. I. Yates, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 5 (1994), 976-989.
3. Y. Shen, J. M. Jacobs, D. G. Camp 2nd, R. Fang, R. J. Moore, R. D. Smith, W. Xiao, R. W. Davis, R. G. Tompkins, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 1134-44.
4. M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, J. C. Gebler, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005), 1694-703.
5. H. Kimura, T. Tanigawa, H. Morisaka, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, M. Ueda, K. Cabrera, N. Tanaka, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004), 897-904.
6. M. Vollmer, P. Hörth, E. Nägele, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 5180-5.
7. W. J. Qian, J. M. Jacobs, D. G. Camp 2nd, M. E. Monroe, R. J. Moore, M. A. Gritsenko, S. E. Calvano, S. F. Lowry, W. Xiao, L. L. Moldawer, R. W. Davis, R. G. Tompkins, R. D. Smith, *Proteomics*, 5 (2005), 572-84.
8. J. Masuda, D. M. Maynard, M. Nishimura, T. Ueda, J. A. Kowalak, S. P. Markey, *J. Chromatogr. A*, 1063 (2005), 57-69.
9. D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 5683-5690.
10. C. G. Huber, A. Premstaller, *J. Chromatogr. A*, 849 (1999), 161-173.
11. W. Walcher, H. Toll, A. Ingendoh, C. G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 1053 (2004), 107-117.
12. I. Gusev, X. Huang, C. Horváth, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999), 273-290.
13. A. R. Ivanov, L. Zang, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 75 (2003), 5306-16.
14. A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A.-M. Timperio, L. Zolla, J.-P. Chervet, N. Cavusoglu, A. Van Dorsselaer, C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 73

- (2001), 2390-2396.
15. M. T. Davis, J. Beierle, E. T. Bures, M. D. McGinley, J. Mort, J. H. Robinson, C. S. Spahr, W. Yu, R. Luethy, S. D. Patterson, *J. Chromatogr. B*, 752 (2001), 281-91.
 16. G. J. Opiteck, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem.*, 69 (1997), 1518-1524.
 17. Q. C. Wang, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 65 (1993), 2243-2248.
 18. S. Xie, R. W. Allington, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, 865 (1999), 169-74.
 19. Q. C. Wang, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, 669 (1994), 230-235.
 20. X. Huang, S. Zhang, G. A. Schultz, J. Henion, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 2336-44.
 21. C. G. Huber, A. Premstaller, W. Xiao, H. Oberacher, G. K. Bonn, P. J. Oefner, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 47 (2001), 5-19.
 22. A. Premstaller, H. Oberacher, C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 72 (2000), 4386-4393.
 23. H. Oberacher, A. Premstaller, C. G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004), 201-8.
 24. Lamotte, S., Universität des Saarlandes, 1998.
 25. J. L. Liao, Y. M. Li, S. Hjerten, *Anal. Biochem.*, 234 (1996), 27-30.
 26. F. Svec, E. C. Peters, D. Sykora, J. M. Frechet, *J. Chromatogr. A*, 887 (2000), 3-29.
 27. H. Oberacher, C. G. Huber, *TRAC*, 21 (2002), 166-173.
 28. C. G. Huber, W. Walcher, A.-M. Timperio, S. Troiani, A. Porceddu, L. Zolla, *Proteomics*, 4 (2004), 3909-3920.
 29. S. Hjerten, J.-L. Liao, R. Zhang, *J. Chromatogr.*, 473 (1989), 273-275.
 30. S. Vaidyanathan, D. B. Kell, R. Goodacre, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 5024-32.

31. Toll, H., Universität des Saarlandes, 2005.
32. H. Oberacher, W. Walcher, C. G. Huber, *J. Mass Spectrom.*, 38 (2003), 108-116.
33. A. L. Liberman, Z. N. Parnes, D. N. Kursanov, *Bull. Acad. Sci. U.R.S.S., Classe Sci. Chim.* (1948), 101-106.

Kapitel IV

Evaluierung und Optimierung des
zweidimensionalen HPLC-Systems

IV. Evaluierung und Optimierung des zweidimensionalen HPLC Systems

1. Einleitung

Nach der individuellen Entwicklung und Charakterisierung der chromatographischen Systeme (starke Kationenaustausch- und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie) sollte die zweidimensionale off-line Kombination der beiden Trenntechniken evaluiert und anschließend optimiert werden. Der instrumentelle Aufbau des zweidimensionalen off-line Trennsystems ist in Abbildung 1 gezeigt. In der 1. Dimension werden die einzelnen Probefractionen in bestimmten Zeitabständen gesammelt. Diese Fraktionierung kann zusätzlich über UV-Detektion verfolgt werden. Die gesammelten Fraktionen werden anschließend in die 2. Dimension überführt, wo sie zuerst auf einer so genannten Anreicherungssäule aufkonzentriert und entsalzen werden. Danach werden sie im Backflush-Modus von der Anreicherungssäule auf die analytische Trennsäule transferiert, wo sie nochmals aufgetrennt und abschließend mittels Massenspektrometer detektiert und identifiziert werden.

Zur Charakterisierung des zweidimensionalen HPLC-Systems sollten Proteinverdauere mit bekannter Zusammensetzung und unterschiedlichen dynamischen Konzentrationsbereichen verwendet werden. Über die Anzahl und Qualität der über Tandem-Massenspektrometrie und Datenbankrecherche erhaltenen Peptid- bzw. Proteinidentifikationen sollte anschließend die Performance des entwickelten HPLC-Systems genau beurteilt werden.

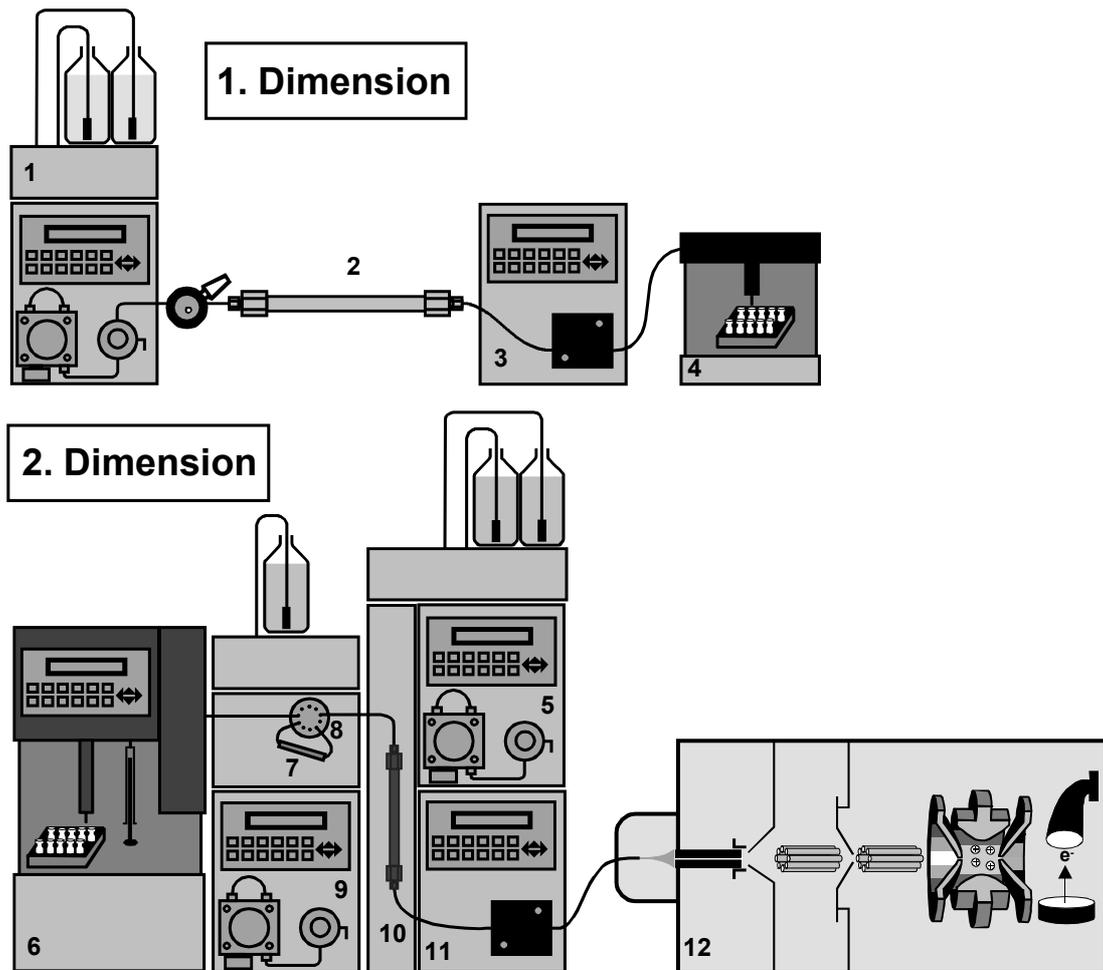


Abbildung 1. Instrumenteller Aufbau eines zweidimensionalen chromatographischen Trennsystems gekoppelt mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer.

1. Dimension: 1, Pumpenmodul; 2, Trennsäule; 3, UV-Detektor; 4, Fraktionensammler.

2. Dimension: 6, Autosampler; 7, Entsalzungs-/Aufkonzentrierungssäule; 8, 10-Wege Ventil; 9, Pumpenmodul zum Entsalzen und Aufkonzentrieren; 10, Trennsäule; 11, UV-Detektor; 12, Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer.

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Materialien

Acetonitril (E Chromasolv), Nonafluorpentansäure (NFPA), Dithiothreitol (min. 99%), 2-Mercaptoethanol (> 98%), benzoyleierte Dialyseschläuche (Ausschlussgrenze: $M \approx 2000$ Da), Cytochrom C (Typ V-A, Rinderherz), Carboanhydrase (Rind), Serum Albumin (Rind, $\geq 97\%$), β -Lactoglobulin A (Rindermilch), Catalase (Rinderleber), Lysozym (Hühnereiweiß, 95%), Myoglobin (Pferd, 95-100%), Ribonuklease A (Typ I-AS, Rinderbauchspeicheldrüse, 85%), Transferrin (Rind, 98%), α -Lactalbumin (Typ I, Rindermilch, 85%) und eine Mischung aus neun bioaktiven Peptiden (P2693 mit Bradykinin Fragment 1-5, Oxytocin, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, [Arg⁸]-Vasopressin, Bombesin, Luteinizing Hormone Releasing Hormone, Bradykinin, Substanz P) wurden bei Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) gekauft. Harnstoff ($\geq 99.5\%$), Ammoniumhydrogencarbonat ($\geq 99.5\%$), Iodessigsäure ($\geq 99.5\%$), Trifluoressigsäure (TFA, $\geq 99.5\%$), Pentafluorpropionsäure (PFPA, $\geq 97.0\%$), Heptafluorbuttersäure (HFBA, $\geq 99.0\%$) und Undecafluorhexansäure (UdFHA, $\geq 97.0\%$) waren von Fluka (Buchs, Schweiz). Natriumdihydrogenphosphat (p. a.) wurde bei Merck (Darmstadt, Deutschland) und Natriumchlorid (p. a.) bei Grüssing (Filsum, Deutschland) gekauft. Modifiziertes Trypsin für den enzymatischen Proteinverdau wurde von Promega (Madison, WI, USA) bezogen. Das in den Experimenten verwendete Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Schweiz) aufbereitet.

Die Quarzkapillaren waren von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) und die PEEK Kapillaren, Sleeves, Unions und Fittings waren von Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA).

2.2 Enzymatischer Proteinverdau

Zur Herstellung der tryptischen Verdaue wurden 2 mg Cytochrom C, Carboanhydrase, β -Lactoglobulin A, Catalase, Lysozym, Myoglobin, Ribonuklease A, Transferrin, α -Lactalbumin und 5 mg BSA jeweils in 1.0 ml einer Lösung von 8 mol/l Harnstoff und 0.5 mol/l Ammoniumhydrogencarbonat gelöst. Diese einzelnen Stammlösungen besaßen folgende Proteinkonzentrationen: Cytochrom C, 161.8

pmol/μl; Carboanhydrase, 68.9 pmol/μl; β-Lactoglobulin A, 108.9 pmol/μl; Catalase, 34.7 pmol/μl; Lysozym, 139.8 pmol/μl; Myoglobin, 118.0 pmol/μl; Ribonuklease A, 146.2 pmol/μl; Transferrin, 25.1 pmol/μl; α-Lactalbumin, 141.0 pmol/μl; BSA, 75.2 pmol/μl. Entsprechende Volumina dieser zehn Stocklösungen wurden miteinander zu einem Gesamtvolumen von 1.0 ml gemischt, so dass insgesamt drei verschiedene Proteinmischungen resultierten, welche sich lediglich in den Konzentrationsverhältnissen der zehn Proteine unterschieden (Tabelle 1). Unter Schütteln wurden die Proteinmischungen 30 min lang bei 37°C denaturiert. Die Disulfidbrücken der Proteine wurden durch Zugabe von 50 μl einer 0.30 mol/l wässrigen Dithiothreitol-Lösung für 4 h bei 37°C in einem Thermomixer (Modell Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) reduziert und anschließend mit 2.0 M Iodessigsäure (20 μl) für 15 min bei Raumtemperatur carboxymethyliert. Das überschüssige Alkylierungsmittel wurde durch Zugabe von 40 μl einer 1.0 M 2-Mercaptoethanol-Lösung entfernt (15 min). Die Aufreinigung der Lösung erfolgte mittels 12-stündiger Dialyse gegen 1.0 l destilliertes Wasser. Hierfür wurden die Proteinlösungen quantitativ in spezielle Dialyseschläuche (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 2000 Da überführt. Die dialysierten Proteinlösungen wurden anschließend mit jeweils 30 μg Trypsin, welches zuvor für 30 min bei 37°C in einer 50 mM Essigsäure-Lösung (jeweils 30 μl) aktiviert wurde, enzymatisch verdaut. Die VerdauprozEDUREN wurden abschließend durch Zugabe von 1 Vol% Trifluoressigsäure abgebrochen.

Neben diesen Proteinverdauen wurde zusätzlich noch der tryptische Serum Albumin (Rind) Verdau aus Kapitel III in den Experimenten eingesetzt.

2.3 Geräte

Das HPLC-System für die Kationenaustauschchromatographie bestand aus einer Niederdruck-Gradienten Pumpe (Modell HP1050, Agilent, Waldbronn, Deutschland), einem manuellen Injektor mit 20 μl Probenschleife (Modell 7125, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), einem UV-Detektor mit 10 μl Flusszelle (Modell 2487, Waters, Milford, MA, USA) und einer starken Kationenaustauschersäule mit pellicularen Poly(Ethylstyrol-Divinylbenzol) Partikeln (ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D., Dionex, Idstein, Deutschland). Die Entgasung der Eluenten erfolgte mit Helium.

Für die IP-RP-HPLC wurde ein UltiMate Capillary/Nano LC System von LCPackings – A Dionex Company (Amsterdam, Niederlande) eingesetzt. Dieses System beinhaltet eine UltiMate Anlage mit Mikro-Niederdruck-Gradienten-Pumpe, passivem Flusssplit-System, Säulenofen, UV-Detektor (Modell UVD 3000) und Helium-Entgasungsmodul, eine Switchos Anlage mit Säulenschaltmodul, Beladungspumpe und zwei 10-Wege Ventilen und eine Famos Anlage als Mikro-Autosampler. Die Anreicherungs- (10 x 0.20 mm I.D.) und Trennsäule (60 x 0.20 mm I.D.), für die Aufkonzentrierung der SCX-Fraktionen und anschließende IP-RP-Trennung, enthielten eine monolithische stationäre Phase basierend auf Poly(Styrol-Divinylbenzol) und wurden nach dem Protokoll von Premstaller et al.^[1] angefertigt (auch kommerziell bei LC Packings – A Dionex Company erhältlich). Die monolithischen Säulen waren über ein 10-Wege Ventil so miteinander gekoppelt, dass die Proben an der Anreicherungs säule aufkonzentriert und anschließend im Backflush-Modus zur Trennsäule transferiert werden konnten. Zur Detektion wurde entweder der UV-Detektor (Modell UVD 3000) mit einer 3 nl Detektionszelle oder ein Elektrospray-Ionenfallen Massenspektrometer von Bruker Daltonics (Modell Esquire HCT, Bremen, Deutschland) mit modifizierter ESI-Quelle (Spraynadel: Quarzkapillare, 0.090 mm O.D., 0.020 mm I.D.) benutzt. Folgende massenspektrometrische Parameter wurden für die Fullscan-Analysen eingestellt: Scanmodus, Ultrascan (50 – 3000 m/z); Scangeschwindigkeit, 26000 m/z pro s; Fullscan, 500 – 1500 m/z; Ionenpolarität, positiv; Trap drive, 93.2; Oktapol RF Amplitude, 88.5 Vpp; Linse 2, -36.1 V; Kapillarenausgang, 253.8 V; Temperatur der Glaskapillare, 300°C; Nebulizerspray, 20 psi; Trockengas, 4 l/min; Elektrosprayspannung, -3500 V; Offset der Endplatte, -500 V; ICC, 70000; maximale Akkumulationszeit, 200 ms; Scans pro Spektrum, 5. Für die automatische Peptididentifizierung über Tandem Massenspektrometrie wurden zusätzlich noch die nachfolgenden Einstellungen verwendet: Precursor-Ionen Auto MS(n), 2 bzw. 3; MS/MS Scanbereich, 200-2000 m/z; aktiver Ausschluss, nach 1 bzw. 2 Spektren für 0.40 bzw. 0.50 min; MS/MS Fragmentierungsamplitude, 1.5 V; Smart Fragmentierung, on (30-200%); absoluter MS/MS Schwellenwert, 4000 bzw. 6000. Zum Aufkonzentrieren der gesammelten SCX-Fraktionen wurde ein Vakuum-Konzentrator von Eppendorf (Model 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) benutzt.

2.4 Computerunterstützte Datenauswertung der Massenspektren

Die Datenbankrecherchen zur Peptididentifikation wurden mit der Biotoools Software 2.2 von Bruker (Bremen, Deutschland) und der Mascot Software 2.0 von Matrix Science (London, Großbritannien), welche auf dem MOWSE (Molecular Weight Search) Algorithmus basiert^[2;3], durchgeführt. Alle aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden mit theoretisch berechneten MS/MS-Spektren aus der MSDB (Mass Spectrometry Protein Sequence DataBase) Datenbank verglichen. Folgende Suchkriterien wurden ausgewählt: Taxonomy, Chordata (Wirbeltiere und Verwandte); feststehende Modifikation, carboxymethyliert; Protease, Trypsin; Peptid-Toleranz, ± 1.3 Da; MS/MS-Toleranz, ± 0.3 Da; maximale Anzahl an missed cleavages, 2.

Die über Datenbanksuche zugeordneten Peptide galten ab einem MOWSE Score von 15 als positiv identifiziert. Obwohl dieser Grenzwert für Peptididentifikationen relativ niedrig ist, kann man falsch positive Zuordnungen nahezu ausschließen, da die Zusammensetzung der untersuchten Proben bekannt ist.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Evaluierung der Kopplung aus Kationenaustausch- und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie

Als Proben wurden für die Evaluierung des 2D-Systems drei Verdauungen aus zehn Standardproteinen (Cytochrom C, Carboanhydrase, Serum Albumin, β -Lactoglobulin A, Catalase, Lysozym, Myoglobin, Ribonuklease A, Transferrin, α -Lactalbumin) eingesetzt. Diese Proben boten den Vorteil, dass auf der einen Seite ihre genauen Bestandteile im Gegensatz zu „realen“ biologischen Proben bekannt waren, sie aber auf der anderen Seite dennoch eine gewisse Komplexität aufwiesen, um eine umfangreiche Charakterisierung des 2D-Systems zu gewährleisten. Des Weiteren enthielten die drei Verdauungen die zehn Proteine in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen, um den Einfluss des dynamischen Bereichs auf die Peptid- bzw. Proteinidentifikation untersuchen zu können. Die genauen Zusammensetzungen der Verdauungen sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1. Molare Zusammensetzung der drei verdauten Proteinmischungen.

Protein	Konzentration [pmol/ μ l]		
	Verdau 1	Verdau 2 ^{a)}	Verdau 3
Cytochrom C	0.49	16.18	64.72
Serum Albumin	52.60	7.51	0.38
β -Lactoglobulin A	10.89	10.89	10.89
Carboanhydrase	6.89	6.89	6.89
Catalase	1.74	3.47	3.47
Lysozym	1.40	13.98	1.40
Myoglobin	0.29	11.80	0.59
Ribonuklease A	0.73	14.62	0.73
Transferrin	0.13	2.51	0.13
α -Lactalbumin	2.82	14.10	28.21

^{a)} Verdau 2/10 stellt eine 10-fache Verdünnung von Verdau 2 dar

Die Proteinmischung 1 enthielt das 66 kDa Protein Serum Albumin in einer relativ hohen Konzentration von 52.6 pmol/ μ l, wodurch es gegenüber den anderen Proteinen, welche in wesentlich geringeren Konzentrationen vorlagen, als eine Art von Matrix wirkte. Das Protein mit der geringsten Konzentration in dieser Mischung war Transferrin mit 0.13 pmol/ μ l. Daraus resultierte ein dynamischer Bereich in den molaren Konzentrationen von 1:400. Die Mischung 2 enthielt alle Proteine in einer relativ homogenen Konzentrationsverteilung, die zwischen 2.5 und 16.2 pmol/ μ l lag (dynamischer Bereich, 1:7). Mit dieser Mischung sollte die Performance des 2D-Systems für die Peptidentifikation von komplexen und nahezu äquimolaren Mischungen untersucht werden. Die Konzentrationsabhängigkeit der Peptidentifikation wurde zusätzlich, durch die Analyse einer 10-fach verdünnten Probe von Mischung 2, überprüft. Die dritte Proteinmischung wurde so angesetzt, dass, im Gegensatz zur Mischung 1, die eher kleinen Proteine Cytochrom C und α -Lactalbumin in verhältnismäßig hohen Konzentrationen vorlagen. Der dynamische Bereich der molaren Konzentrationen lag hier bei 1:650. Die theoretische Anzahl an tryptischen Peptiden mit einer molaren Masse größer als 500 Da (untere Grenze des verwendeten MS-Fullscan Bereichs) liegt für die Verdauung der 10er Proteinmischungen bei 228, wenn man davon ausgeht, dass alle Proteine quantitativ (0 missed cleavages) gespalten werden. Da es manchmal jedoch vorkommt, dass Proteine nur partiell gespalten werden (1 bzw. 2 missed cleavages), kann man schätzungsweise ungefähr 300 unterschiedliche tryptische Peptide in den Mischungen erwarten.

Diese Mischungen wurden mit dem entwickelten off-line 2D-HPLC-System, bestehend aus starker Kationenaustauschchromatographie in der 1. Dimension und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie mit monolithischen PS-DVB Säulen in der 2. Dimension, und Tandem Massenspektrometrie mit anschließender Datenbankrecherche analysiert. Ziel war es, anhand der erhaltenen Peptidentifikationsdaten, das 2D-System detailliert zu charakterisieren. Da die Zusammensetzung der hier verwendeten Proben genauestens bekannt war, eigneten sich diese ideal für die Ermittlung der Qualität der Peptid- bzw. Proteinidentifikationen für das 2D-System. Mit Hilfe dieser Daten war es anschließend möglich, die Trennperformance des 2D-Systems auch mit einem herkömmlichen eindimensionalen HPLC-System zu vergleichen. Neben der Sequenzabdeckung der einzelnen Proteine konnten anhand der identifizierten

Peptide auch die Verschleppung von Peptiden über mehrere SCX-Fraktionen, der Einfluss des molaren dynamischen Bereichs und die Reproduzierbarkeit der Peptididentifikationen bestimmt werden.

3.1.1 Zweidimensionale Analyse (SCX x IP-RP) der 10er Protein-verdaue

Jeweils 20 µl von Proteinverdau 1, 2, 2/10 und 3 wurden mittels starker Kationenaustauschchromatographie in einer ProPac SCX-10 Säule aufgetrennt. Die Trennungen, welche über UV-Detektion kontrolliert wurden, erfolgten mit einem segmentierten 25-min Natriumchloridgradienten. Der Salzgradient konnte durch Vorversuche für die Trennung der zehn verdauten Proteine optimiert werden. Er bestand aus drei Segmenten mit jeweils unterschiedlichen Steigungen. Dies gewährleistete eine breite Verteilung der Peptide über die gesamte Trennung hinweg. Gerade die ersten beiden Segmente besaßen eine relativ geringe Steigung, um eine möglichst große Auftrennung der ein- und zweifach positiv geladenen Peptide, welche überwiegend in den ersten Minuten eluieren, zu erreichen. Ab dem Injektionspeak bei Minute eins wurden die SCX-Fraktionen in Abständen von einer Minute manuell in 1.5 ml Reaktionsgefäßen von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) gesammelt. Bei dem eingestellten Fluss (1.0 ml/min) und Salzgradienten resultierten somit 29 Fraktionen à 1.0 ml. Die UV-Chromatogramme der SCX-Trennungen für alle vier Proteinverdaue sind in Abbildung 2 aufgeführt. Die eingezeichneten Balken repräsentieren die gesammelten 1-min Fraktionen.

Das Erreichen einer relativ gleichmäßigen Verteilung der Peptide über die gesamte SCX-Trennung kann durch die Chromatogramme in Abbildung 2 bestätigt werden. Neben vereinzelt aufgelösten Peaks, welche besonders für die beiden Verdaue mit den hoch-abundanten Peptiden erhalten werden, weisen die UV-Chromatogramme viele unaufgelöste oder nur teilweise aufgelöste Peaks auf. Dadurch wird ersichtlich, dass man allein mit der starken Kationenaustauschchromatographie nicht in der Lage ist, alle Komponenten der komplexen Peptidmischungen vollständig aufzutrennen. Aus diesem Grund ist der Einsatz einer zweiten Trenndimension, deren Trennmechanismus auf anderen, im besten Fall orthogonalen, chemisch-physikalischen Moleküleigenschaften beruht, erforderlich.

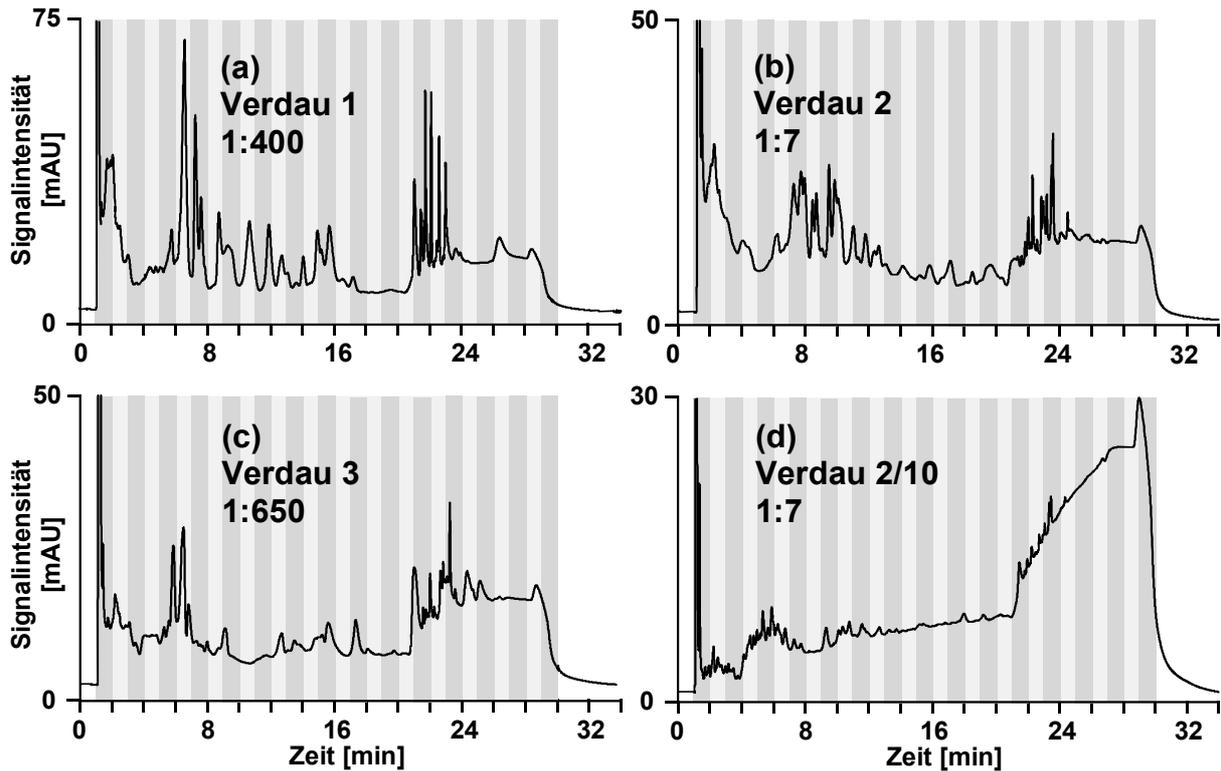


Abbildung 2. Starke Kationenaustausch-Fraktionierung der Proteinverdau.

Säule, ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D.; mobile Phase, A) 5.0 mmol/l wässriger NaH_2PO_4 Puffer mit 5.0% Acetonitril, pH 3.0, B) 0.50 mol/l NaCl in Eluent A); Gradient, 0-2% B in 5.0 min, 2-10% B in 14 min, 10-100% B in 6 min; Flussrate, 1.0 ml/min; Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, tryptischer Verdau 1, 2, 2/10 und 3 (siehe Tabelle 1); Injektionsvolumen, 20 μl ; Fraktionierung, 1-min Fraktionen, insgesamt 29 Fraktionen.

Nach der SCX-Trennung wurden die 1000- μl Fraktionen über Evaporation auf 200 μl eingengt. Das Einengen war nicht nur wichtig für die Aufkonzentrierung der gesammelten Proben vor der Injektion in die zweite Trenndimension, sondern auch um die 5% Acetonitril, welche sich in den SCX-Eluenten befanden, aus den Fraktionen zu entfernen. Pro Fraktion wurden jeweils 10 μl in die zweite Dimension injiziert. Hier wurden die Fraktionen zuerst für 5 min bei einer Beladungsflussrate von 10.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf einer 10 x 0.20 mm I.D. monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule entsalzt und aufkonzentriert. Nach Elution der fokussierten Peptide im Backflush Modus auf eine 60 x 0.20 mm I.D. monolithische Säule, wurden diese dort bei einer Flussrate von 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit einem relativ steilen, linearen Acetonitrilgradienten (0 – 50% ACN in 20 min) getrennt und anschließend mittels ESI-MS/MS identifiziert. Geht

man von dem Idealfall einer 100%igen Peptidwiederfindung nach der SCX-Fraktionierung aus, so entspricht die Probenmenge, die in die zweite Trenndimension injiziert wurde, 1/20 der Probenmenge, die in der ersten Dimension aufgegeben wurde. Um die Reproduzierbarkeit der Peptididentifizierung für die zweite Dimension untersuchen zu können, wurde jede der SCX-Faktionen insgesamt dreimal analysiert. Abbildung 3 zeigt exemplarisch sieben rekonstruierte Total-Ionenstrom Chromatogramme der IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen von Proteinverdau 2. Die Übereinanderlegung dieser Chromatogramme beweist eindeutig, dass die Trenntechniken der angewendeten HPLC-Methoden orthogonal zueinander sind. Die Peptide sind für alle SCX-Faktionen über den gesamten Bereich der IP-RP-HPLC Trennung verteilt und zeigen keinerlei gegenseitige Abhängigkeiten im Retentionsverhalten.

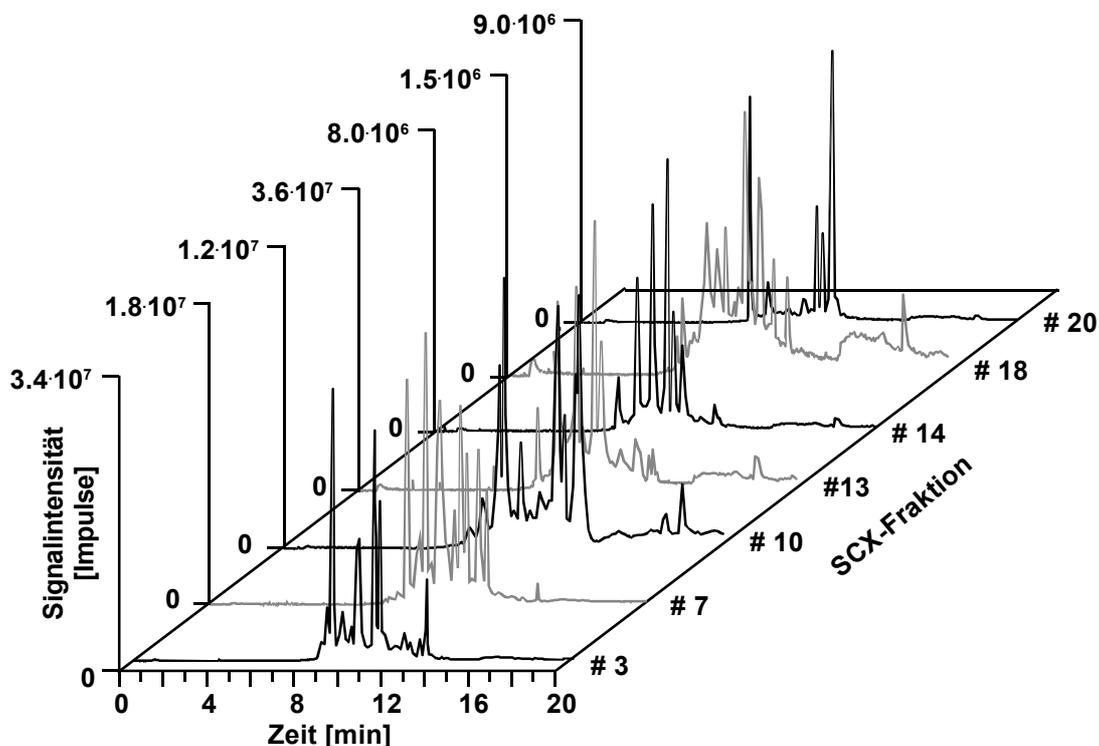


Abbildung 3. Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC-ESI-MS/MS Analysen von SCX-Faktionen von Verdau 2.

Säulen, 10 und 60 x 0.20 mm I.D. PS/DVB-Monolithen; Beladungseluent, 0.050% wässrige Trifluoressigsäure, Beladungsdauer, 5 min; Beladungsflussrate, 10 µl/min; mobile Phase, A) 0.050% wässrige Trifluoressigsäure, B) 0.050% Trifluoressigsäure in Acetonitril; Gradient, 0-50% B in 20 min; Flussrate, 2.0 µl/min; Temperatur von Anreicherungs- und Trennsäule, 25°C; Detektion, ESI-MS/MS; Probe, tryptische Peptide von Verdau 2, SCX-Fraktion 3, 7, 10, 13, 14, 18, 20; 10 µl injiziert.

3.1.2 Peptid- und Proteinidentifizierung

Die gemessenen MS/MS-Spektren wurden anschließend über Datenbankrecherche mit der Mascot Software (genaue Parameter, siehe Experimenteller Teil) ausgewertet. Die Anzahl der pro Verdau identifizierten Peptide und die daraus berechneten Proteinsequenzabdeckungen sind in den Balkendiagrammen in Abbildung 4 zusammengefasst.

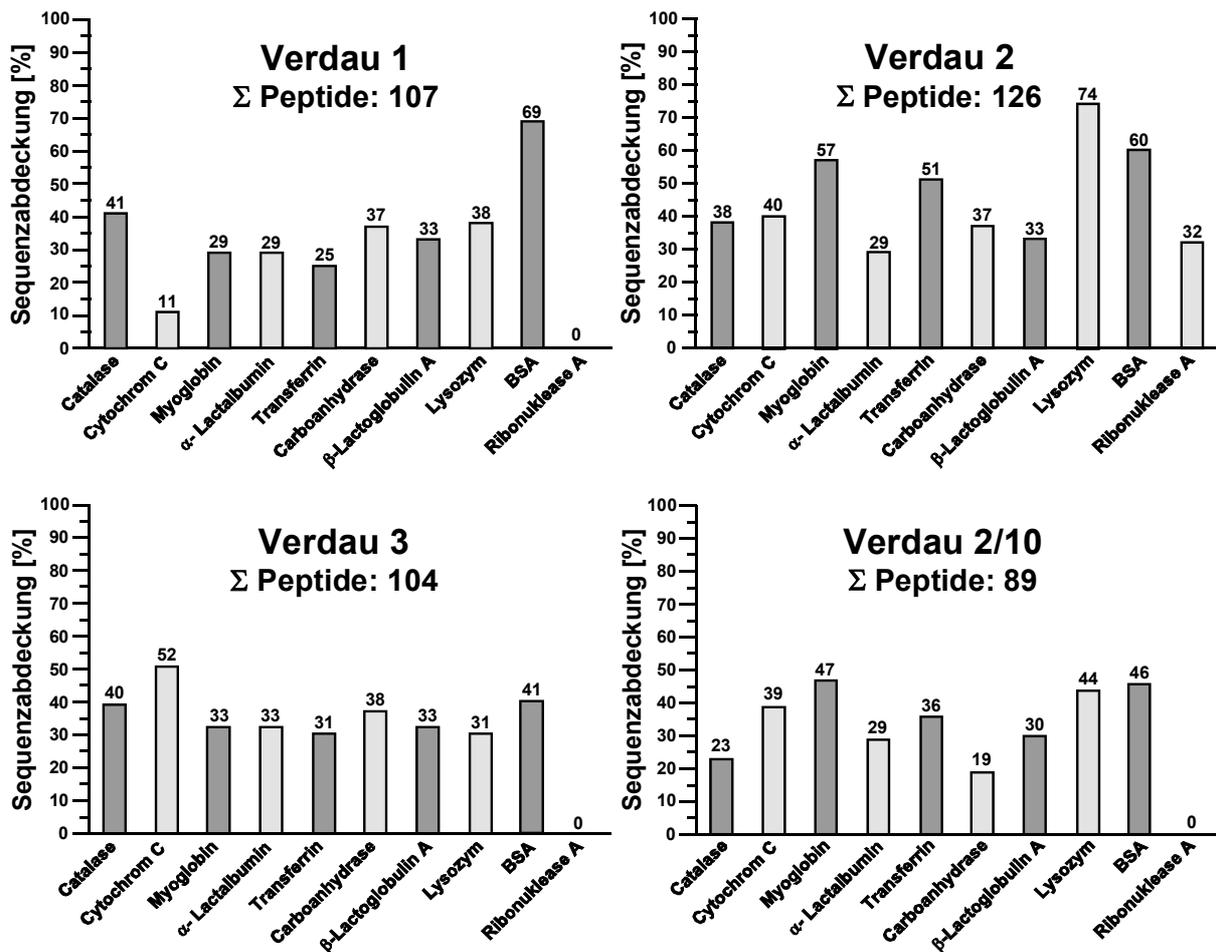


Abbildung 4. Anzahl der identifizierten Peptide und die daraus berechneten Sequenzabdeckungen für die zehn Proteine von Verdau 1, 2, 2/10, 3.

Im Mittel lagen die Sequenzabdeckungen der Proteine zwischen 31 und 45%. In jedem der vier Verdau konnten alle Proteine, mit Ausnahme von Ribonuklease A, eindeutig identifiziert werden. Ein Zusammenhang zwischen der geringen Wiederfindung der Ribonuklease A und den dynamischen Konzentrations-

verteilungen in den Verdauen kann jedoch ausgeschlossen werden, da Transferrin, welches in allen Proben die niedrigste Konzentration besaß, eindeutig für alle Verdaue identifiziert wurde. Man kann in diesem Fall eher davon ausgehen, dass die Identifikation der Ribonuklease A erschwert wurde durch die geringe Größe des Proteins und der daraus resultierenden kleinen Anzahl an tryptischen Peptiden und/oder durch posttranslatorische Proteinmodifikationen. Diese Vermutungen konnten durch eindimensionale IP-RP-ESI-MS/MS Analysen der vier Proteinverdaue bestärkt werden, da auch hier nur eine geringe Wiederfindung für die Ribonuklease A erhalten wurde^[4].

Bei den zweidimensionalen Analysen von Verdau 2, welcher alle Proteine in vergleichbaren Konzentrationen enthielt, wurden alle Proteine mit Sequenzabdeckungen im Bereich von 29 – 74% identifiziert. Aus der 10-fachen Verdünnung dieser Probe (Verdau 2/10) resultierte eine Abnahme der Sequenzabdeckungen zu 19 – 47%. Für die Verdaue mit den hohen dynamischen Bereichen zeigten die jeweils hoch-abundanten Proteine, Serum Albumin bzw. Cytochrom C, erwartungsgemäß die größten Sequenzabdeckungen. Im Vergleich zu Verdau 2 waren die Unterschiede jedoch nicht so groß. Interessanterweise waren die Sequenzabdeckungen der niedrig-abundanten Proteine nahezu äquivalent für Verdau 1, 2 und 3, obwohl Verdau 1 und 3 Serum Albumin bzw. Cytochrom C in großem Überschuss enthielten. Die Analyse von gering konzentrierten Peptiden in Gegenwart von hoch-abundanten Peptiden wird häufig erschwert durch partielle Koelution bei der chromatographischen Trennung sowie durch kompetitive Ionensuppression bei der massenspektrometrischen Detektion. Die Verwendung des zweidimensionalen HPLC-Systems, welches eine erhöhte Peakkapazität bietet, ermöglicht hier jedoch die Analyse von Proben mit relativ hohen dynamischen Konzentrationsbereichen. Dass die hoch-abundanten Proteine bzw. Peptide die Identifizierung der anderen tryptischen Peptide nicht stören, kann speziell am Beispiel der Carboanhydrase und des β -Lactoglobulins A belegt werden. Diese Proteine bzw. deren Peptide besaßen sowohl in Verdau 2 mit den ausgeglichenen Proteinkonzentrationen als auch in Verdau 1 und 3 mit dem Überschuss an Serum Albumin bzw. Cytochrom C, jeweils die gleichen Konzentrationen. Bezieht man sich bei der Analyse nur auf die Carboanhydrase und das β -Lactoglobulin A, so unterschieden sich die 3 Verdaue nur in ihrer Matrix. Anhand der Ergebnisse in Abbildung 4 kann belegt werden, dass die Identifizierung dieser Peptide völlig

unabhängig von der Gegenwart der anderen tryptischen Peptide war, da mit 33% für das β -Lactoglobulin A und 37-38% für die Carboanhydrase jeweils identische Sequenzabdeckungen erhalten wurden. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die Proteinsequenzabdeckungen bei den 2D-Analysen hauptsächlich abhängig von der vorhandenen Menge des entsprechenden Proteins in der Probe sind.

Da von jeder SCX-Fraktion drei IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen durchgeführt wurden, konnte auch die Reproduzierbarkeit der Peptididentifikationen überprüft werden. In Abbildung 5 ist die Gesamtanzahl der pro Verdau identifizierten Peptide zusammen mit der Reproduzierbarkeit der Peptididentifizierungen, bezogen auf die drei Wiederholungsmessungen, als Balkendiagramm angegeben.

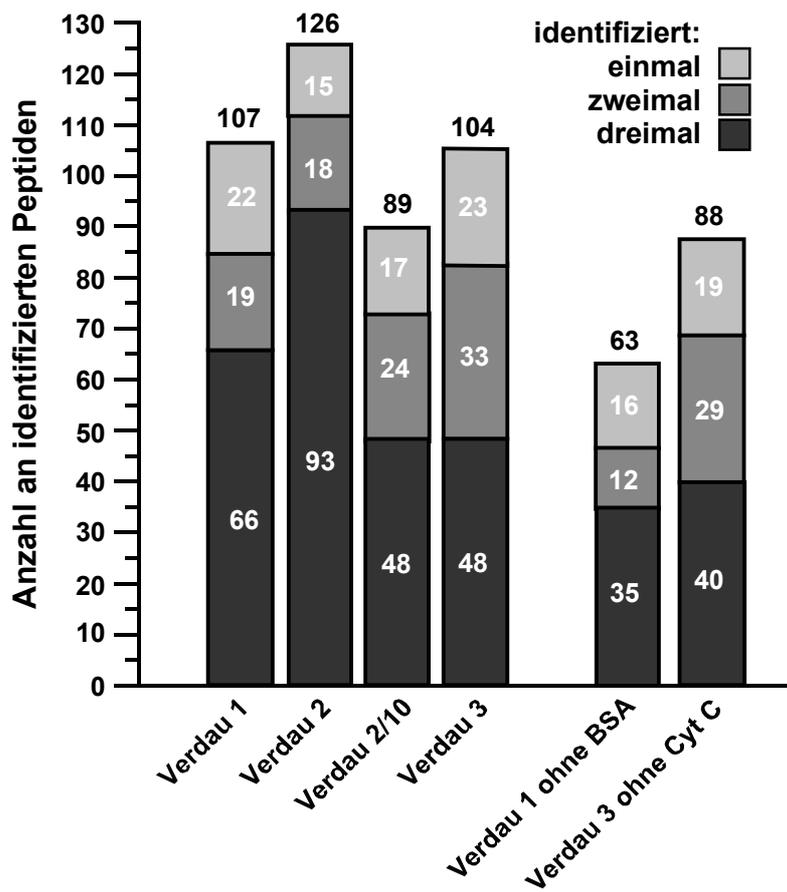


Abbildung 5. Reproduzierbarkeit der Peptididentifikationen für Verdau 1, 2, 2/10 und 3.

Mit Ausnahme von Verdau 3 konnten für jeden Verdau über 50% der Peptide in allen drei Messungen identifiziert werden (Verdau 1, 62%; Verdau 2, 74%; Verdau 2/10, 54%). Nicht unerwartet konnte die größte Anzahl an identifizierten Peptiden und die höchste Reproduzierbarkeit für die Peptididentifikation von Verdau 2 erzielt werden, da hier alle Proteine in relativ hohen Konzentrationen vorlagen. Die Abnahme der identifizierten Peptide und Identifikationsreproduzierbarkeit für Verdau 1, 2/10 und 3 kann durch die insgesamt geringere Konzentration der Peptide erklärt werden. Obwohl Verdau 1 viele tryptische Peptide von Serum Albumin bei relativ hohen Konzentrationen enthielt, war das Ergebnis bezüglich der identifizierten Peptide vergleichbar mit dem von Verdau 3, welcher aufgrund des verhältnismäßig kleinen Cytochrom C Proteins wesentlich weniger tryptische Peptide bei hohen Konzentrationen besaß. Nur bei der Reproduzierbarkeit der Peptididentifikationen gab es leichte Unterschiede, da einige der 3-fach identifizierten Peptide für Verdau 1 nur 2-fach für Verdau 2 identifiziert wurden. Für alle Verdaue ist zu erkennen, dass trotz der guten Reproduzierbarkeit der Analysen, immer noch einige Peptide nur einmal in allen drei Wiederholungsmessungen über Datenbankrecherche zugeordnet werden konnten. Dies kann durch leichte Verschiebungen in den Retentionszeiten der Analyten erklärt werden. Dadurch kann es dazu kommen, dass manche Peptide nicht mehr als Vorläuferion für die MS/MS-Fragmentierung ausgewählt werden (data-dependent MS/MS, siehe Kapitel II, 3.4), da sie von der Trennsäule eluieren wenn der Fullscan bereits abgeschlossen wurde und die Ionenfalle des Massenspektrometers die MS/MS-Zyklen durchführt. Aus diesem Grund ist es für die Analyse von komplexen Protein-/Peptid-Proben ratsam, mehrere Wiederholungsmessungen durchzuführen. Hierdurch ist es möglich die Qualität der Identifizierung über die Reproduzierbarkeit abschätzen zu können, sowie die Gesamtanzahl an identifizierten Peptiden/Proteinen zu erhöhen^[5]. Der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Peptididentifizierung und Reproduzierbarkeit wird explizit durch die Gegenüberstellung der Ergebnisse von Verdau 2 und Verdau 2/10 deutlich. Durch die 10-fache Verdünnung von Verdau 2 nahm die Anzahl an identifizierten Peptiden bei Verdau 2/10 um 29% von 126 auf 89 Peptide ab, während der Anteil an Peptiden, die in allen drei Messungen gefunden wurden, von 74% auf 53% sank. Um klären zu können, inwieweit die hoch-abundanten Proteine in Verdau 1 und 3 eine Rolle bei der Identifizierung der niedrig konzentrierten Proteine spielen, wurden rechts in Abbildung 5 zusätzlich die Anzahl der identifizierten Peptide und deren

Reproduzierbarkeit ohne Berücksichtigung der tryptischen Peptide von Serum Albumin bzw. Cytochrom C aufgetragen. Durch Vergleich der Daten wird ersichtlich, dass 41% der identifizierten Peptide in Verdau 1 von Serum Albumin und 15% der identifizierten Peptide in Verdau 3 von Cytochrom C stammen. Diese Divergenz kann wiederum über die großen Unterschiede in den molekularen Größen der beiden Proteine und der daraus resultierenden Anzahl an tryptischen Peptiden erklärt werden. Da die Daten ohne die hoch konzentrierten Proteine, prozentual vergleichbare Reproduzierbarkeiten für die Peptididentifizierung zeigen wie die Gesamtauswertungen, kann belegt werden, dass die hoch-abundanten Proteine keinen signifikanten Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Peptididentifizierung ausüben.

Geht man davon aus, dass in den 10er Proteinmischungen ungefähr 300 tryptische Peptide mit einem Molekulargewicht größer als 500 Da (untere Grenze des MS-Scanbereichs) durch vollständigen und teilweise partiellen Verdau generiert wurden, so repräsentieren die identifizierten Peptide ca. 30-40% der Gesamtpeptidanzahl. Alle Peptide einer komplexen Probe mit einer chromatographischen Trenntechnik zu identifizieren ist unrealistisch und auch nicht notwendig, da pro Protein meist schon zwei bis drei Peptide ausreichen um dieses mit einer hohen Zuverlässigkeit bestimmen zu können. Dies galt auch für die 2D-Analysen der verdauten 10er Proteinmischungen, wo mit Ausnahme von Ribonuklease A alle Proteine in den Proben eindeutig identifiziert werden konnten.

Beim Vergleich der erhaltenen 2D-Daten mit den Daten von eindimensionalen IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen der gleichen Proteinverdau konnte festgestellt werden, dass einige Peptide nur über das 1D-System identifiziert werden konnten. In Tabelle 2 sind exemplarisch für Serum Albumin die tryptischen Peptide angeführt, die mit dem 1D-HPLC System identifiziert werden konnten, jedoch nicht mit dem 2D-HPLC System. Bei den Peptiden handelt es sich überwiegend um kleine und hydrophile Peptide, die, wie sich herausstellte, bei den eindimensionalen Trennungen meist im isokratischen Teil der Chromatogramme eluierten. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass diese Peptide beim Aufkonzentrieren und Entsalzen der SCX-Fractionen nicht ausreichend auf der monolithischen Anreicherungssäule zurückgehalten werden konnten und somit verloren gingen. Bei den wenigen Peptiden, die bei den eindimensionalen Analysen im Gradienten eluierten und trotzdem nicht mit dem zweidimensionalen Setup identifiziert werden konnten, kann man davon

ausgehen, dass diese bei der SCX-Trennung in der 1. Dimension über einen weiten Bereich eluierten und somit stark verdünnt über mehrere Fraktionen verteilt waren. Für die starke Verteilung kann man zusätzliche solvophobe Wechselwirkungen verantwortlich machen. Beim Vergleich der ein- und zweidimensionalen Daten wurde deutlich, dass für das 2D-System sowohl die Anreicherungs-effizienz der monolithischen Anreicherungs-säule in der 2. Dimension noch optimiert werden musste als auch die Effizienz der SCX-Trennung in der 1. Dimension.

Tabelle 2. Tryptische Peptide von Serum Albumin, die über 1D-HPLC-ESI-MS/MS Analysen identifiziert werden konnten, jedoch nicht über 2D-HPLC-ESI-MS/MS Analysen.

Tryptische Peptide von BSA	Elution
FWGK	isokratisch
HKPK	isokratisch
IETMR	isokratisch
AFDEK	isokratisch
CASIQK	isokratisch
TPVSEK	isokratisch
NYQEAK	isokratisch
AWSVAR	isokratisch
ATEEQLK	isokratisch
DLGEEHFK	isokratisch
DDSPDLPK	isokratisch
CCTKPESER	isokratisch
LVTDLTK	Gradient
R+ HPEYAVSVLLR	Gradient
HPYFYAPELLYYANK	Gradient

Dass die Trenneffizienz der Kationenaustausch-Chromatographie in der 1. Dimension noch optimiert werden musste, kann exemplarisch auch in Abbildung 6 gezeigt werden. Hier sind drei rekonstruierte Total-Ionenstrom Chromatogramme der SCX-Fractionen 1, 2 und 3 von Verdau 2 abgebildet. Anhand der Ergebnisse der Datenbanksuchen konnten wir feststellen, dass einige Peptide über mehr als zwei benachbarte SCX-Fractionen eluierten. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 6 exemplarisch für ein tryptisches Peptid von Serum Albumin (AS: *YNGVFQECCQAEDK*) dargestellt.

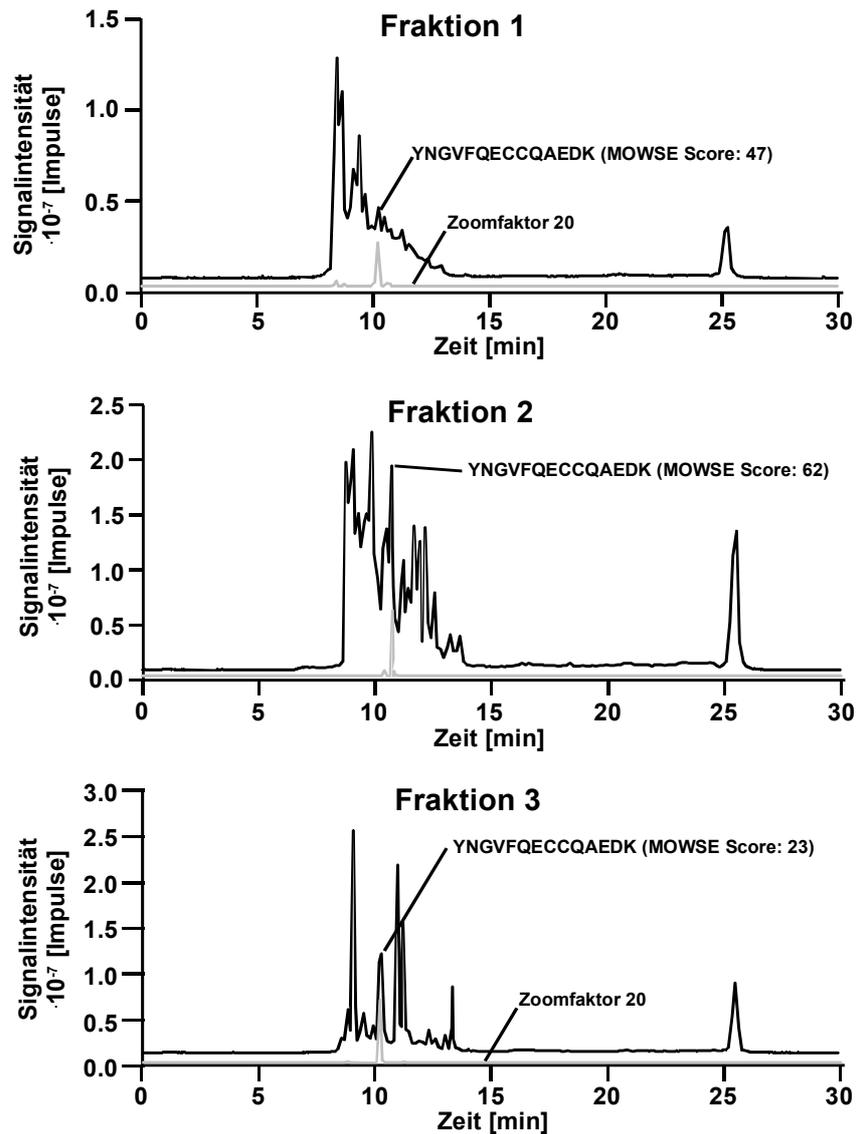


Abbildung 6. Identifizierung des tryptischen Peptids *YNGVFQECCQAEDK* von Serum Albumin mittels IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analyse der SCX-Fractionen 1, 2 und 3 von Proteinverdau 2.

Bedingungen entsprechend Abbildung 3.

Das Peptid *YNGVFQECCQAEDK* konnte sowohl über die MS/MS-Spektren als auch über die extrahierten Ionenspuren eindeutig in SCX-Fraktion 1, 2 und 3 von Verdau 2 identifiziert werden. Die Zuverlässigkeit der Identifikation konnte zusätzlich durch relativ hohe MOWSE Scores und identische Retentionszeiten in der 2. Dimension abgesichert werden. Die über Datenbankrecherche erhaltenen Scores und die extrahierten Ionenchromatogramme sind in der Abbildung enthalten. Aufgrund der

Größe der MOWSE Scores und den Peakintensitäten in den extrahierten Ionenspuren kann man davon ausgehen, dass das Peakmaximum dieses Peptids in der SCX-Trennung bei Minute 2-3 lag (SCX-Fraktion 2). Aufgrund des breiten Elutionsprofils konnte dieses Peptid schließlich auch noch in SCX-Fraktion 1 und 3 identifiziert werden. Für die Verteilung von Peptiden über mehrere benachbarte SCX-Fraktionen kann zum einen die von Haus aus geringere Trennleistung der Ionenchromatographie verantwortlich gemacht werden und zum anderen sekundäre solvophobe Wechselwirkungen der Peptide mit der stationären Phase. Eine Möglichkeit um diese ungewollten sekundären Wechselwirkungen zu unterdrücken besteht darin, den Anteil an organischen Lösungsmitteln in den SCX-Eluenten zu erhöhen, wodurch auch die Trennleistung gesteigert wird. Da wir bei den 2D-Analysen der 10er Proteinverdau nur 5% Acetonitril in den Eluenten für die Kationenaustausch-Chromatographie eingesetzt hatten, ist eine Erhöhung des Acetonitrilanteils in den Eluenten noch ohne weiteres möglich. Anhand der Ergebnisse in Kapitel III (3.2) konnte bereits gezeigt werden, dass sich bis zu 20% Acetonitril in den SCX-Fraktionen über Evaporation entfernen lassen.

Eine weitere Beobachtung, die wir mit Hilfe der Identifikationsdaten der tryptischen Peptide machen konnten, war, dass ein paar Peptide über nicht aufeinander folgende SCX-Fraktionen verteilt waren. Dies wird am Beispiel des tryptischen Peptids *IPAVFK* von β -Lactoglobulin A in Abbildung 7 belegt. Hier sind die rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramme der SCX-Fraktionen 5 und 14 (Verdau 2), in welchen das entsprechende Peptid in allen drei Wiederholungsmessungen zusammen mit relativ hohen MOWSE Scores identifiziert wurde, abgebildet. Zusätzlich sind noch die extrahierten Ionenspuren für das zugehörige m/z -Verhältnis ($m/z = 674.6$) des einfach positiv geladenen Peptids eingefügt. Die übereinstimmenden Retentionszeiten bei den IP-RP-Trennungen in der 2. Dimension und die hohe Reproduzierbarkeit in der Peptididentifikation sprechen dafür, dass es sich bei dem identifizierten Peptid nicht um einen zufälligen Treffer bei der Datenbanksuche handelt. Die auf Ionenaustauschchromatographie basierende Verteilung von Peptiden über nicht aufeinander folgende Fraktionen konnte auch schon von Maynard et al. beobachtet werden^[6]. Sie machten lokale basische Regionen in den Peptiden, sekundäre solvophobe Wechselwirkungen der Peptide mit der stationären Phase und Peptidaggregation verantwortlich für dieses

Phänomen. Auch hier könnte die Erhöhung des Acetonitrilanteils in den SCX-Eluenten ein Weg sein dieses Problem zu bewältigen.

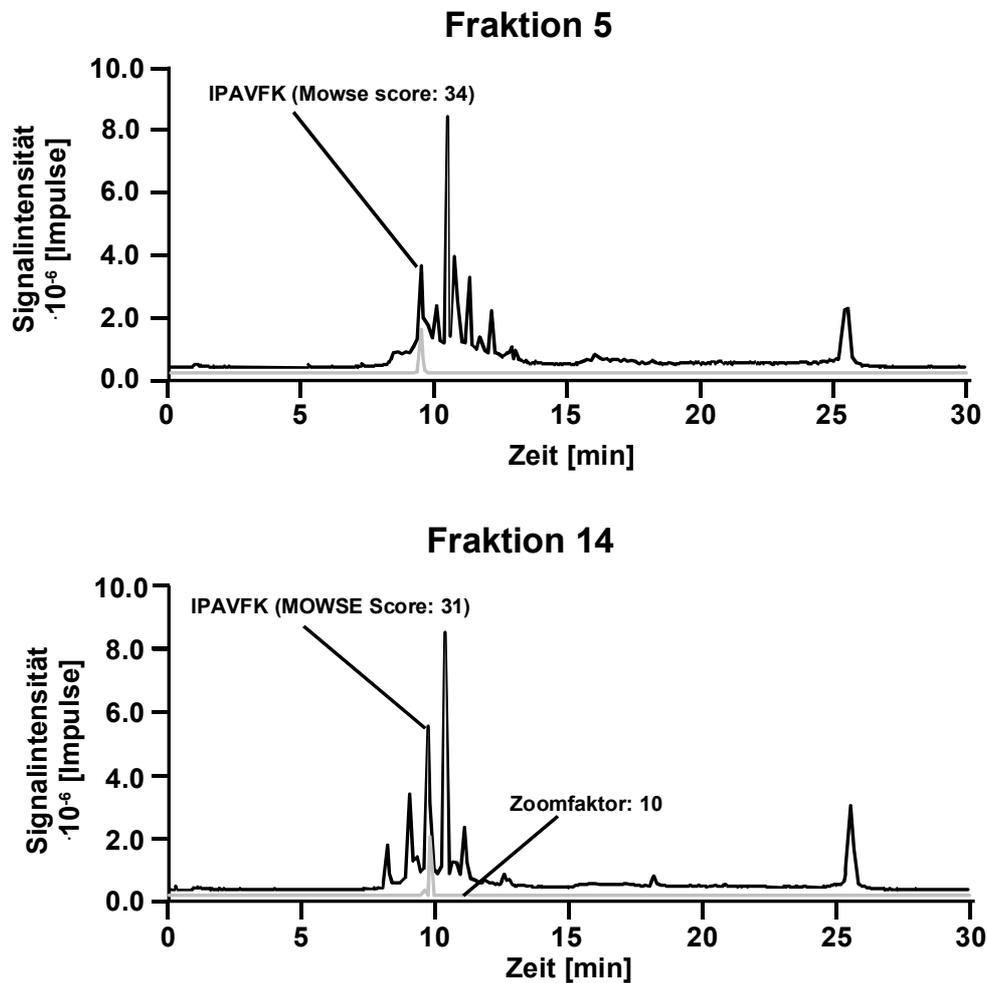


Abbildung 7. Identifizierung des tryptischen Peptids *IPAVFK* von β -Lactoglobulin A mittels IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analyse der SCX-Fraktionen 5 und 14 von Proteinverdau 2.

Bedingungen entsprechend Abbildung 3.

3.2 Optimierung des off-line 2D-HPLC-Systems

Wie wir anhand der Ergebnisse in Kapitel 3.1 belegen konnten, eignet sich die entwickelte off-line Kopplung aus Kationenaustauschchromatographie und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie für zweidimensionale Analysen von Proteinen und Peptiden. Die Ergebnisse zeigten jedoch ebenfalls, dass noch einzelne Parameter verbessert werden konnten. Während die Kationenaustauschchromatographie (1. Dimension), bezüglich der Verteilung von Peptiden über mehrere Fraktionen, mit einem höheren Acetonitrilanteil in den Eluenten optimiert werden kann, erfordert die Steigerung des Rückhaltevermögens der monolithischen Anreicherungssäule (2. Dimension) für kleine und hydrophile Analyten eingehendere Experimente. Ein zufriedenstellender Einsatz des 2D-Systems für umfassende Proteomanalysen ist nur möglich, wenn der Verlust von Analyten während des Aufkonzentrierens und Entsalzens an der Anreicherungssäule minimiert werden kann.

Die Retention von Analyten kann durch die stationäre Phase selbst, die mobile Phase und die Temperatur beeinflusst werden. Da monolithische Poly(Styrol-Divinylbenzol) Trennsäulen in der 2. Dimension zur Analyse verwendet werden sollten, war eine Änderung der stationären Phase in der Anreicherungssäule ausgeschlossen. Eine Variation der mobilen Phase zu Beladungseluenten mit geringerer Elutionsstärke war auch nicht realisierbar, weil als Eluent zum Aufkonzentrieren und Entsalzen der Fraktionen bereits Wasser benutzt wurde. Eine Möglichkeit für die Erhöhung der Retention von hydrophilen Peptiden besteht darin, die Anreicherungssäule während des Aufkonzentrierungsschrittes bei niedrigen Temperaturen zu betreiben^[7-10]. Auf der anderen Seite müsste aber bei der Backflush-Elution der Analyten die Umgebungstemperatur wieder erhöht werden, mindestens so hoch wie die Temperatur der Trennsäule. Nur so ist gewährleistet, dass bei Verwendung der gleichen stationären Phasen in Anreicherungs- und Trennsäule, die Analyten bei dem Anteil an Acetonitril, der zur Elution von der Anreicherungssäule benötigt wird, noch genügend Retention an der Trennsäule für eine effiziente Trennung aufweisen. Für die kurzen Beladungs- und Aufkonzentrierungsphasen, welche nur einige Minuten beanspruchen, ist diese Prozedur jedoch nicht praktikabel und nur schwer zu realisieren. Zusätzlich kann der Einfluss der Temperatur auf das Rückhaltevermögen der Anreicherungssäule auch

nicht genau eingeschätzt werden. Neben der Temperatur üben auch die Laufmittelzusätze einen großen Einfluss auf das Retentionsverhalten von Analyten an stationären Phasen aus^[9;11-15]. Aus diesem Grund versuchten wir die Retentionsstärke der monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule durch Erhöhung der Konzentration des Ionenpaar-Reagenzes im Beladungseluenten sowie durch Verwendung von hydrophoberen Ionenpaar-Reagenzien zu steigern. Der Einfluss der Laufmitteladditive auf die Anreicherungseffizienz der monolithischen Anreicherungssäule wurde hierbei mit Hilfe eines Standards aus neun Peptiden und eines tryptischen Verdau von zehn Proteinen untersucht. Die durchgeführten Experimente und die daraus erhaltenen Ergebnisse werden in diesem Kapitel angeführt.

3.2.1 Optimierung der Aufkonzentrierung eines Peptidstandards an monolithischen PS-DVB Anreicherungssäulen

Untersuchungen zur Wiederfindung von kleinen und hydrophilen Peptiden anhand der zweidimensionalen 10er Proteinverdau-Analysen ergaben, dass ein Großteil dieser Peptide während des Aufkonzentrierungsschrittes an der monolithischen Anreicherungssäule nicht zurückgehalten wurde und somit verloren ging. Das geringe Rückhaltevermögen der PS-DVB Anreicherungssäule konnte auch mit einer einfachen Mischung aus neun Standardpeptiden belegt werden. Injizierte man die Probe direkt auf eine monolithische Trennsäule so konnten alle neun Peptide eindeutig identifiziert werden (Abbildung 8a). Wurde die Probe hingegen zuerst an einer Anreicherungssäule mit einer 0.050% wässrigen TFA-Lösung aufkonzentriert und im Anschluss nach der Backflush-Elution mit einer monolithischen Trennsäule analysiert, so konnte das Bradykinin Fragment 1-5, ein kleines hydrophiles Peptid in der 9er Peptidmischung, nicht mehr im Chromatogramm nachgewiesen werden (Abbildung 8b).

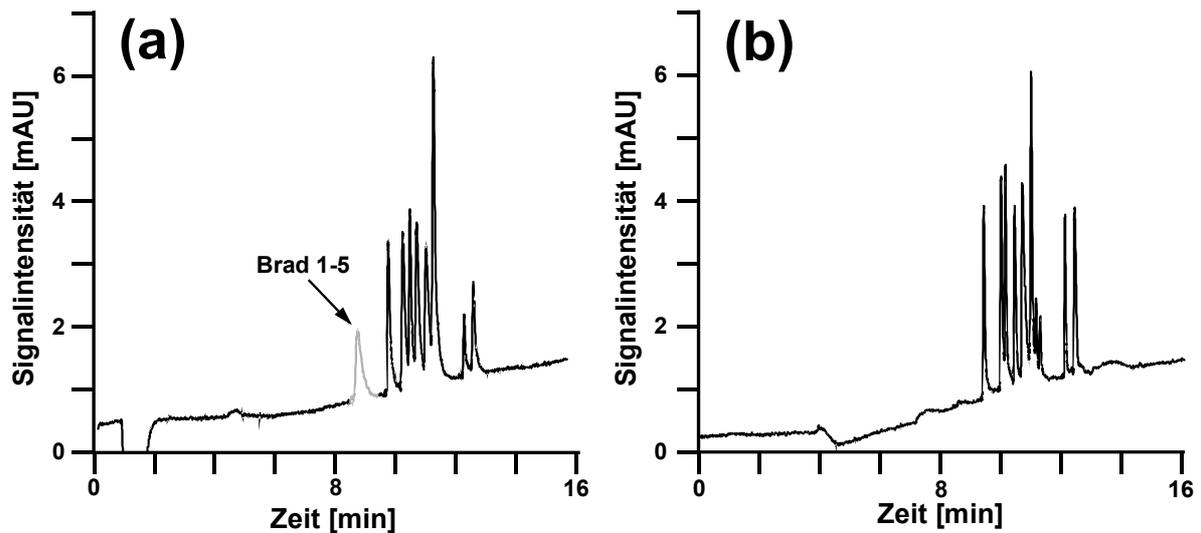


Abbildung 8. IP-RP-Analysen eines 9er Peptidstandards in monolithischen PS-DVB-Trennsäulen mit (b) und ohne (a) vorheriger Aufkonzentrierung der Probe an einer monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule mit 0.050% wässriger TFA-Lösung als Beladungseluent.

(a) Säule, 60 x 0.20 mm I.D. monolithische PS-DVB Trennsäule; mobile Phase, A) H₂O + 0.050% TFA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 0-50% B in 15 min; Flussrate, 2.0 µl/min (b); Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, 9er Peptidmischung mit Bradykinin Fragment 1-5, [Arg⁸]-Vasopressin, Methionin-Enkephalin, Oxytocin, Leucin-Enkephalin, Bradykinin, Luteinizing Hormone Releasing Hormone, Bombesin, Substanz P, jeweils 1.0 ng. (b) Aufkonzentrierung der Probe: Säule, 10 x 0.20 mm I.D. monolithische PS/DVB Anreicherungssäule; Beladungseluent, 0.050% wässrige TFA Lösung; Beladungsdauer, 3 min; Beladungsflussrate, 10 µl/min; Temperatur, 25°C. Restliche Bedingungen wie in (a).

Unsere Versuche zur Erhöhung der Retentionsstärke der monolithischen Anreicherungssäule zielten auf das Ionenpaar-Reagenz im Beladungseluenten. Hierbei verfolgten wir zwei unterschiedliche Strategien zur Steigerung der Anreicherungseffizienz: Zum einen die Erhöhung der Konzentration des Ionenpaar-Reagenz im Beladungseluenten und zum anderen die Verwendung von länger-kettigen perfluorierten Carbonsäuren als Ionenpaar-Reagenzien. Bei den Ionenpaar-Reagenzien handelt es sich um Moleküle, die einen hydrophilen sowie lipophilen Teil besitzen. Diese Art von Molekülen bezeichnet man als Amphiphile. Für die IP-RP-HPLC werden häufig perfluorierte Carbonsäuren, wie Trifluoressigsäure und Heptafluorbuttersäure^[15], als Amphiphile eingesetzt, da diese zusätzlich den

Vorteil bieten, dass sie flüchtig sind und somit eine problemlose Kopplung mit der Massenspektrometrie gewährleisten. Bei diesen Molekülen repräsentiert die fluoridierte Alkylkette den lipophilen Teil des Amphiphils und die deprotonierte Carbonsäurefunktion den hydrophilen Teil. Über solvophobe Wechselwirkungen adsorbieren die Amphiphile bei der IP-RP-HPLC an der stationären Phase. Dadurch wird die Retention von Peptiden und Proteinen bei der IP-RP-HPLC neben den solvophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase zusätzlich noch durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den an der Oberfläche adsorbierten Ionenpaar-Reagenzien unterstützt^[16;17]. Der Einfluss unterschiedlicher Ionenpaar-Reagenzien auf die IP-RP-Analysen von Peptiden konnte bereits von Walcher et al. beschrieben werden^[9]. Durch Erhöhung der Konzentration der Ionenpaar-Reagenzien sowie durch Verwendung von hydrophoberen Ionenpaar-Reagenzien sollte das Oberflächenpotential an der monolithischen PS-DVB Phase vergrößert werden und so eine verstärkte Retention der Peptide an der monolithischen Anreicherungssäule herbeigeführt werden. Gerade die langkettigen perfluorierten Carbonsäuren, wie die Heptafluorbuttersäure (HFBA), sind dafür bekannt, dass sie eine erhöhte Adsorption an hydrophoben Oberflächen aufweisen. In Abbildung 9 sind die Adsorptionsisothermen von Trifluoressigsäure und Heptafluorbuttersäure auf einer C18-Kieselgel Phase, die anhand der experimentellen Daten von Patthy et al.^[18] ermittelt wurden, dargestellt. Zum Vergleich sind exemplarisch die Oberflächenkonzentrationen von HFBA und TFA in der Abbildung für einen prozentualen Volumenanteil von 0.050% eingezeichnet. Bezieht man sich bei den Konzentrationen der Ionenpaar-Reagenzien in den Beladungseluenten nicht auf den prozentualen Volumenanteil sondern auf die molare Konzentration, so erhält man aufgrund der unterschiedlichen Molekularmassen (TFA: $M = 114.03 \text{ g/mol}$, $\rho = 1.535 \text{ g/ml}$ (25°C); HFBA: $M = 214.04 \text{ g/mol}$, $\rho = 1.645 \text{ g/ml}$ (25°C)) bei 0.050% TFA und 0.10% HFBA ungefähr die gleiche Molarität (TFA 6.73 mmol/l; HFBA 7.69 mmol/l).

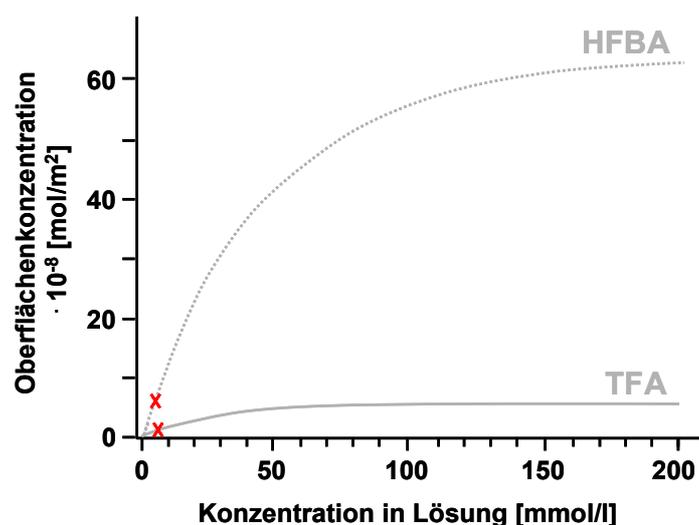


Abbildung 9. Adsorptionsisothermen von Trifluoressigsäure (TFA) und Heptafluorbuttersäure (HFBA) auf C18-Kieselgel (Nucleosil 100-5 C18, 5 μm) in Wasser/Acetonitril (90:10, v:v). Die eingezeichneten Markierungen repräsentieren die Oberflächenkonzentration des jeweiligen Ionenpaar Reagenzes bei 0.050 Vol%. Abbildung basiert auf den Daten von Patthy et al^[18].

Für den ersten Versuch ersetzten wir einfach das TFA im Beladungseluenten durch das hydrophobere HFBA. Abbildung 10 zeigt die IP-RP-HPLC-ESI-MS Analysen des 9er Peptidstandards mit der Kombination aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule, wobei entweder 0.050% TFA oder 0.050% HFBA als Ionenpaar-Reagenz im Beladungseluenten enthalten war. Ein Peak für das Bradykinin Fragment 1-5 ist im rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramm, wo TFA als Beladungseluent eingesetzt wurde, nicht zu registrieren. Lediglich im extrahierten Massenspektrum konnte das Peptid über das m/z -Verhältnis der einfach geladenen Molekularmasse ($m/z = 573.3$) mit einem schwachen Signal identifiziert werden. Hingegen im rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramm der Peptidanalysen, bei denen 0.050% wässrige HFBA-Lösung zum Aufkonzentrieren der Probe an der Anreicherungsäule verwendet wurde, ist ganz deutlich ein Peak für das kleine, hydrophile Peptid zu sehen. Die Identität wurde durch ein intensives Signal im Massenspektrum belegt. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Anreicherungs-effizienz durch die Verwendung der hydrophoberen Heptafluorbuttersäure im Beladungseluenten gesteigert werden kann. Das entsprechende Chromatogramm und das extrahierte Massenspektrum zeigen des Weiteren, dass der Einsatz der Heptafluorbuttersäure keinen signifikanten Einfluss auf die

chromatographische Trennung, die mit Trifluoressigsäure als Ionenpaar-Reagenz durchgeführt wurde, und auf die anschließende massenspektrometrische Detektion ausübt. Theoretisch könnte man auch HFBA für die IP-RP-Trennungen einsetzen. Jedoch konnte bereits über umfassende Studien bewiesen werden, dass HFBA im Gegensatz zu TFA und FA (Ameisensäure) zwar die beste Performance für die chromatographischen Analysen bietet, aber bei der massenspektrometrischen Detektion, aufgrund der Bildung von Clustern, die geringsten Signal-zu-Rauschen Verhältnisse für die Peaks liefert^[9]. Dies ist nicht der Fall bei der Verwendung von TFA, und da diese im Vergleich zur FA eine höhere Trenneffizienz bietet, stellt die Trifluoressigsäure das Ionenpaar-Reagenz der Wahl dar für IP-RP Analysen gekoppelt mit der ESI-Massenspektrometrie. Dass die Heptafluorbuttersäure im Beladungseluenten die nachfolgende massenspektrometrische Detektion nicht negativ beeinflusst, konnte anhand aller extrahierten Massenspektren der neun Peptide bestätigt werden.

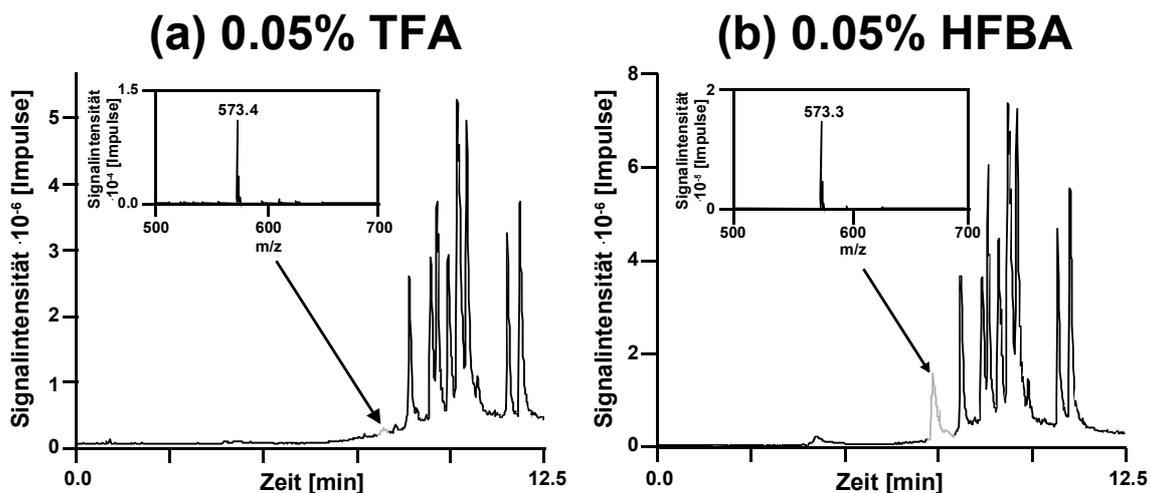


Abbildung 10. IP-RP-HPLC-ESI-MS Analysen eines 9er Peptidstandards in monolithischen PS-DVB-Trennsäulen mit vorheriger Aufkonzentrierung der Probe an einer monolithischen PS-DVB Anreicherungsäule mit 0.050% wässriger TFA-Lösung (a) bzw. 0.050% HFBA-Lösung als Beladungseluent.

Säulen, 10 und 60 x 0.20 mm I.D. monolithische PS-DVB Anreicherungs- und Trennsäule; Beladungseluent, 0.050% wässrige TFA Lösung (a) bzw. 0.050% wässrige HFBA Lösung (b); Beladungsdauer, 3 min; Beladungsflussrate, 10 µl/min; mobile Phase, A) H₂O + 0.050% TFA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 0-50% B in 15 min; Flussrate, 2.0 µl/min (b); Temperatur, 25°C; Detektion, ESI-MS; Probe, 9er Peptidmischung, jeweils 1.0 ng.

Auf der Basis dieser Ergebnisse entschieden wir uns für eine detailliertere Untersuchung des Einflusses der Ionenpaar-Reagenzien auf die Anreicherungs-effizienz der monolithischen PS-DVB Anreicherungs säule. Für die Studie wurden fünf verschiedene perfluorierte Carbonsäuren (homologe Reihe abgeleitet von Essigsäure bis Hexansäure: Trifluoressigsäure, Pentafluorpropionsäure, Heptafluorbuttersäure, Nonafluorpentansäure und Undecafluorhexansäure) als Lösungsmitteladditive für die Beladungseluenten bei jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen (0.050%, 0.10% und 0.20%) verwendet. Aufgrund des stark hydrophoben Charakters wurde die Undecafluorhexansäure nur bei einer Konzentration von 0.050% als Lösungsmitteladditiv verwendet, da es bereits bei dieser Konzentration schwierig war, diese perfluorierte Carbonsäure komplett in Wasser zu lösen. Mit den unterschiedlichen Beladungseluenten wurde anschließend die Peptidmischung aus neun bioaktiven Peptiden an einer 10 x 0.20 mm I.D. PS-DVB Anreicherungs säule für 3 min aufkonzentriert. Nach der Backflush-Elution der Probe von der Anreicherungs säule erfolgte anschließend die Trennung der Peptide in einer 60 x 0.20 mm I.D. PS-DVB Trennsäule mit Hilfe eines Acetonitrilgradienten. Als Amphiphil bei der IP-RP-HPLC diente TFA mit jeweils 0.050% in Eluent A (Wasser) und Eluent B (Acetonitril). Das Ergebnis dieser Studie ist in Abbildung 11 in Form der aufgezeichneten UV-Chromatogramme dargestellt.

Die Ergebnisse für verschiedene Konzentrationen von Trifluoressigsäure in den Beladungseluenten sind in Abbildung 11a-c zu sehen. Bei der Erhöhung der Konzentration von 0.050% auf 0.10% konnte bereits ein schwaches Signal für das Bradykinin Fragment 1-5 erhalten werden. Durch eine weitere Steigerung der Konzentration auf 0.20% wurde das Signal verstärkt. Dies bestätigt, dass unzureichende Retention des Bradykinin Fragments 1-5 an der Anreicherungs säule den Grund für den Verlust dieses Peptids darstellt. Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse, dass durch höhere Konzentrationen des Amphiphils in den Beladungseluenten eine Verstärkung der Retention an der monolithischen Anreicherungs säule bewirkt werden kann. Mit der etwas hydrophoberen Pentafluorpropionsäure konnte bereits bei einem Anteil von 0.050% in dem Beladungseluenten ein kleiner Peak für das Bradykinin Fragment 1-5 im UV-Chromatogramm nachgewiesen werden. Aber auch hier reichte die Retentionsstärke der Anreicherungs säule noch nicht aus, um dieses hydrophile Peptid zu 100% beim Aufkonzentrierungsschritt zurückzuhalten, da bei der Erhöhung der

Amphiphilkonzentration die Peakfläche für dieses Peptid immer noch anstieg. Bei 0.050% Heptafluorbuttersäure wurde ein eindeutiges Signal für das Bradykinin Fragment 1-5 im Chromatogramm erhalten. Durch Erhöhung der Konzentration des Ionenpaar-Reagenzes auf 0.10% konnte noch eine leichte Steigerung der Signalintensität erzielt werden. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 0.20% bzw. der Einsatz von noch hydrophoberen perfluorierten Carbonsäuren ergab jedoch keine signifikante Verbesserung mehr für die Anreicherungs-effizienz. Eine Gegenüberstellung der erhaltenen Peakflächen von Bradykinin Fragment 1-5 für alle verwendeten Ionenpaar-Reagenzien und Konzentrationen belegte, dass die maximale Anreicherungs-effizienz ab 0.10% HFBA erreicht werden konnte. Dies konnte zusätzlich über eindimensionale IP-RP-Analysen ohne Aufkonzentrierungsschritt, die einen Verlust von Peptiden während der Messung ausschließen, bestätigt werden. Die hier erhaltene Peakfläche für das Bradykinin Fragment 1-5 entsprach der Peakfläche die bei den Analysen mit gekoppelter Anreicherungs- und Trennsäule und 0.10% HFBA als Laufmitteladditiv im Beladungseluenten erhalten wurde. Da eine Erhöhung der Konzentration an HFBA im Beladungseluenten bzw. die Verwendung von langkettigeren perfluorierten Carbonsäuren keinen signifikanten Einfluss auf die Peakfläche des Bradykinin Fragments 1-5 nahm, wurde die 0.10% wässrige HFBA-Lösung als optimaler Beladungseluent für ein effizientes Aufkonzentrieren von Peptiden an monolithischen Anreicherungs-säulen ausgewählt. Die UV-Chromatogramme in Abbildung 11 verdeutlichen nochmals, dass der Beladungseluent mit seinen Additiven nahezu keine Auswirkungen auf die analytische Trennung mit 0.050% TFA als Ionenpaar-Reagenz sowie auf die anschließende Detektion ausübt. Je nach Konzentration der UV-aktiven Amphiphile kann lediglich ein sehr intensives Injektionssignal auftreten, dass auf den Anteil des Beladungseluenten, der bei der Backflush-Elution mit über die analytische Säule gespült wird, zurückgeführt werden kann. Des Weiteren konnte bei der Verwendung von NFPA und UDFHA im Beladungseluenten ein verstärktes Tailing des Bradykinin Fragment 1-5 Peaks festgestellt werden. Hieraus resultierte eine Abnahme der Peaksymmetrie bis zu einem Faktor von zwei. Auch dieser Aspekt spricht für die Verwendung von HFBA als Laufmitteladditiv.

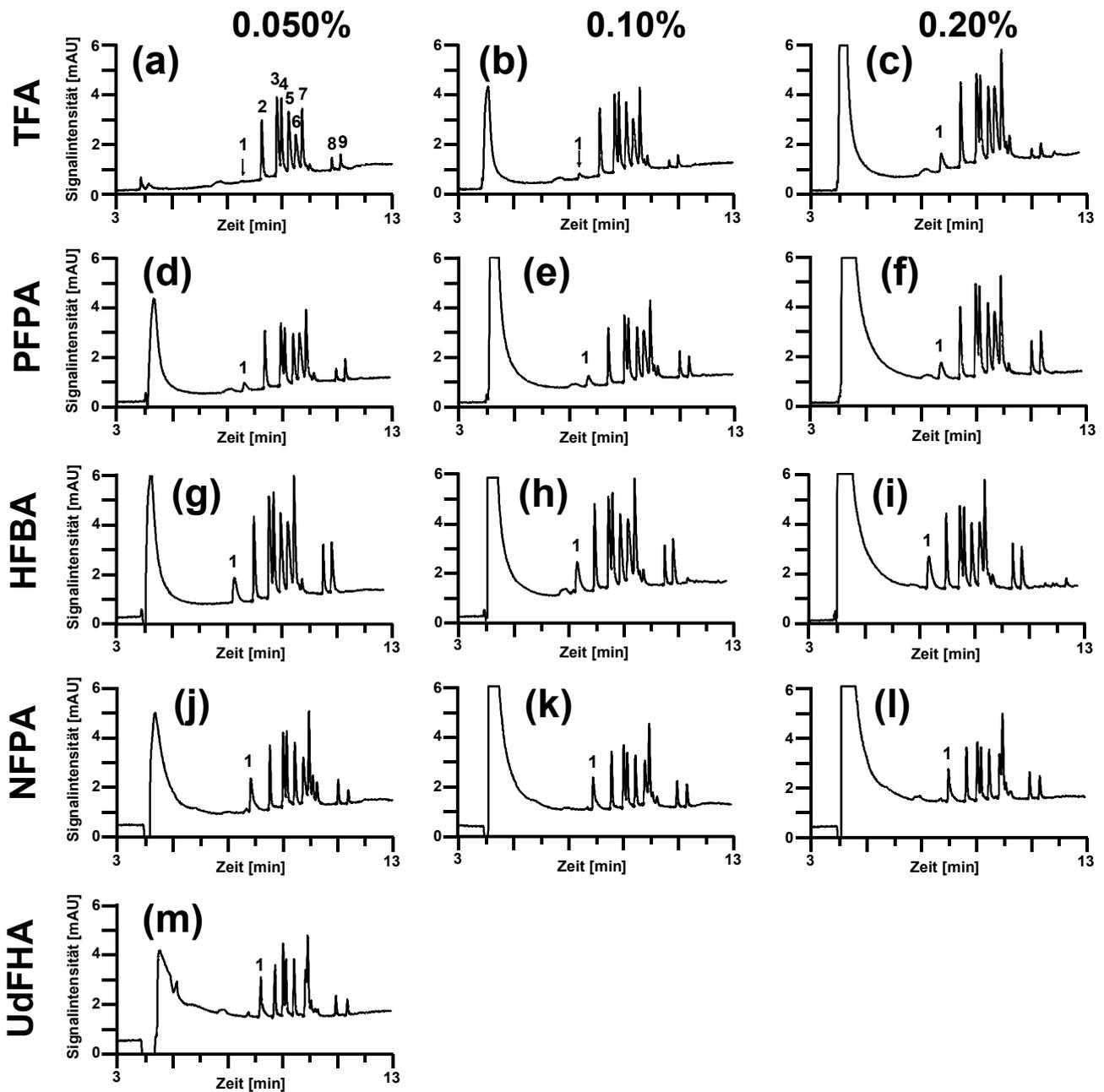


Abbildung 11. Einfluss des Ionenpaar-Reagenzes und dessen Konzentration auf die Anreicherungseffizienz von monolithischen PS-DVB Anreicherungssäulen.

Beladungseluent, 0.050%, 0.10% und 0.20% Trifluoressigsäure (TFA), Nonafluorpentansäure (NFPA), Pentafluorpropionsäure (PFPA), Heptafluorbuttersäure (HFBA) und Undecafluorhexansäure (UdfFHA) in Wasser. Restliche Bedingungen wie in Abbildung 10.

3.2.2 Optimierung der Aufkonzentrierung eines 10er Proteinverdau an monolithischen PS-DVB Anreicherungsäulen

Als nächstes wurde der Einfluss der perfluorierten Carbonsäuren auf die Anreicherungs-effizienz anhand einer komplexeren Peptidmischung evaluiert. Zu diesem Zweck wurde ein tryptischer Verdau aus zehn Proteinen (Proteinverdau 2, siehe Kapitel 3.1) für 3 min an einer 10 x 0.20 mm I.D. Anreicherungsäule mit 0.050% bzw. 0.10% wässriger TFA-, HFBA- oder NFPA-Lösung bei 10 µl/min aufkonzentriert. Der tryptische Verdau der zehn Proteine bot gegenüber dem 9er Peptidstandard den Vorteil, dass dieser nicht nur ein kleines, hydrophiles Peptid enthielt, sondern mehrere. Dadurch war es möglich, umfassendere Aussagen über das Rückhaltevermögen der monolithischen PS-DVB Anreicherungsäule für kleine und hydrophile Peptide zu treffen. Nach dem Transfer der Analyten via Backflush-Modus zur monolithischen PS-DVB Trennsäule (60 x 0.20 mm I.D.) wurden diese dort mit einem Acetonitrilgradienten (0-40% in 40 min) getrennt. Bei den IP-RP-Trennungen diente TFA als Ionenpaar-Reagenz. Nach der Trennung wurden die Analyten über Tandem-Massenspektrometrie und anschließende Datenbankrecherche identifiziert. Für jeden Beladungseluenten wurden jeweils drei Wiederholungsmessungen mit dem Proteinverdau durchgeführt. In Abbildung 12 sind exemplarisch die rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramme aufgeführt, die bei einer Amphiphilkonzentration von 0.10% für die drei unterschiedlichen Beladungseluenten erhalten wurden. Ein Vergleich dieser Chromatogramme zeigt deutlich, dass die hydrophilen Peptide effizienter mit 0.10% HFBA bzw. NFPA an der monolithischen Anreicherungsäule aufkonzentriert werden können als mit 0.10% TFA. Während sich die chromatographischen Peakmuster der einzelnen Analysen nur wenig in den hinteren Teilen der Chromatogramme unterscheiden, zeigen diese jedoch in den vorderen Bereichen große Abweichungen. In dem Elutionsbereich von Minute 3 (Beginn der Backflush-Elution der aufkonzentrierten Probe zur monolithischen Trennsäule) bis 14 wurden bei der Analyse des Proteinverdau, der mit 0.10% wässriger TFA-Lösung an der Anreicherungsäule aufkonzentriert wurde, kaum Peaks erhalten. Entgegengesetzt dazu konnten in dem entsprechenden Elutionsbereich viele intensive Signale für die Peptidanalysen mit 0.10% HFBA und NFBA im Beladungseluenten nachgewiesen werden. Man kann davon ausgehen, dass die zusätzlich erhaltenen Peaks in den vorderen Teilen der Chromatogramme

auf einer Verstärkung der Retention von kleinen und hydrophilen Peptiden an der monolithischen Anreicherungssäule beruhen. Diese Erhöhung der Retention kann wiederum auf die hydrophoberen Lösungsmitteladditive HFBA und NFPA zurückgeführt werden.

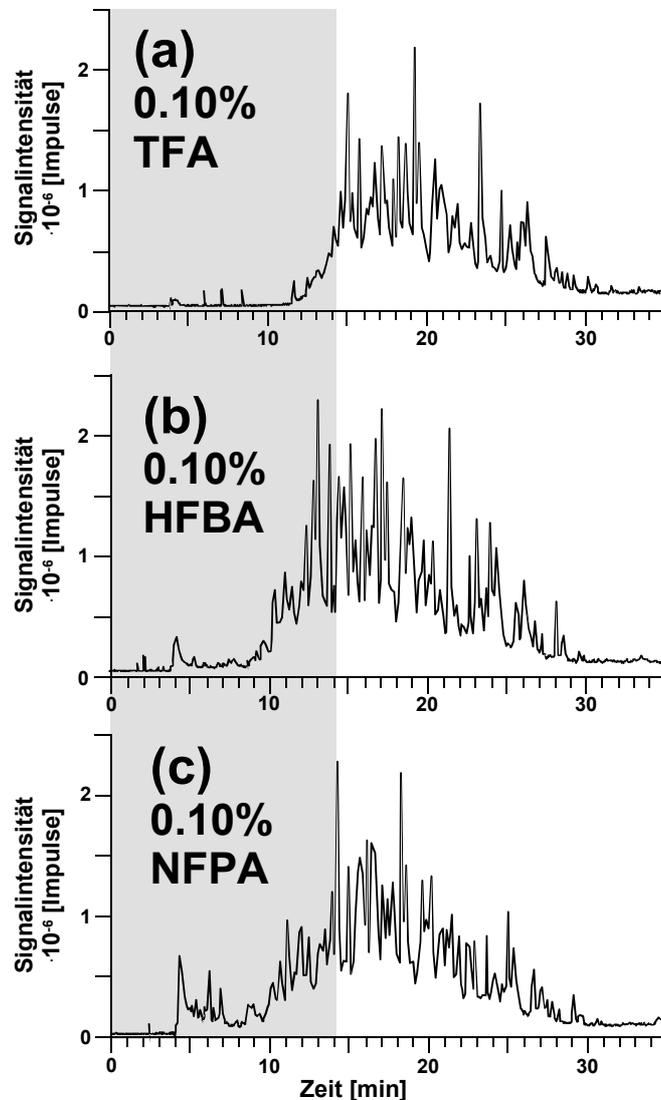


Abbildung 12. IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen eines tryptischen Verdau aus zehn Proteinen unter Verwendung von unterschiedlichen Beladungseluenten für die Aufkonzentrierung an einer monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule.

Säulen, 10 und 60 x 0.20 mm I.D. PS-DVB Anreicherungs- und Trennsäule; Beladungseluent, 0.10% wässrige TFA (a), HFBA (b) und NFPA (c) Lösung; Beladungsdauer, 3 min; Beladungsflussrate, 10 μ l/min; mobile Phase, A) H₂O + 0.050% TFA, B) ACN + 0.050% TFA; Gradient, 0-40% B in 40 min; Flussrate, 2.0 μ l/min (b); Temperatur, 25°C; Detektion, ESI-MS/MS; Probe, 10er Proteinverdau 2, 1:250 verdünnt (Proteinkonzentration, siehe Kapitel 3.1, Tabelle 1), Injektionsvolumen, 10 μ l.

Die aufgenommenen MS/MS-Daten ermöglichten zusätzlich die Identifizierung der Peptide über Datenbankrecherche. Dadurch konnten wir auch quantitative Aussagen bezüglich der Anreicherungs-effizienz treffen. In den ersten 14 min konnte bei den Analysen mit 0.10% TFA als Additiv insgesamt für alle drei Wiederholungsmessungen nur sechs unterschiedliche Peptide identifiziert werden. Mit 0.10% HFBA bzw. NFPA erhöhte sich diese Zahl auf 21 bzw. 18 identifizierte Peptide. Diese Ergebnisse bestätigten die bereits zuvor getroffenen qualitativen Aussagen anhand der rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramme.

Die Gesamtergebnisse der Peptididentifizierung mit 0.050% sowie 0.10% TFA, HFBA und NFPA im Beladungseluenten sind in Abbildung 13 angeführt und einander gegenübergestellt. Die ausgewerteten MS/MS-Daten belegen, dass sowohl die Gesamtanzahl an identifizierten Peptiden als auch die Reproduzierbarkeit der Peptididentifikationen durch Verwendung der hydrophoberen Amphiphile im Beladungseluenten deutlich gesteigert werden konnte. Auch hier zeigt sich wieder, dass man ab einer Konzentration von 0.10% HFBA im Beladungseluenten von einer optimalen Anreicherungs-effizienz beim Aufkonzentrieren der Proben ausgehen kann. Die Verwendung des hydrophoberen Additivs NFPA bewirkte keine signifikante Verbesserung der Ergebnisse. Die leichten Unterschiede in den erhaltenen Werte für 0.10% HFBA bzw. 0.050 und 0.10% NFPA sind nicht auf das Rückhaltevermögen der Anreicherungs-säule zurückzuführen, sondern vielmehr auf die massenspektrometrische Detektion. Die Gesamtanzahl an identifizierten Peptiden für alle drei Wiederholungsanalysen des 10er Proteinverdaus konnte von 88 mit 0.050% TFA auf 114 mit 0.10% HFBA erhöht werden. Des Weiteren konnte die Zuverlässigkeit der Peptididentifizierung gesteigert werden. Während beim Aufkonzentrieren des Proteinverdaus mit 0.050% wässriger TFA-Lösung und der anschließenden IP-RP-Analyse mittels monolithischer Trennsäule nur 42% der identifizierten Peptide in allen drei Wiederholungsmessungen nachgewiesen werden konnten, lag dieser Wert bei 49% für die Analysen mit 0.10% HFBA im Beladungseluenten. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch für die Qualität der Peptididentifikationen, welche über die kumulativen MOWSE Scores aller identifizierten Peptide ausgedrückt werden kann. Im Vergleich zu 0.050% TFA, wo der kumulative MOWSE Score 2953 betrug, lag dieser Wert für 0.10% HFBA bei 3599.

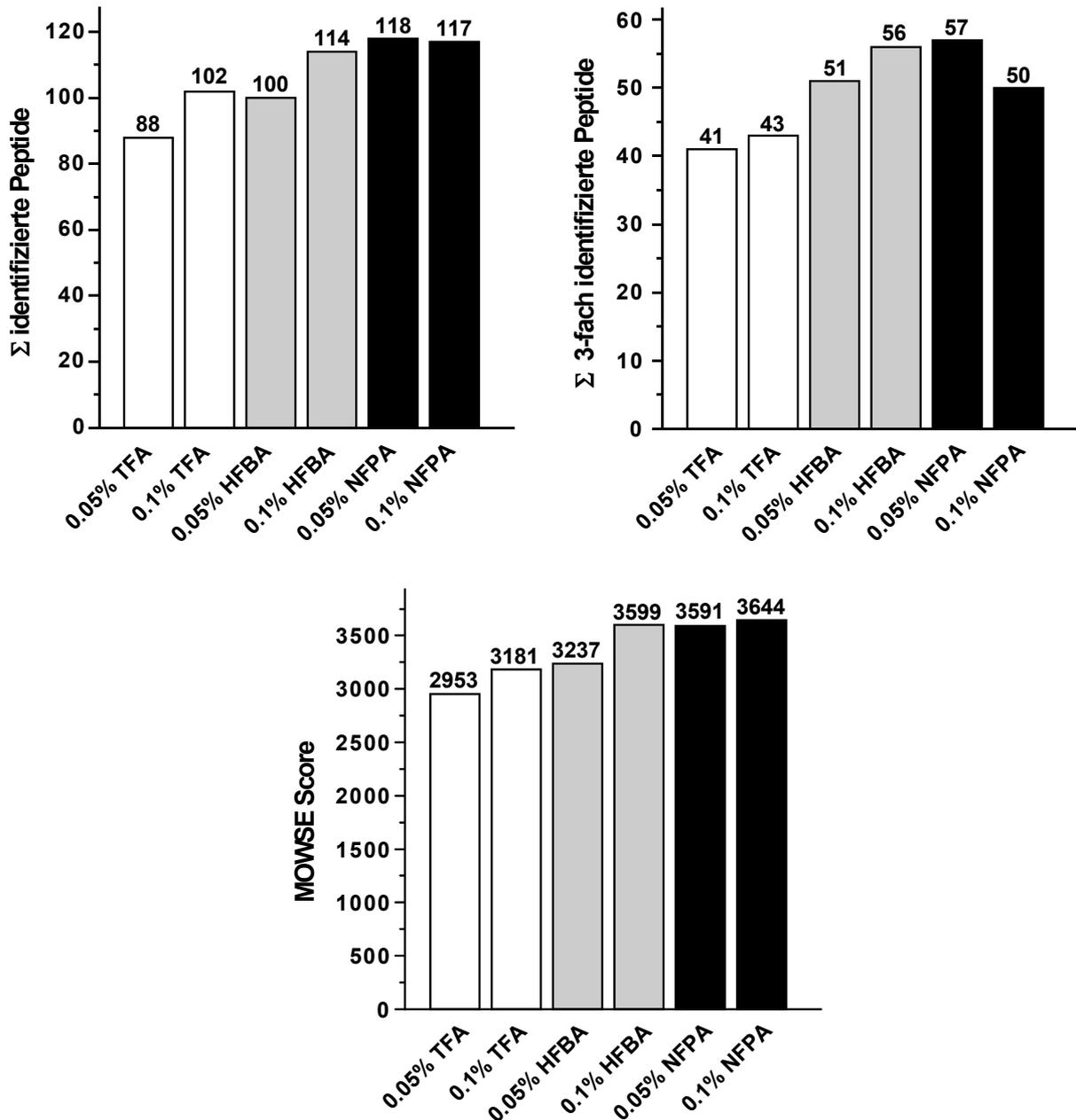


Abbildung 13. Vergleich von IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen eines 10er Proteinverdau mit 0.050% bzw. 0.10% wässriger TFA-, HFBA- und NFPA-Lösung als Beladungseluent bezüglich der Gesamtanzahl an identifizierten Peptiden, der Anzahl an Peptiden, die in allen drei Wiederholungsmessungen identifiziert werden konnten, und der kumulativen MOWSE Scores.

Chromatographische Bedingungen, siehe Abbildung 12.

Über zusätzliche Experimente zur Aufkonzentrierung von Proben an einer 10 x 0.20 mm I.D. monolithischen Anreicherungssäule und anschließender Trennung in einer monolithischen Kapillarsäule konnten neben dem Beladungseluenten noch weitere

Anreicherungsparameter optimiert werden. So ergaben Messungen mit einer 10 x 0.20 mm I.D. Anreicherungsäule, dass bei einer Beladungsflussrate von 10 µl/min und einem maximalen Probenschleifenvolumen von 10 µl, eine Aufkonzentrierungsdauer von 3 min vollkommen ausreichend ist, um die Probe zur Anreicherungsäule zu transferieren und von unerwünschten Bestandteilen, wie z.B. Salzen, zu befreien. Längere Beladungszeiten führten nur zu einer Abnahme der Performance der nachfolgenden Trennung in der monolithischen Kapillarsäule. Des Weiteren erhielt man die beste Trenneffizienz, wenn der Gradient schon während der Beladungsphase gestartet wurde. Hierdurch konnte die Verzögerung des Gradienten (Dwell-Volumen), bis dieser an der Säule ankommt, überbrückt werden. Eine Erhöhung der Temperatur der Trennsäule (25°C-50°C; Anreicherungsäule: 25°C) ergab keine signifikanten Verbesserungen in der Trennleistung des Systems aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule.

4. Zusammenfassung

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass das entwickelte HPLC-System basierend auf monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule für zweidimensionale Protein- bzw. Peptidanalysen anwendbar ist. Das 2D-System, bestehend aus einer off-line Kombination aus starker Kationenaustausch- und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie gekoppelt mit einem ESI-Massenspektrometer, konnte mit vier verschiedenen tryptischen Proteinverdauen, die sich in Konzentration und dynamischem Bereich unterschieden, ausführlich charakterisiert werden. Die rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramme der 29 SCX-Fraktionen belegten die Orthogonalität der gekoppelten Trennmechanismen. Unabhängig vom dynamischen Konzentrationsbereich konnten die Proteine für jeden Verdau mit guten Sequenzabdeckungen über die aufgenommenen MS/MS-Spektren der tryptischen Peptide identifiziert werden. Entscheidend für die Anzahl an Peptiden, die pro Protein identifiziert wurden, war hauptsächlich die Ausgangskonzentration des Proteins in der Probe. Störende Einflüsse auf die Peptididentifizierung durch die Gegenwart von hoch-abundanten Proteinen (Serum Albumin, Cytochrom C) wurden nicht festgestellt. Die Reproduzierbarkeit der Peptididentifizierung, ermittelt aus drei Wiederholungsmessungen pro SCX-Fraktion, lag im Durchschnitt über 50%. Auch hier war jeweils nur die vorliegende Konzentration entscheidend. Die erhaltenen Ergebnisse machten jedoch auch deutlich, dass manche Parameter des 2D-Systems noch verbessert werden mussten damit eine optimale Performance für die Analyse von komplexen Peptid- und Proteinproben gewährleistet ist. So stellte sich heraus, dass einige Peptide über mehrere benachbarte und stellenweise sogar über nicht direkt benachbarte SCX-Fraktionen verteilt waren. Geht man davon aus, dass für diese Verteilung sekundäre solvophobe Wechselwirkungen mitverantwortlich waren, so könnte dieses Phänomen durch Verwendung eines höheren Acetonitrilanteils in den SCX-Eluenten minimiert werden.

Durch Vergleich mit eindimensionalen HPLC-Analysen der Proteinverdau konnte des Weiteren festgestellt werden, dass einige der tryptischen Peptide nur bei den eindimensionalen Messungen identifiziert werden konnten. Da es sich überwiegend um kleine, hydrophile Peptide handelte, konnte man davon ausgehen, dass diese auf der monolithischen Anreicherungsäule nicht zurückgehalten wurden und beim

Aufkonzentrieren und Entsalzen der gesammelten SCX-Fractionen mit 0.050% wässriger TFA-Lösung verloren gingen. Diese Vermutung konnte mit Hilfe eines Peptidstandards aus neun Peptiden und eines tryptischen Verdaus aus zehn Proteinen bestätigt werden.

Aus diesem Grund musste, damit das Setup aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule in einem zweidimensionalen Chromatographiesystem effizient eingesetzt werden konnte, die Retention der Peptide an der Anreicherungsäule erhöht werden. Die hierfür durchgeführten Experimente demonstrierten, dass dies durch Variation des Ionenpaar-Reagenzes im Beladungseluenten bewerkstelligt werden konnte. Hierbei lieferte eine Erhöhung der Konzentration des Ionenpaar-Reagenzes bzw. die Verwendung von stärker hydrophoben Ionenpaar-Reagenzien eine deutliche Steigerung der Anreicherungs-effizienz, was sowohl über die Anzahl und Intensität der Peaks in den aufgenommenen Chromatogrammen als auch über MS/MS-Peptididentifikationen belegt werden konnte. Als Additive für den Beladungseluenten zeichneten sich langkettige perfluorierte Carbonsäuren aus, welche zusätzlich den Vorteil der Flüchtigkeit bieten und somit eine problemlose on-line Kopplung mit der ESI-Massenspektrometrie gewährleisten. Diese Säuren zeigten als Beladungsmitteladditive eine hohe Tendenz um kleine und hydrophile Peptide auf der monolithischen Anreicherungsäule zu retardieren, während hydrophobere Peptide immer noch ohne Schwierigkeiten mit einem entsprechenden Acetonitrilgradienten eluiert werden konnten. Des Weiteren konnte keine signifikante Beeinflussung der nachfolgenden IP-RP-Trennungen der Peptide mit 0.050% TFA als Laufmittelzusatz und der Detektion (UV und MS) durch den verwendeten Beladungseluenten festgestellt werden. Die maximale Anreicherungs-effizienz wurde mit einer wässrigen 0.10% HFBA-Lösung als Beladungseluent für die Peptidproben erzielt. Man kann davon ausgehen, dass durch die größere Hydrophobie dieser perfluorierten Carbonsäure gegenüber TFA, eine stärkere Adsorption an der stationären Phase erfolgt. Dadurch wird ein erhöhtes Oberflächenpotential an der stationären Phase erzeugt und somit eine stärkere Retention der Analyten bewirkt.

Bei den IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen eines tryptischen Verdaus aus zehn Proteinen mit der Kombination aus Anreicherungs- und Trennsäule konnte durch Verwendung der hydrophoberen Additive im Beladungseluenten eine qualitative sowie quantitative Verbesserung der Peptididentifikation erreicht werden. Die verbesserte Peptididentifizierung spiegelte sich in einer größeren Anzahl an

identifizierten Peptiden, einer besseren Reproduzierbarkeit der Peptididentifikationen und einem höheren kumulativen MOWSE Score wider.

Nach der Optimierung der Anreicherungs-effizienz konnte die on-line Kombination aus monolithischer Anreicherungs- und Trennsäule sowohl für die Anwendung in eindimensionalen als auch mehrdimensionalen Analysen von komplexen Peptidmischungen eingesetzt werden.

5. Literatur

1. A. Premstaller, H. Oberacher, C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 72 (2000), 4386-4393.
2. D. J. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.*, 3 (1993), 327-32.
3. D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis*, 20 (1999), 3551-67.
4. H. Toll, R. Wintringer, U. Schweiger-Hufnagel, C. G. Huber, *J. Sep. Sci.* (2005).
5. Y. Shen, J. M. Jacobs, D. G. Camp 2nd, R. Fang, R. J. Moore, R. D. Smith, W. Xiao, R. W. Davis, R. G. Tompkins, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 1134-44.
6. D. M. Maynard, J. Masuda, X. Yang, J. A. Kowalak, S. P. Markey, *J. Chromatogr. B*, 810 (2004), 69-76.
7. M. J. O'Hare, M. W. Capp, E. C. Nice, N. H. Cooke, B. G. Archer, *Anal. Biochem.*, 126 (1982), 17-28.
8. R. A. Barford, B. J. Sliwinski, A. C. Breyer, H. L. Rothbart, *J. Chromatogr.*, 235 (1982), 281-288.
9. W. Walcher, H. Toll, A. Ingendoh, C. G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 1053 (2004), 107-117.
10. M. T. W. Hearn, *J. Liquid Chromatogr.*, 3 (1980), 1255-1276.
11. K. J. Fountain, M. Gilar, J. C. Gebler, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 17 (2003), 646-53.
12. A. Apffel, J. A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W. S. Hancock, *Anal. Chem.*, 69 (1997), 1320-1325.
13. H. Lindner, W. Helliger, *Chromatographia*, 30 (1990), 518-522.
14. C. A. Browne, H. P. J. Bennett, S. Solomon, *Anal. Biochem.*, 124 (1982), 201-208.

15. H. P. J. Bennett, C. A. Browne, S. Solomon, *J. Liquid Chromatogr.*, 3 (1980), 1353-1365.
16. Chen J.-G., S. G. Weber, L. L. Glavina, F. F. Cantwell, *J. Chromatogr. A*, 656 (1993), 549-576.
17. A. Bartha, J. Stahlberg, *J. Chromatogr. A*, 668 (1994), 255-284.
18. M. Patthy, *J. Chromatogr. A*, 660 (1994), 17-23.

Kapitel V

Zweidimensionale Proteomanalyse
des Bakteriums *Myxococcus*
xanthus

V. Zweidimensionale Proteomanalyse des Bakteriums *Myxococcus xanthus*

1. Einleitung

Nachdem die Performance des entwickelten zweidimensionalen HPLC-Systems bestehend aus Kationenaustausch- und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie ausführlich charakterisiert und anschließend optimiert werden konnte, sollte das System für die Proteomanalyse eingesetzt werden. Bei dem Organismus, dessen Proteom wir untersuchen wollten, handelte es sich um *Myxococcus xanthus* Bakterien. Diese Mikroorganismen haben in den letzten Jahren ein großes Interesse geweckt, da sie sich als ausgezeichnete Produzenten von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten herausgestellt haben.

Mikroorganismen, die biologisch aktive Sekundärmetaboliten produzieren, spielen eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie^[1;2]. Zu den seit über 50 Jahren bekannten Bakterien, die solche biologisch aktiven Sekundärmetaboliten synthetisieren, konnten in den letzten Jahren lediglich zwei Bakteriengruppen, die Cyanobakterien und die Myxobakterien^[3], neu hinzugefügt werden. Das Hauptziel bei der Erforschung dieser Bakterien liegt darin, neue und modifizierte Substanzen mit biologischer Aktivität zu identifizieren und deren Biosynthese über biotechnologische Prozesse kontrollieren sowie optimieren zu können. Die Sekundärmetaboliten der Myxobakterien, wie z.B. Myxovirescin, Epothilon oder Myxothiazol, werden meistens enzymatisch aus Carbon- und Aminosäuren über nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) bzw. Polyketidsynthetasen (PKS), für die bereits eine große Anzahl von biosynthetischen Genclustern in dem Genom der Myxobakterien identifiziert werden konnte, synthetisiert^[4-6]. Durch die Analyse des Proteoms dieser Bakterien kann ein besseres Verständnis der Biosynthese der Sekundärmetaboliten gewonnen werden. Außerdem kann die Expression von biosynthetischen Genclustern über die entsprechende Proteinidentifizierung belegt werden, um so die Existenz von weiteren Sekundärmetaboliten postulieren zu können.

Da Proteome sich durch eine extrem hohe Komplexität und einen sehr großen dynamischen Bereich ($1-10^8$) auszeichnen, erfordert deren Analyse die Anwendung

von Methoden mit hoher Auflösung und Peakkapazität sowie niedrigem Detektionslimit. Das entwickelte zweidimensionale HPLC-System gekoppelt mit einem ESI-Massenspektrometer erfüllt diese Anforderungen und ist daher optimal geeignet für die Analyse des *Myxococcus xanthus* Proteoms. Die Verwendung der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zur Auftrennung des Proteoms bietet in diesem Fall gegenüber der häufig verwendeten zweidimensionalen Gelelektrophorese den großen Vorteil, dass diese auch die Analyse von sehr großen und hydrophoben Proteinen erlaubt^[7]. Denn gerade bei den für die pharmazeutische Biotechnologie interessanten nichtribosomalen Peptidsynthetasen und Polyketidsynthetasen, welche für die Herstellung der Sekundärmetaboliten verantwortlich sind, handelt es sich meist um sehr große Proteine mit molekularen Massen von einigen 100 bis 1000 kDa^[8-11].

Da die Trennung von Proteinen auf intakter Ebene aufgrund des breiten Spektrums an physikalischen und chemischen Eigenschaften meist sehr schwierig ist, sollte die Proteomanalyse nach der Bottom-Up Methode erfolgen^[12]. Aus diesem Grund wurde das *Myxococcus xanthus* Lysat tryptisch verdaut und über das entwickelte 2D-System, bestehend aus Kationenaustausch- und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie, aufgetrennt. Über Tandem-Massenspektrometrie und Peptid-Fragment Fingerprinting konnten die Peptide des *Myxococcus xanthus* Proteoms anschließend identifiziert und den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden. Die Analyse dieser komplexen Probe gab uns die Möglichkeit zu zeigen, ob das entwickelte 2D-System unter Verwendung von monolithischen Säulen für die Proteomanalyse geeignet ist. Anhand der Fülle von Identifikationsdaten konnten wir zusätzlich noch das System ausführlich charakterisieren. Die Charakterisierung beinhaltete hierbei unter anderem die Orthogonalität der beiden Trennmethode, die Verschleppung von Peptiden über mehrere Fraktionen, die Anzahl an identifizierten Peptiden bzw. Proteinen und die Reproduzierbarkeit der Identifikation. Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt der Analyse der Myxobakterien stellte die Identifizierung von Proteinen dar, die nachweislich an der Bildung von Sekundärmetaboliten beteiligt sind.

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Materialien

Acetonitril (E Chromasolv), Dithiothreitol (min. 99%), 2-Mercaptoethanol (> 98%) und Harnstoff ($\geq 99.5\%$) wurden bei Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) gekauft. Ammoniumhydrogencarbonat ($\geq 99.5\%$), Iodessigsäure ($\geq 99.5\%$), Trifluoressigsäure (TFA, $\geq 99.5\%$) und Heptafluorbuttersäure (HFBA, $\geq 99.0\%$) wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat (p. a.) war von Merck (Darmstadt, Deutschland) und Natriumchlorid (p. a.) von Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland). Modifiziertes Trypsin für den enzymatischen Proteinverdau wurde von Promega (Madison, WI, USA) bezogen. Das in den Experimenten verwendete Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Schweiz) aufbereitet. Dialyse-Kassetten (Slide-A-Lyzer) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 3500 Da und einem Fassungsvermögen von 500 μl wurden bei Perbio Science (Bonn, Deutschland) gekauft.

Die Quarzkapillaren waren von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) und die PEEK Kapillaren sowie Sleeves, Unions und Fittings waren von Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, USA).

2.2 Geräte

Das HPLC-System für die Kationenaustauschchromatographie in der 1. Dimension bestand aus einer Niederdruck-Gradienten Pumpe (Modell M480G, Gynkotek, Germering, Deutschland), einem manuellen Injektor mit 200 μl Probenschleife (Modell 7125, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), einem 2-Kanal Vakuum-Entgaser (Modell K-5002, Knauer, Berlin, Deutschland), einem UV-Detektor mit 12 μl Flusszelle (Modell 731.81, Knauer, Berlin, Deutschland) und einer starken Kationenaustauschersäule mit pellicularen Poly(Ethylstyrol-Divinylbenzol) Partikeln als stationäre Phase (ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D., Dionex, Idstein, Deutschland). Zum Aufkonzentrieren der gesammelten SCX-Fractionen wurde ein Vakuum-Konzentrator von Eppendorf (Modell 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) benutzt.

Für die IP-RP-HPLC in der zweiten Dimension wurde ein UltiMate Capillary/Nano LC System von LCPackings – A Dionex Company (Amsterdam, Niederlande) eingesetzt. Dieses System beinhaltet eine UltiMate Anlage bestehend aus Mikro-Niederdruck-Gradientenpumpe mit passivem Flusssplit-System, Säulenofen, UV-Detektor (Modell UVD 3000) und Helium-Entgasungsmodul, ein Switchos Säulenschaltmodul bestehend aus Beladungspumpe und zwei 10-Wege Ventilen und eine Famos Anlage als Mikro-Autosampler. Die Anreicherungs- (10 x 0.20 mm I.D.) und Trennsäule (60 x 0.10 mm I.D.), für die Aufkonzentrierung der SCX-Fraktionen und anschließende IP-RP-Trennung, enthielten eine monolithische stationäre Phase basierend auf Poly(Styrol-Divinylbenzol) und wurden nach dem Protokoll von Premstaller et al.^[13] angefertigt (auch kommerziell bei LC Packings – A Dionex Company erhältlich). Die monolithische Anreicherungs- und Trennsäule wurden so über ein 10-Wege Ventil am Säulenschaltmodul miteinander on-line gekoppelt, dass die aufkonzentrierten und entsalzten Analyten im Backflush-Modus von der Anreicherungsäule auf die Trennsäule transferiert werden konnten.

Zur Detektion wurde ein Elektrospray-Ionenfallen Massenspektrometer von Bruker Daltonics (Modell Esquire HCT, Bremen, Deutschland) mit modifizierter ESI-Quelle (Spraynadel: Quarzkapillare, 0.090 mm O.D., 0.020 mm I.D.) benutzt. Folgende massenspektrometrischen Parameter wurden für die Aufnahme der MS/MS-Spektren im positiven Modus eingestellt: Scanmodus, Ultrascan (50 – 3000 m/z); Scangeschwindigkeit, 26000 m/z pro s; Fullscan, 400 – 1500 m/z; Ionenpolarität, positiv; Trap drive, 93.2; Oktapol RF Amplitude, 88.5 Vpp; Linse 2, -36.1 V; Kapillarenausgang, 253.8 V; Temperatur der Glaskapillare, 300°C; Nebulizerspray, 20 psi; Trockengas, 4 l/min; Elektrosprayspannung, -3500 V; Offset der Endplatte, -500 V; ICC, 70000; maximale Akkumulationszeit, 200 ms; Scans pro Spektrum, 5; Precursor-Ionen Auto MS(n), 3; MS/MS Scanbereich, 200-2000 m/z; aktiver Ausschluss, nach 2 Spektren für 0.60 min; MS/MS Fragmentierungsamplitude, 1.5 V; Smart Fragmentierung, on (30-200%); absoluter MS/MS Schwellenwert, 2000.

2.3 Enzymatischer Verdau des *Myxococcus xanthus* DK1622 Proteoms

Der Aufschluss der *Myxococcus xanthus* DK1622 Zellen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. R. Müller (Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des

Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland) durchgeführt. Das anschließend erhaltene Lysat wurde uns für die zweidimensionale Proteomanalyse zur Verfügung gestellt. Der *Myxococcus xanthus* Stamm DK1622 war von Dale Kaiser (Stanford University, Palo Alto, CA, USA). Das Proteinlysate lag in einer wässrigen Lösung aus 4.0 molarem Harnstoff und 30 millimolarem Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) mit einem pH-Wert von 6.5 vor. Die über einen Bradford-Test^[14] abgeschätzte Proteinkonzentration lag bei ungefähr 3 µg/µl.

Für den enzymatischen Verdau wurden 300 µg des *Myxococcus xanthus* Lysats in 160 µl einer wässrigen Lösung mit 8.0 mol/l Harnstoff und 0.50 mol/l Ammoniumhydrogencarbonat für 30 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurden die Cystine mit 60 µl einer 0.3 mol/l wässrigen Dithiothreitol-Lösung 4 h lang bei 37°C reduziert. Die Cysteine wurden mit einer 2.0 molaren Iodessigsäure-Lösung (4.0 µl) für 15 min bei Raumtemperatur carboxymethyliert. Die überschüssige Iodessigsäure wurde danach durch Zugabe von 8.0 µl 2-Mercaptoethanol (1.0 mol/l) entfernt. Die Aufreinigung der denaturierten und alkylierten Proteinlösung erfolgte mittels 24-stündiger Dialyse gegen 1.0 l destilliertes Wasser. Hierfür wurde die Proteinlösung quantitativ in eine 500 µl Dialyse-Kassette mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 3500 Da überführt. Die dialysierte Proteinlösung wurde anschließend mit 20 µg Trypsin, welches zuvor für 30 min bei 37°C in 20 µl einer 50 mM Essigsäure-Lösung aktiviert wurde, enzymatisch verdaut. Der tryptische Verdau wurde abschließend durch Zugabe von 1 Vol% Trifluoressigsäure abgebrochen.

2.4 Computerunterstützte Datenauswertung der Massenspektren

Die Software DataAnalysis 3.1 von Bruker (Bremen, Deutschland) wurde für die Auswertung der aufgenommenen MS-Daten verwendet. Hierbei wurden folgende Parameter für die Peakdetektion in den rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogrammen verwendet: S/N Grenzwert: 0.001; relativer Grenzwert für die Peakfläche: 0.1%; relativer Grenzwert für die Signalintensität: 0.1%; Skim-Verhältnis: 0.1; Glättungsweite: 1. Die Massenlisten wurden mit Hilfe des Peakdetektions-Algorithmus Apex und den nachfolgenden Parameter erstellt: Peakbreite (FWHM): 0.1 m/z; S/N Grenzwert: 1; relativer Grenzwert für die Intensität (Basepeak): 2%; absoluter Grenzwert für die Intensität: 100. Die Einstellungen für die automatische

Dekonvolution der Massenspektren waren: aufgelöste Isotopen Dekonvolution: max. Ladung 3; Molekülonen Dekonvolution: max. Ladung 4; MW Übereinstimmung: 5 [0.01%]; minimale Anzahl an Peaks pro Komponente: 3.

Die Datenbankrecherchen zur Peptididentifikation wurden mit der Biotoools Software 2.2 von Bruker (Bremen, Deutschland) und der Mascot Software 2.0 von Matrix Science (London, Großbritannien), welche auf dem MOWSE (Molecular Weight Search) Algorithmus basiert^[15;16], durchgeführt. Alle aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden mit theoretisch berechneten MS/MS-Spektren einer Datenbank, die alle bekannten Open Reading Frames (offenen Leserahmen) von *Myxococcus xanthus* DK 1622 enthielt (7413 Einträge^[17], <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>), verglichen. Folgende Suchkriterien wurden dabei ausgewählt: Taxonomy, alle Einträge; feststehende Modifikation, carboxymethyliert; Protease, Trypsin; Peptid-Toleranz, ± 1.3 Da; MS/MS-Toleranz, ± 0.3 Da; maximale Anzahl an missed cleavages, 2.

Jedes Protein, dessen Hit innerhalb eines 95% Signifikanzintervalls lag, galt als korrekt identifiziert. Damit lag die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den identifizierten Proteinen um falsch zugeordnete Proteine handelte unter 5%. Das Kriterium für eine positive Peptididentifizierung lag bei einem MOWSE Score größer als 27. Dieser Score wurde von der Mascot Software für nahezu alle identifizierten Peptide als Grenzwert für einen signifikanten Treffer angegeben. Die isoelektrischen Punkte (pI-Werte) der identifizierten Peptide wurden über das online auf dem ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik verfügbare Protein/Peptid-Charakterisierungsprogramm ProtParam berechnet (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 SCX-Trennung des *Myxococcus xanthus* Lysats in der 1. Trenndimension

Für die Analyse des *Myxococcus xanthus* DK1622 Proteoms wurden 100 µl vom tryptisch verdauten Lysat in die 1. Dimension (starke Kationenaustauschchromatographie) aufgegeben. Da sich bei Vorversuchen herausstellte, dass ein Großteil der tryptischen Peptide im vorderen Bereich der SCX-Trennung eluierte, wurde ein sehr flacher Salzgradient mit insgesamt drei unterschiedlich steilen Segmenten verwendet (1. Segment: 0-0.015 mol/l NaCl in 0.050 mol/l NaH₂PO₄-Puffer mit pH 3 in 9 min; 2. Segment: 0.015-0.050 mol/l in 8 min; 3. Segment: 0.050-0.50 mol/l in 4 min). Des Weiteren wurden speziell während den ersten 10 min der SCX-Trennung relativ viele Fraktionen in kurzen Zeitabständen (0.5 min) gesammelt. Nach diesen 10 min wurden die Fraktionierungsintervalle auf 1 min erhöht. Bei einer eingestellten Flussrate von 1.0 ml/min erhielten wir somit Fraktionsvolumina von 0.5 bzw. 1.0 ml. Zur Unterdrückung von sekundären solvophoben Wechselwirkungen der stationären SCX-Phase mit den Peptiden enthielten die Eluenten für die kationenaustauschchromatographische Fraktionierung jeweils 20% Acetonitril (pH-Wert der Eluenten wurde vor der Zugabe des organischen Lösungsmittel eingestellt). Das entsprechende UV-Chromatogramm der SCX-Trennung ist in Abbildung 1 dargestellt. Zusätzlich sind im Chromatogramm die gesammelten Fraktionen und der verwendete Salzgradient hervorgehoben.

Aufgrund der hohen Komplexität der Probe kann man nahezu keine einzelnen aufgetrennten Peaks im Chromatogramm erkennen. Die Signalintensität erlaubt jedoch eine grobe Einschätzung der vorliegenden Peptidkonzentration und somit eine entsprechende Anpassung der Fraktionierungsintervalle. Gerade der vordere Bereich des Chromatogramms, der sich durch eine hohe Signalintensität auszeichnet, spricht dafür, dass relativ viele Peptide nahezu isokratisch von der SCX-Säule eluieren (1-5 min). Die restlichen Peptide scheinen der Signalintensität nach zu schließen relativ homogen über die SCX-Trennung verteilt zu sein.

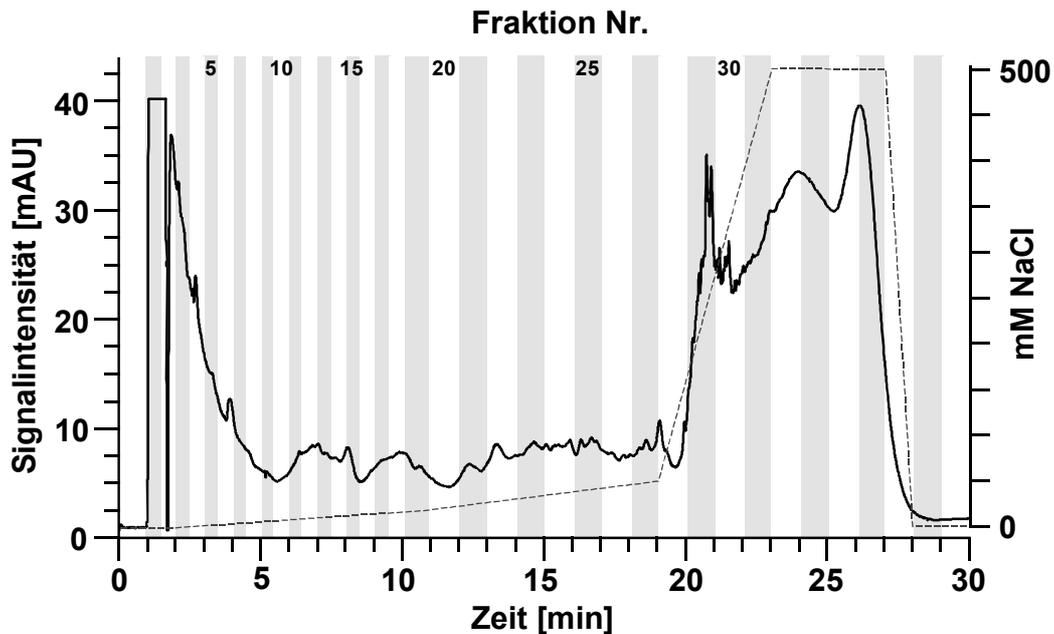


Abbildung 1. Starke Kationenaustausch-Fraktionierung eines tryptisch verdauten *Myxococcus xanthus* Lysats (1. Dimension).

Säule, ProPac SCX-10, 250 x 4.0 mm I.D.; mobile Phase, A) 5.0 mmol/l wässriger NaH_2PO_4 Puffer mit 20.0% Acetonitril, pH 3.0, B) 0.50 mol/l NaCl in Eluent A); Gradient, 0-3% B in 9.0 min, 3-10% B in 8 min, 10-100% B in 4 min; Flussrate, 1.0 ml/min; Temperatur, 25°C; Detektion, UV bei 214 nm; Probe, tryptischer Verdau eines *Myxococcus xanthus* DK1622 Lysats; Injektionsvolumen; 100 μl ; Fraktionierung, 18 0.5-min Fraktionen (1-10 min), 18 1.0-min Fraktionen (10-28 min).

Jede der insgesamt 36 SCX-Fractionen wurde anschließend mit Hilfe eines Vakuum-Konzentrators auf ein Volumen von 100 μl eingeeengt (5-fache bzw. 10-fache Aufkonzentrierung der 0.5 bzw. 1.0 ml Fraktionen). Dieser Schritt gewährleistete neben der Erhöhung der Peptidkonzentration in den Fraktionen auch die Entfernung der darin enthaltenen 20% Acetonitril, welche die Entsalzung und anschließende Trennung in der 2. Dimension negativ beeinflusst hätten.

3.2 IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen der *Myxococcus xanthus* SCX-Fractionen (2. Trenndimension)

Jeweils 10 μl der eingeeengten SCX-Fractionen wurden in die 2. Dimension mit der Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie injiziert. Dort wurden die Fraktionen zuerst an einer monolithischen PS-DVB Anreicherungssäule (10 x 0.20 mm I.D.) mit

einer 0.10% wässrigen HFBA-Lösung entsalzt und aufkonzentriert (Beladungsflussrate: 10 µl/min). Die Dauer des Aufkonzentrierens wurde hierbei von 3 auf 4 min erhöht, da für die Injektion in die 2. Dimension eine 20 µl Probenschleife verwendet wurde. Durch die Verwendung der 20 µl Probenschleife konnten die 10 µl der SCX-Fractionen jeweils im Partial Loop Modus injiziert werden. Dieser Injektionsmodus benötigt im Gegensatz zum Full Loop Modus wesentlich weniger Probe für die gleiche Injektionsmenge. Für die Injektion von 10 µl benötigt man bei einer 10 µl Schleife mit Full Loop Injektion ca. 35 µl Probe und im Gegensatz dazu mit einer 20 µl Schleife und Partial Loop Injektion nur ca. 15 µl. Dieser geringe Verbrauch an Probe ermöglichte uns die Durchführung von jeweils vier Wiederholungsmessungen pro SCX-Fraktion. Die an der Anreicherungsäule aufkonzentrierten Proben wurden anschließend im Backflush-Modus zur monolithischen PS-DVB Trennsäule (60 x 0.10 mm I.D.) transferiert. Bei der Trennsäule entschieden wir uns für einen Innendurchmesser von 100 µm, da diese, wie wir bereits zeigen konnten, eine höhere Massenempfindlichkeit als die monolithischen Trennsäulen mit 200 µm Innendurchmesser gewährleistet. Durch die höhere Massenempfindlichkeit sollten neben den hoch-abundanten Proteinen auch möglichst viele niedrig-abundante Proteine identifiziert werden, um somit einen relativ großen dynamischen Bereich des *Myxococcus xanthus* Proteoms analysieren zu können. Die IP-RP-Trennung wurde mit einem 90 min Acetonitrilgradienten und Trifluoressigsäure (0.050%) als Ionenpaar-Reagenz durchgeführt (0-20% ACN in 90 min). Die getrennten Peptide wurden on-line mittels ESI-MS/MS detektiert und anschließend über Datenbankrecherche identifiziert. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramme von vier aufeinander folgenden SCX-Fractionen (Fraktion 21, 22, 23 und 24). Die homogene Verteilung der Peptide bei allen vier Trennungen über den kompletten Acetonitrilgradienten bestätigt die Orthogonalität der verwendeten Trennmechanismen. Die Vielzahl an Peaks, welche man trotz vorhergehender SCX-Fraktionierung noch in den einzelnen IP-RP-Chromatogrammen erhält, verdeutlicht die Komplexität des tryptisch verdauten *Myxococcus xanthus* Lysats. Im Gegensatz zur SCX-Trennung sind hier jedoch mehrere gut aufgelöste Peaks in den Chromatogrammen zu erkennen. Dies kann neben der höheren Trennleistung der IP-RP-HPLC auch auf die effiziente Vorfraktionierung der Probe mittels Kationenaustauschchromatographie in der 1. Dimension zurückgeführt werden.

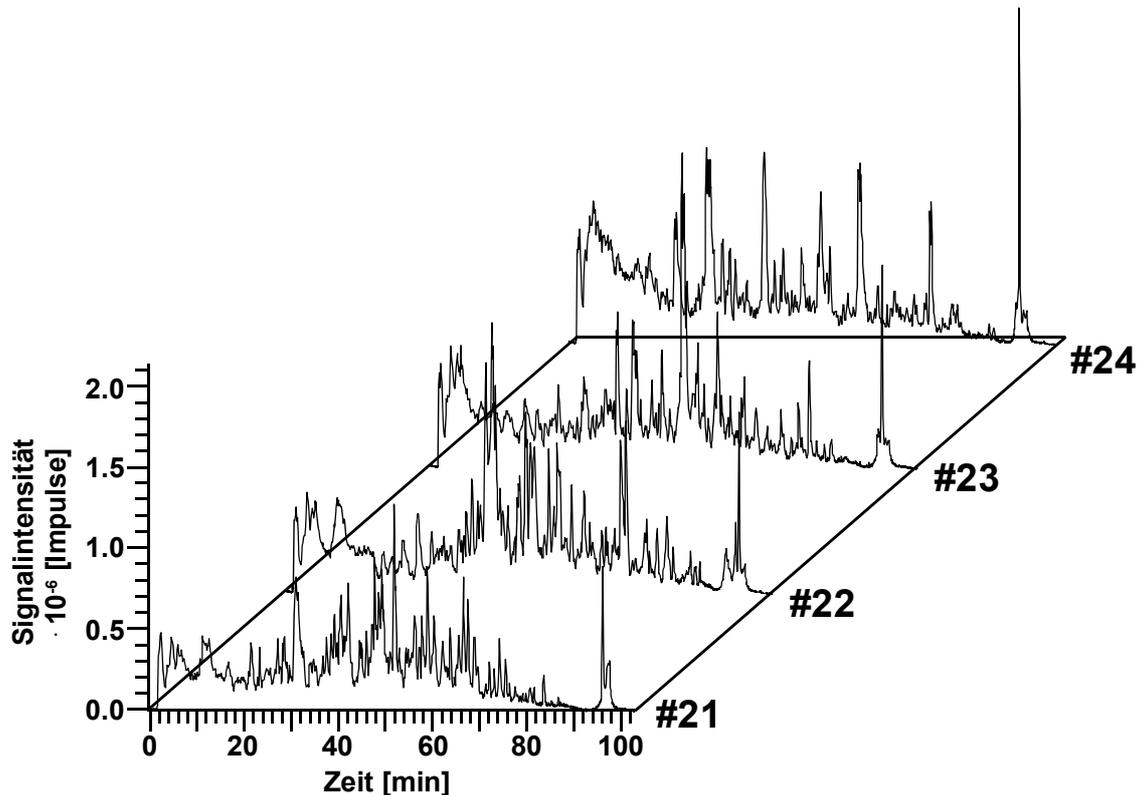


Abbildung 2. Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC-ESI-MS/MS Analysen von vier SCX-Fractionen (2. Dimension).

Säulen, 10 x 0.20 mm I.D. und 60 x 0.10 mm I.D. PS/DVB-Monolithen; Beladungseluent, 0.10% wässrige Heptafluorbuttersäure, Beladungsdauer, 4 min; Beladungsflussrate, 10 µl/min; mobile Phase, A) 0.050% wässrige Trifluoressigsäure, B) 0.050% Trifluoressigsäure in Acetonitril; Gradient, 0-20% B in 90 min; Flussrate, 600 nl/min; Temperatur von Anreicherungs- und Trennsäule, 25°C; Detektion, ESI-MS/MS; Probe, SCX-Fraktion 21-24; Injektionsvolumen, 10 µl.

Die nach den IP-RP-Trennungen aufgenommenen ESI-MS/MS-Spektren wurden mit Hilfe der Mascot Software von Matrix Science und den im experimentellen Teil angeführten Suchparametern mit einer Datenbank bestehend aus allen bekannten Open Reading Frames (ORFs) des *Myxococcus xanthus* DK1622 Organismus verglichen. Die Gesamtanzahl an zugeordneten Peptidhits für alle 4-fach analysierten SCX-Fractionen ist in Abbildung 3a als Balkendiagramm dargestellt. In den letzten sechs Fraktionen (SCX-Fraktion 31-36), die beim Waschen der SCX-Säule mit 0.5 M NaCl-Lösung (Eluent B) gesammelt wurden, konnten keine Peptide mehr identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden diese Fraktionen bei den Auswertungen nicht mit angegeben. Jeder Balken in Abbildung 3a repräsentiert die

Anzahl an Peptidhits, die pro Fraktion für insgesamt alle vier Wiederholungsmessungen erhalten wurde. Alle Hits zusammengefasst ergibt dies eine Gesamtanzahl von 5290 signifikanten Peptididentifikationen mit einem MOWSE Score größer als 27.

Durch die Auswertung der Wiederholungsmessungen konnte die Reproduzierbarkeit der Peptididentifikation in der 2. Dimension für jede SCX-Fraktion bestimmt werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3b dargestellt. Die Berücksichtigung der Mehrfach-Identifizierung von Peptiden, aufgrund der vier Wiederholungsmessungen, führte zwangsläufig zur Verringerung der Zahl an Peptidhits pro SCX-Fraktion. Die Reproduzierbarkeit der Peptididentifikation ist farblich in den einzelnen Balken hervorgehoben. Die IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen in der 2. Dimension zeichneten sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit in der Peptididentifikation aus. In nahezu jeder Fraktion konnten 40 - 50% der Peptide in allen vier Wiederholungsmessungen identifiziert werden. Jeweils 10 - 20% der Peptide konnten in drei bzw. zwei Analysen pro Fraktion nachgewiesen werden. Neben diesen gab es jedoch auch verhältnismäßig viele signifikante Peptididentifikationen, die nur in einer der vier Wiederholungsmessungen auftraten (20-30%). Dieser Sachverhalt verdeutlicht, wie bereits zuvor die Ergebnisse in Kapitel IV (3.1), den hohen Stellenwert von Wiederholungsmessungen für die Identifikationsrate von Peptiden bzw. Proteinen. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so konnte jedes Peptid im Mittel 2.5-mal in den vier Wiederholungsmessungen pro Fraktion identifiziert werden. Berücksichtigt man die Peptide nur in den Fraktionen, in denen diese zum ersten Mal für die gesamte Messserie in der 2. Dimension identifiziert worden sind, so kommt man zu der Verteilung in Abbildung 3c. Die 1312 Peptide, deren Verteilung hier über die 30 analysierten SCX-Fraktionen dargestellt ist, repräsentieren die Gesamtanzahl an unterschiedlichen Peptiden, die signifikant für die Analyse des *Myxococcus xanthus* Proteoms in der 2. Dimension identifiziert werden konnten. In allen 144 IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen (36 SCX-Fraktionen x 4 Wiederholungsmessungen) konnten insgesamt 27% der 1312 Peptide nur mit einer Analyse nachgewiesen werden, 15% mit zwei, 12% mit drei und 46% mit vier oder mehr Analysen (bis zu 25 Analysen). Die Identifizierung von Peptiden durch mehr als vier Analysen kommt durch die Verschleppung dieser Peptide über mehrere SCX-Fraktionen zustande.

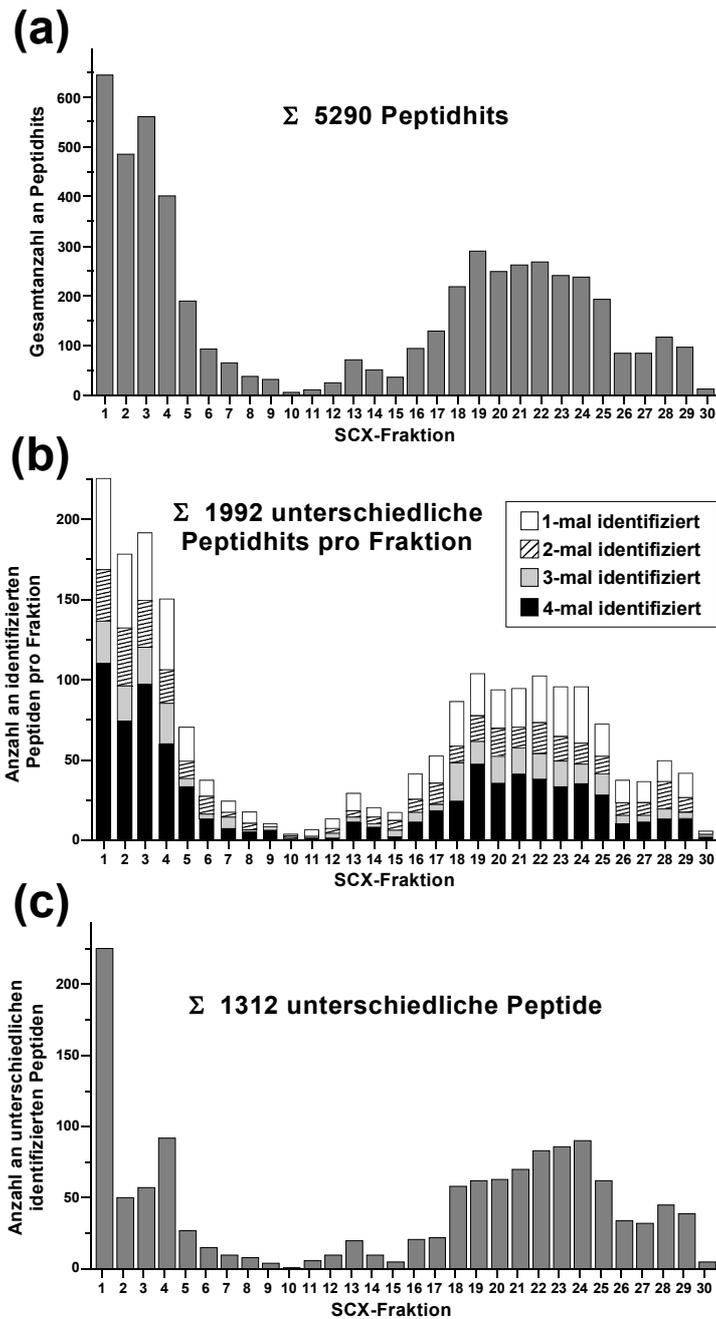


Abbildung 3. Peptididentifizierung für alle 30 SCX-Fraktionen.

a) Verteilung der Gesamtanzahl an Peptidhits für alle vier IP-RP-Wiederholungsanalysen über die 30 SCX-Fraktionen; b) Verteilung der Peptidhits über die 30 SCX-Fraktionen unter Berücksichtigung von mehrfach Identifikationen pro Fraktion aufgrund der Wiederholungsmessungen, mit zusätzlicher Angabe der Identifikationsreproduzierbarkeit; c) Verteilung der unterschiedlichen Peptide, welche in keiner der vorherigen SCX-Fraktionen identifiziert werden konnten.

Die Anzahl der signifikanten Peptididentifikationen zeigt für alle Auswertungen in Abbildung 3 eine bimodale Verteilung mit Maxima in Fraktion 1 und 19 bzw. 24 und einem Minimum in Fraktion 10. Diese Art der Verteilung kann zum einen durch die unterschiedlichen Fraktionierungsintervalle und zum anderen durch die Anzahl der positiven Ladungen in den Peptiden und die entsprechende Selektivität der verwendeten SCX-Säule erklärt werden. Vergleicht man die Peptidverteilung mit dem UV-Chromatogramm der SCX-Trennung in Abbildung 1 so erkennt man auch hier ein sehr intensives Signal während der ersten Minuten, das schließlich abnimmt und bei 5.5 min, was der Fraktion 10 entspricht, ein Minimum erreicht. Der erneute Anstieg in der Anzahl an positiven Peptidhits ab Fraktion 18 kann dadurch erklärt werden, dass ab dieser Fraktion die Fraktionierungsdauer von 0.5 min auf 1.0 min verlängert wurde, wodurch auch die gesammelte Peptidmenge pro Fraktion erhöht wurde. Da die Retention der Peptide an der starken Kationenaustauschphase von der Zahl der basischen funktionellen Gruppen und deren Zugänglichkeit abhängig ist, kann das Verteilungsmuster der Peptididentifikationen auch auf die Selektivität der SCX-Säule und die angewendeten Elutionsbedingungen zurückgeführt werden. Da viele der tryptischen Peptide nur zwei basische funktionelle Gruppen besitzen, das primäre Amin am N-Terminus und ein Arginin bzw. Lysin am C-Terminus (tryptische Spaltstelle), werden diese relativ schwach retardiert und eluieren früh von der SCX-Säule. Andere Peptide mit zusätzlichen positiv geladenen Gruppen in ihrer Aminosäuresequenz (z.B. Histidin oder Arginin/Lysin von unverdauten Spaltstellen) adsorbieren stärker an der SCX-Phase und benötigen deshalb eine erhöhte Salzkonzentration in der mobilen Phase, um von der Säule zu eluieren. Da wir jedoch einen sehr flachen Salzgradienten für die Fraktionierung des *Myxococcus xanthus* Verdaus eingesetzt hatten, wurde relativ viel Zeit benötigt bis die Salzkonzentration in der mobilen Phase ausreichte, um die stärker adsorbierten Peptide zu eluieren. Aufgrund des sehr flachen Salzgradienten belegt die hohe Anzahl an identifizierten Peptiden in den ersten Fraktionen, dass die Selektivität der verwendeten SCX-Säule gerade für Peptide mit wenigen positiv geladenen Gruppen nicht sehr groß ist. Diese scheinen nahezu alle unter isokratischen Bedingungen von der Säule zu eluieren. Anders sieht es hingegen bei der Selektivität für mehrfach positiv geladene Peptide aus. Die später eluierenden Peptide konnten in einer relativ hohen Anzahl und homogenen Verteilung über mehrere Fraktionen (18-25) hinweg detektiert werden. Insgesamt konnte eine relativ gleichmäßige Verteilung der Peptide

über sämtliche SCX-Fractionen durch den Einsatz des sehr flachen Salzgradienten erreicht werden. Die relativ geringe Selektivität der SCX-Säule für Analyten mit wenigen positiv geladenen Gruppen ist auf die unporöse stationäre Phase und die daraus resultierende niedrige Austauschkapazität zurückzuführen. Auf der anderen Seite gewährleistet diese Phase jedoch einen schnellen Massentransfer der Analyten und somit eine hohe Trenneffizienz. Durch Verwendung einer porösen SCX-Phase in der 1. Trenndimension könnte vielleicht eine noch homogenere Verteilung der Peptide über die Fraktionen, aufgrund einer höheren Selektivität, erreicht werden. Dies würde jedoch gleichzeitig zu einer Abnahme der Trenneffizienz und zu einer stärkeren Verteilung der Peptide über mehrere benachbarte Fraktionen führen. Das Auftreten eines bimodalen Retentionsmusters von tryptischen Peptiden bei der Verwendung von anderen starken Kationenaustauschphasen wurde auch schon von Gilar et al. beschrieben^[18;19].

3.3 Abhängigkeit der Retention von Peptiden an der ProPac SCX-10 Phase

Da wir über die Peptidhitsverteilung in den Fraktionen schon grob eine Einschätzung der Selektivität der verwendeten SCX-Säule treffen konnten, wollten wir anschließend die Abhängigkeit der Retention näher untersuchen. Bezieht man sich bei dem Retentionsverhalten von Peptiden an starken Kationenaustauschphasen auf deren pI-Werte, so sollten prinzipiell Peptide mit einem niedrigen pI-Wert relativ früh von der SCX-Säule eluieren, wohingegen Peptide mit einem hohen pI-Wert relativ spät eluieren sollten. Dieses Retentionsverhalten konnte zum Beispiel für das tryptische Peptidpaar *ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVR/ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVRR*, welches sich nur durch ein zusätzliches Arginin am C-Terminus (eine unverdaute Spaltstelle) unterscheidet, bestätigt werden. Durch das zusätzliche Arginin verschob sich die Retentionszeit bei der SCX-Trennung, der ansonsten in ihren chemischen Eigenschaften gleichen Peptide, von 1.5 auf 11.0 min. Dieses Retentionsverhalten kann somit auf die zusätzliche positive Ladung im Peptid bzw. auf den erhöhten pI-Wert (von 6.05 auf 9.64) zurückgeführt werden. Abbildung 4 zeigt die rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogramme der SCX-Fractionen 1 und 19, in denen die beiden Peptide identifiziert wurden, zusammen mit den entsprechenden extrahierten Ionenspuren und den dazugehörigen

Massenspektren. Nicht unerwartet zeigte das Peptid mit dem zusätzlichen Arginin auch eine stärkere Retention bei der IP-RP-HPLC in der 2. Dimension, was durch den Vergleich der Retentionszeiten ersichtlich wird (Abbildung 4a, $t_R = 66.7$ min; Abbildung 4b, $t_R = 76.9$ min). Im Massenspektrum für das Peptid *ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVR* ist deutlich das 2-fach positiv geladene Ion zu erkennen und für das Peptid *ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVRR* das 3-fach positiv geladene. Durch Fragmentierung dieser Ionen und den daraus erhaltenen Fragmentspektren konnten die Peptide über Datenbankrecherche eindeutig identifiziert werden (MOWSE Score: *ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVR*: 57, *ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVRR*: 62).

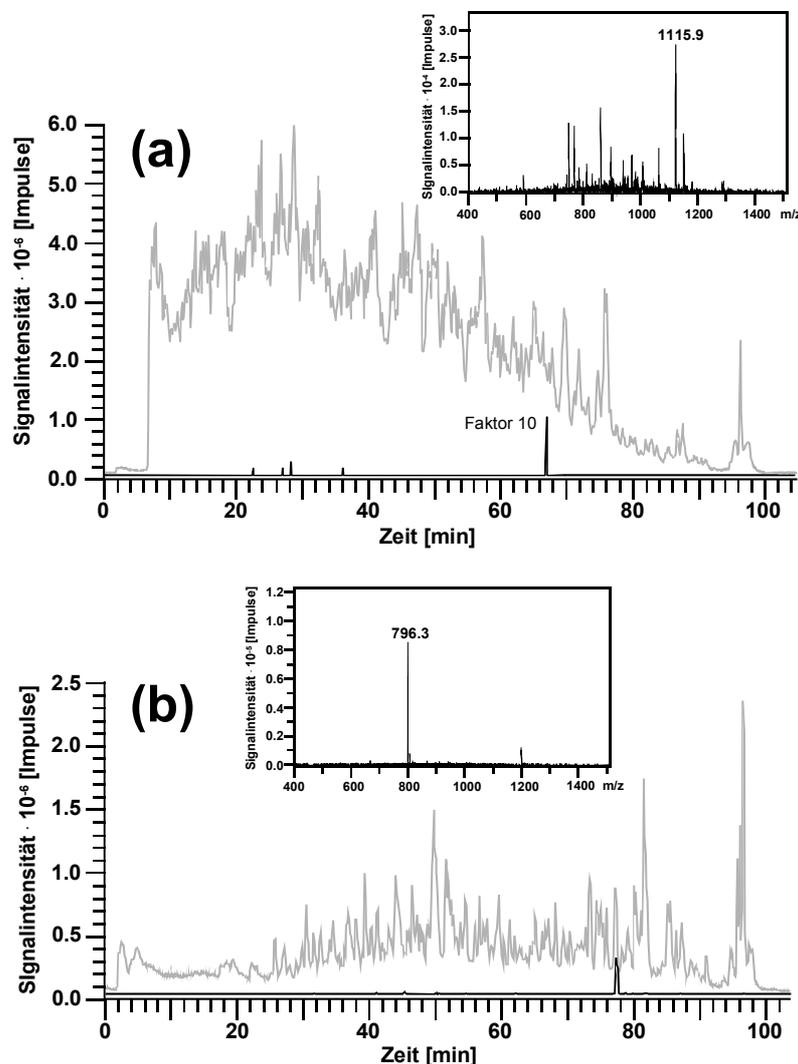


Abbildung 4. Rekonstruierte totale Ionenstrom Chromatogramme der SCX-Fraktion 1 (a) und 19 (b) inklusive der extrahierten Ionenspuren der Peptide *ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVR* und *ALAEQFVQGLPLNSTSATGAVRR* mit entsprechendem Massenspektrum.

Analysebedingungen, siehe Abbildung 2.

Für weitere 17 Peptidpaare, die sich nur um ein zusätzliches Arginin oder Lysin am C-Terminus unterschieden, konnte dieses Retentionsverhalten bei der SCX-HPLC bestätigt werden. Die mittlere Verschiebung der SCX-Retentionszeiten, hervorgerufen durch die zusätzliche basische Aminosäure, lag bei 8.4 min. Diese Peptidpaare unterschieden sich lediglich um eine zusätzliche positive Ladung in ihrer Aminosäuresequenz und einem daraus resultierenden höheren pI-Wert. Da die restlichen Aminosäuren für die jeweiligen Peptidpaare identisch waren, sollten diese ansonsten relativ ähnliche chemische Eigenschaften aufweisen. Ein Vergleich der berechneten pI-Werte und der SCX-Retentionszeiten der 18 Peptidpaare untereinander belegte jedoch, dass keine strikte Korrelation zwischen dem pI-Wert des Peptids und seiner Elution in der SCX-Chromatographie vorliegt. In Abbildung 5 sind die Fraktionierungszeitpunkte für alle 18 Peptidpaare in Abhängigkeit von den theoretisch berechneten pI-Werten aufgetragen. Die Werte der Peptidpaare sind in der Auftragung jeweils durch eine Gerade verbunden. Alle Geraden weisen eine positive Steigung auf, was bedeutet, dass innerhalb der Peptidpaare ein Zusammenhang zwischen pI-Wert und SCX-Retentionszeit vorliegt. Je höher der pI-Wert, desto später eluiert das Peptid. Beim Vergleich der Paare untereinander erkennt man jedoch deutlich, dass hier kein Zusammenhang zwischen den individuellen pI-Werten und SCX-Fraktionierungszeitpunkten vorhanden ist. Die unterschiedlichen Peptide sind unabhängig von ihrem pI-Wert, der in diesem Fall von 4 bis 11 reicht, über nahezu sämtliche SCX-Fractionen verteilt. So konnte z.B. ein Peptid mit einem theoretischen pI-Wert von 9.47 bei Minute 4 fraktioniert werden und ein anderes mit einem pI-Wert von 4.78 erst bei Minute 23. Aus diesem Grund scheint ein universeller Zusammenhang zwischen dem pI-Wert der Peptide und ihrem Retentionsverhalten bei der SCX-HPLC nicht zu bestehen. Dieser Zusammenhang konnte nur für die chemisch sehr ähnlichen Peptide (bis auf eine Aminosäure gleiche Aminosäuresequenz) nachgewiesen werden.

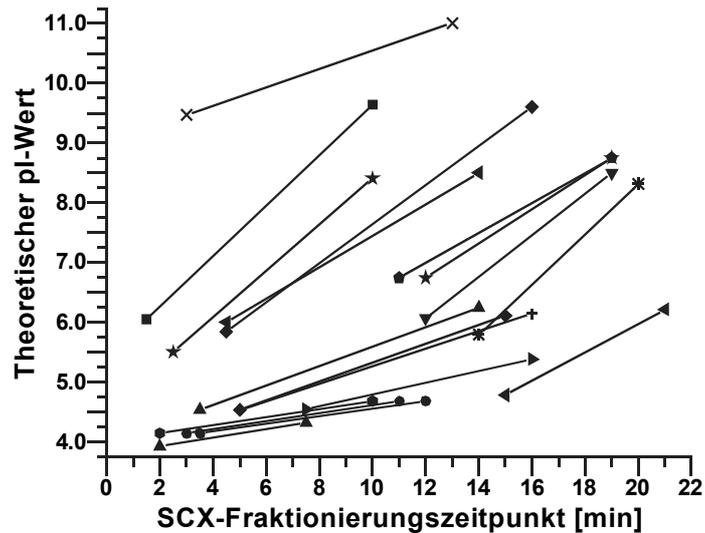


Abbildung 5. Einfluss des pI-Wertes auf die starke Kationenaustauschchromatographie von tryptischen Peptiden.

Wenn man versucht bei der SCX-HPLC Rückschlüsse auf die Retentionsreihenfolge der Peptide mit Hilfe ihres pI-Wertes zu ziehen, muss man bedenken, dass dieser Wert nicht nur von der Anzahl der basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin, Histidin und terminale Aminogruppe) im Peptid abhängig ist, sondern auch von der Anzahl der sauren Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure und terminale Carboxygruppe) und der jeweiligen Position dieser Aminosäuren in der Peptidsequenz. Bezieht man sich nur auf die basischen Aminosäuren, welche letztendlich mit der negativ geladenen Kationenaustauschoberfläche wechselwirken und somit für die Retention verantwortlich sind, so erkennt man, dass die pI-Werte für Peptide mit der gleichen Anzahl an basischen Aminosäuren über einen weiten Bereich verteilt sein können. Diese Verteilung ist exemplarisch für die 18 Peptidpaare (36 Peptide) in Abbildung 6 dargestellt. Die pI-Werte der 36 Peptide erstrecken sich unabhängig von der Zahl an positiv geladenen Aminosäuren in den Peptiden über einen Wertebereich von 4-11. Diese Auftragung verdeutlicht den zusätzlichen Einfluss der sauren Aminosäuren und der Position der einzelnen Aminosäuren im Peptid auf den pI-Wert.

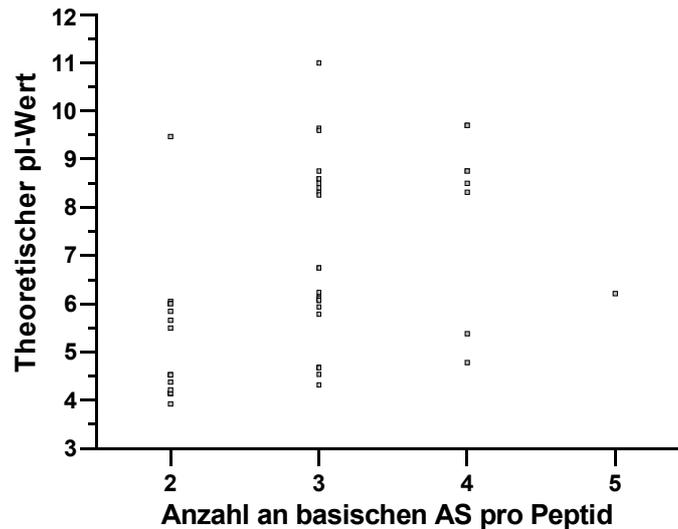


Abbildung 6. Abhängigkeit des pI-Wertes von der Anzahl an basischen Aminosäuren pro Peptid.

Da anhand der pI-Werte keine eindeutige Elutionsreihenfolge der Peptide für die SCX-HPLC bestimmt werden konnte, untersuchten wir, ob dies allein mit Hilfe der Anzahl an basischen Aminosäuren möglich ist. Die basischen Aminosäuren Arginin (pK_a 12.5), Lysin (pK_a 10.5), Histidin (pK_a 6.0) und die N-terminale Aminogruppe (pK_a 9-11) sollten alle unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen ($pH=3$) protoniert vorliegen. Wenn man davon ausgeht, dass die Retention an der SCX-Phase hauptsächlich beeinflusst wird durch die Anzahl der positiven Ladungen in der Aminosäuresequenz und nicht von den negativen Ladungen und den Aminosäurepositionen, so sollte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an basischen Aminosäuren pro Peptid und der Retentionszeit der Peptide in der Kationenaustauschchromatographie bestehen. Diese Abhängigkeit kann für die 36 ausgewählten Peptide eindeutig in der Auftragung in Abbildung 7 nachgewiesen werden. Die tryptischen Peptide mit zwei basischen Aminosäuren wurden in den ersten zehn Fraktionen der SCX-Trennung identifiziert, die mit drei basischen Aminosäuren in den Fraktionen 13-24 und die mit vier basischen Aminosäuren in den Fraktionen 23-29.

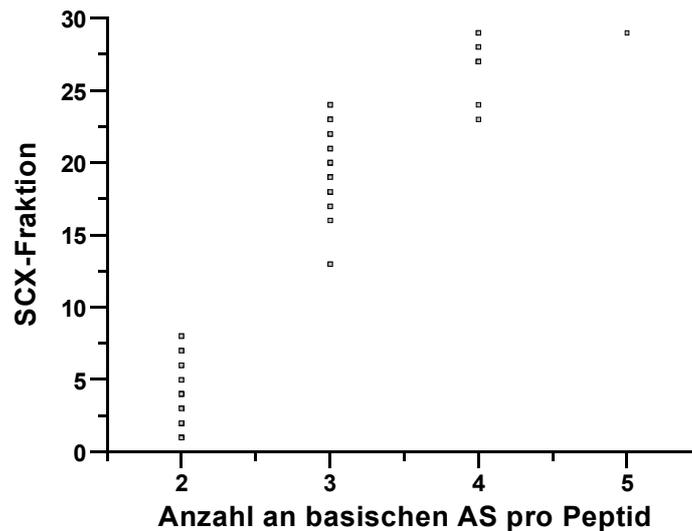


Abbildung 7. Abhängigkeit zwischen dem Retentionsverhalten von tryptischen Peptiden in der starken Kationenaustauschchromatographie und der Anzahl an basischen Aminosäuren für 36 ausgewählte Peptide.

Um sicher zu gehen, dass diese Abhängigkeit für alle identifizierten tryptischen Peptide des *Myxococcus xanthus* Verdaus gilt, wurde die Anzahl an basischen Aminosäuren für jedes pro Fraktion identifizierte Peptid ermittelt. Das Balkendiagramm in Abbildung 8 zeigt die prozentuale Verteilung der Peptididentifikationen der einzelnen Fraktionen (Σ 1992 Peptide) bezüglich der Anzahl an basischen Aminosäuren pro Peptid. Die meisten der tryptischen Peptide besitzen zwei (N-terminale Aminogruppe + Arginin/Lysin am C-Terminus) oder drei (N-terminale Aminogruppe + Arginin/Lysin am C-Terminus + eine unverdaute Spaltstelle oder ein Histidin) basische Aminosäuren in ihrer Sequenz, was an den entsprechend hohen Prozentzahlen ersichtlich ist (45.0% bzw. 47.9%). Mit Ausnahme der Peptide mit vier basischen Aminosäuren, welche insgesamt 6% der identifizierten Peptide ausmachen, liegen die restlichen Peptide mit einer, fünf oder sechs basischen Aminosäuren lediglich zu einem geringen prozentualen Anteil vor (0.4%, 0.7% bzw. 0.1%).

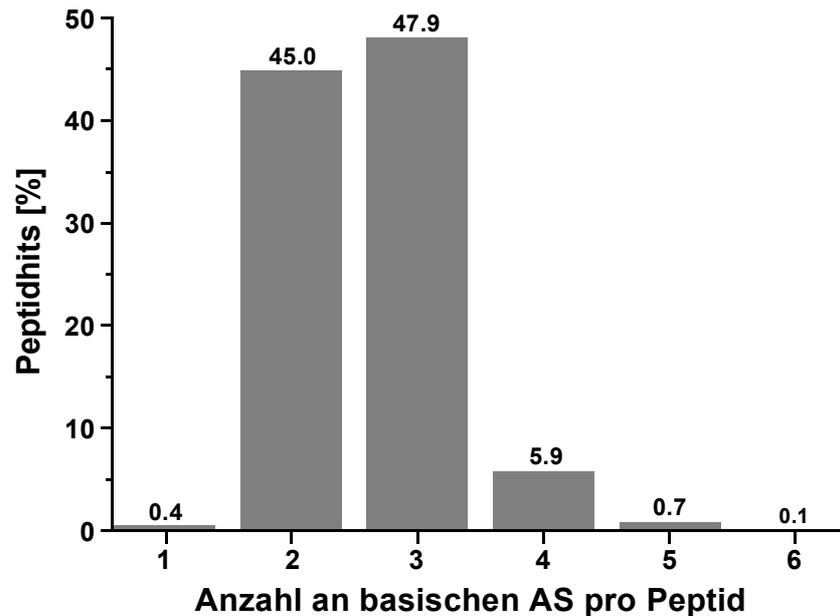


Abbildung 8. Prozentuale Verteilung der Anzahl an basischen Aminosäuren ermittelt für alle 1992 identifizierten Peptide.

Die Abhängigkeit zwischen der Retentionszeit der Peptide in der starken Kationenaustauschchromatographie und der Anzahl an basischen Aminosäuren in ihrer Sequenz ist in Abbildung 9 dargestellt. Man erkennt deutlich, dass es sich bei den meisten Peptiden, die in den ersten zehn Fraktionen identifiziert wurden, um vollständig tryptisch verdaute Peptide handelt, die außer der N-terminalen Aminogruppe und einem C-terminalen Lysin oder Arginin keine weiteren basischen Aminosäuren enthalten (Σ 894 Peptide). Nur wenige der Peptide, die in frühen SCX-Fraktionen eluierten, besitzen nur eine positive Ladung (Σ 8 Peptide). Man kann davon ausgehen, dass es sich bei diesen Peptiden um C-terminale Peptide der tryptisch verdauten *Myxococcus xanthus* Proteine handelt, welche keine basischen Aminosäuren an ihren Sequenzenden enthalten. In den SCX-Fraktionen 10-27 dominieren die 3-fach geladenen Peptide (Σ 958 Peptide). Diese besitzen im Vergleich zu den 2-fach geladenen Peptiden noch ein zusätzliches Histidin oder ein Arginin bzw. Lysin einer unverdauten Spaltstelle in ihrer Sequenz. Ab Fraktion 27 wurden anschließend überwiegend die 4-fach, 5-fach und 6-fach positiv geladenen Peptide identifiziert (4-fach: Σ 116 Peptide; 5-fach: Σ 15 Peptide; 6-fach: Σ 1 Peptid). Diese sequentielle Elution der Peptide nach steigender Anzahl an basischen Aminosäuren ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass die starke Kationenaustauschchromatographie unter Verwendung der ProPac SCX-10 Phase, Peptide

überwiegend nach der Anzahl ihrer positiven Ladungen trennt. Die Position der Aminosäuren oder die zusätzliche Anwesenheit von sauren Aminosäuren im Peptid scheint die Retention in der Kationenaustauschchromatographie nicht stark zu beeinflussen, weshalb kein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen der Elutionsreihenfolge und dem pI-Wert der Peptide aufgestellt werden kann.

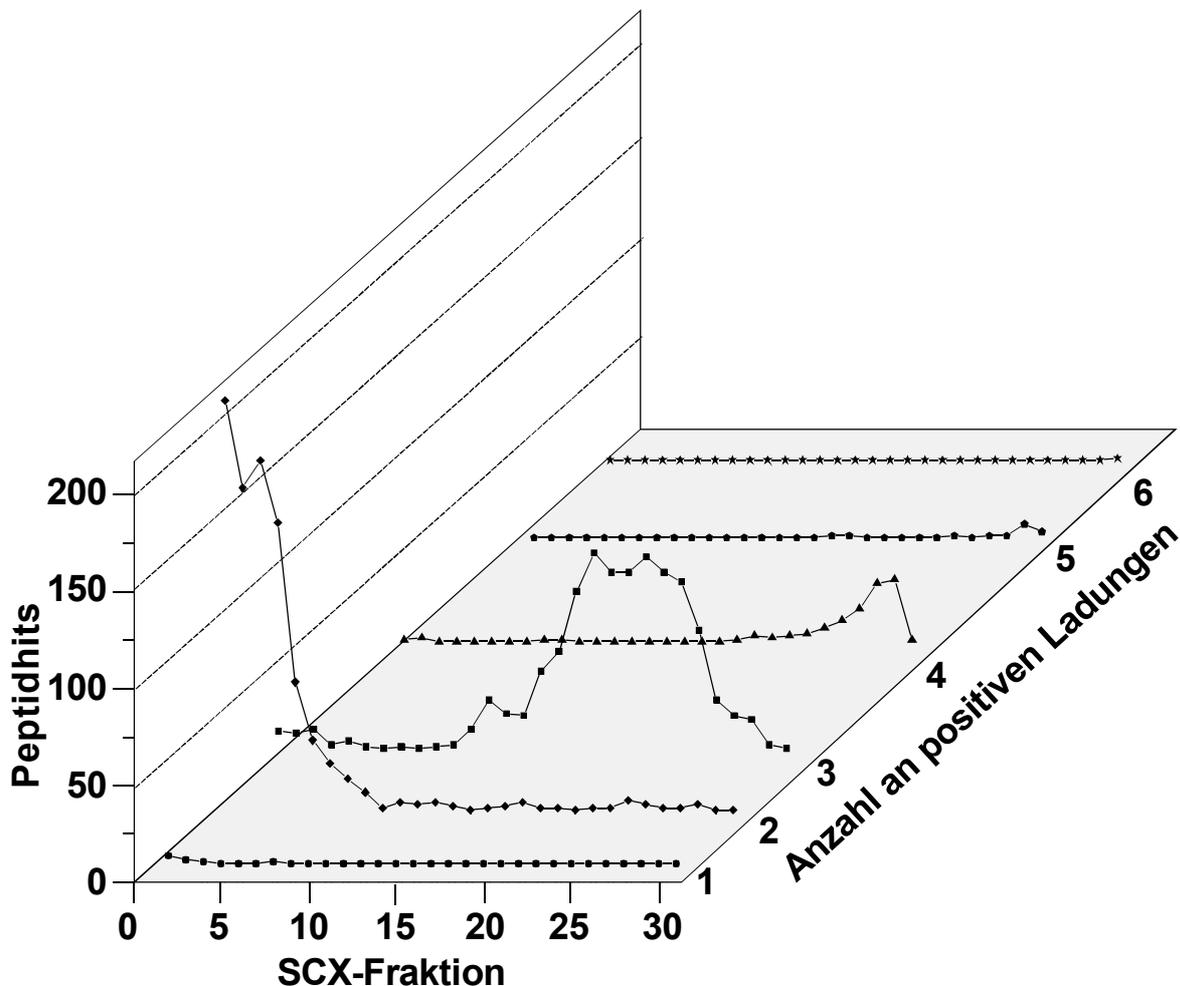


Abbildung 9. Abhängigkeit zwischen den Retentionszeiten von Peptiden in der starken Kationenaustauschchromatographie und der Anzahl an basischen Aminosäuren in den Peptiden.

Das Elutionsmuster in Abbildung 9 erklärt auch die bimodale Verteilung der Peptididentifikationen in den SCX-Fractionen. Man sieht, dass die Elution überwiegend von zwei Maxima geprägt ist, die der 2-fach geladenen Peptide von Fraktion 1-10 und die der 3-fach geladenen Peptide von Fraktion 10-27. Fraktion 10 stellt also den Elutionsübergang zwischen diesen beiden Peptidgruppen dar,

wodurch auch das Minimum an Peptididentifikationen in dieser Fraktion erklärt werden kann.

3.4 Verschleppung von Peptiden über mehrere SCX-Fraktionen

Wie bereits in Kapitel IV (3.1) für die zweidimensionale Analyse des 10er Proteinmix sollte auch für die *Myxococcus xanthus* Studie die Peptidverschleppung über die SCX-Fraktionen untersucht werden. Die Verschleppung sollte hierbei, aufgrund der Erhöhung des Acetonitrilgehalts in den SCX-Eluenten von 5 auf 20 Vol% und der daraus resultierenden stärkeren Unterdrückung der sekundären solvophoben Wechselwirkungen, minimiert worden sein. In Tabelle 1 sind alle identifizierten Peptide pro Fraktion zusammen mit dem Anteil an Peptiden, die zusätzlich noch in darauf folgenden SCX-Fraktionen detektiert wurden, aufgelistet. Im Mittel wurden 32 bzw. 28% der nachgewiesenen Peptide noch in der nächsten bzw. übernächsten SCX-Fraktion identifiziert. Man erkennt deutlich, dass auch durch den Zusatz von 20% Acetonitril in den SCX-Eluenten, die Verschleppung von Peptiden nicht vollständig vermieden werden kann. Der Effekt ist am stärksten bei den ersten 18 Fraktionen ausgeprägt. Hier wurden manche Peptide sogar über sechs bis hin zu zehn Fraktionen verschleppt. Dieser Umstand kann zum einen dadurch erklärt werden, dass in diesem Bereich ein sehr flacher Salzgradient zur Elution der Peptide verwendet wurde und zum anderen durch die kurzen Fraktionsintervalle (0.5 min), die für die ersten 18 Fraktionen gewählt wurden. Der Anteil an Peptidverschleppungen ist geringer für die letzten 12 Fraktionen, bei denen die Fraktionierungsdauer von 0.5 auf 1.0 min erhöht wurde und ein steilerer Salzgradient verwendet wurde. Da die Fraktionierung in der 1. Dimension nach der Zeit und nicht nach den Peaks erfolgte, war die Verschleppung von Peptiden über benachbarte Fraktionen, unabhängig von den Elutionsbedingungen, jedoch unvermeidbar.

In Abbildung 10 sind diese Ergebnisse nochmals zusammenfassend für alle SCX-Fraktionen graphisch dargestellt. Der unterste graue Balken repräsentiert für jede Fraktion die verschleppten Peptide. Dieser Balken entspricht in jeder Fraktionsspalte 100%. Die genaue Anzahl der verschleppten Peptide ist über jeder Fraktionsspalte angeführt. Die jeweils darüber liegenden Balken beziehen sich auf die Anzahl der verschleppten Peptide in den darauf folgenden Fraktionen. Die Längen der Balken

entsprechen hierbei dem prozentualen Anteil der verschleppten Peptide in der entsprechenden Fraktion bezogen auf die Gesamtanzahl an verschleppten Peptiden der Ausgangsfraktion.

Tabelle 1. Verteilung der über mehr als eine SCX-Fraktion verschleppten Peptide.

Frakt. Nr.	Anzahl an identifizierten Peptiden										Frakt. Nr.+1 [%]	Frakt. Nr.+2 [%]
	Frakt. Nr.+0	Frakt. Nr.+1	Frakt. Nr.+2	Frakt. Nr.+3	Frakt. Nr.+4	Frakt. Nr.+5	Frakt. Nr.+6	Frakt. Nr.+7	Frakt. Nr.+10			
1	225	170	130	112	29	9	2	1	1	75.6	57.8	
2	50	24	23	10	6					48.0	46.0	
3	57	17	16	8	1					29.8	28.1	
4	92	22	20	10	5	2				23.9	21.7	
5	27	10	9	3	2	1				37.0	33.3	
6	15	6	6	2						40.0	40.0	
7	10	3	3	1						30.0	30.0	
8	8	3	3	1						37.5	37.5	
9	4									0.0	0.0	
10	1									0.0	0.0	
11	6	3	3	1						50.0	50.0	
12	10	7	7	6	4	5	2	1		70.0	70.0	
13	20	8	5	4	6	5	2			40.0	25.0	
14	10	8	3	5	6	5	1			80.0	30.0	
15	5	4	3	4	2	2				80.0	60.0	
16	21	14	12	7	6					66.7	57.1	
17	22	12	12	6						54.5	54.5	
18	58	26	26	6						44.8	44.8	
19	62	24	24	3						38.7	38.7	
20	63	21	21	2	1					33.3	33.3	
21	70	16	16							22.9	22.9	
22	83	7	7							8.4	8.4	
23	86	5	5							5.8	5.8	
24	90	10	10							11.1	11.1	
25	62	4	4	1						6.5	6.5	
26	34	4	4							11.8	11.8	
27	32	4	4							12.5	12.5	
28	45	2	2							4.4	4.4	
29	39									0.0	0.0	
30	5									0.0	0.0	
									Mittelwert	32.1	28.0	

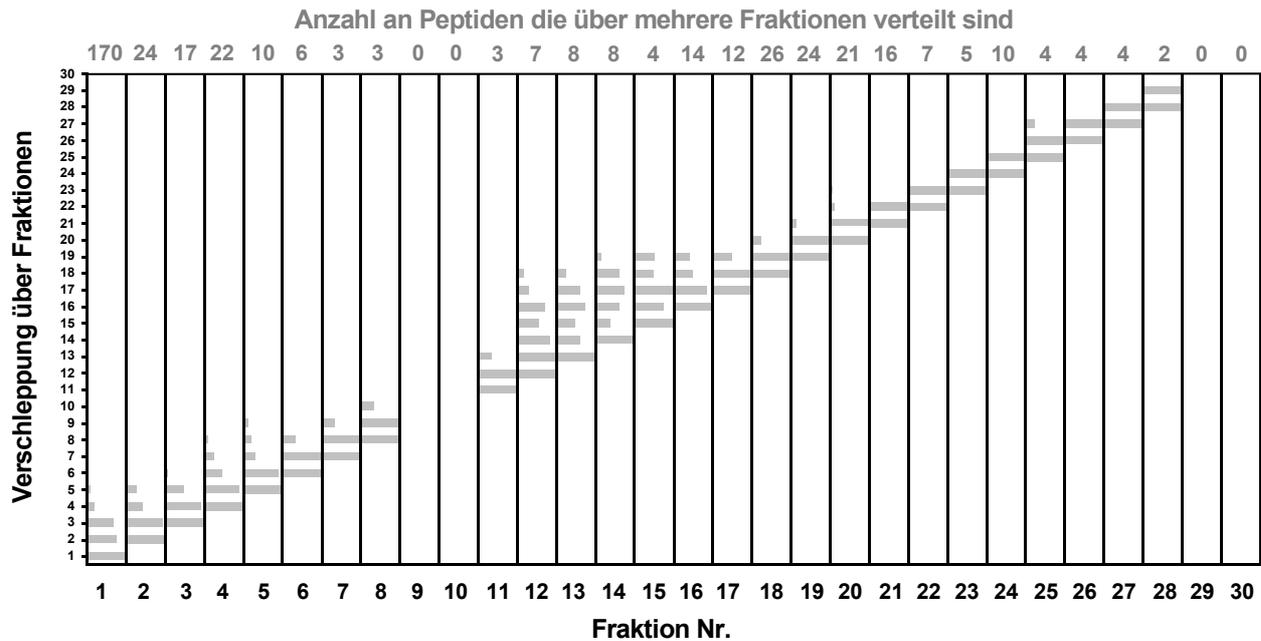


Abbildung 10. Graphische Darstellung der Verschleppung der tryptischen *Myxococcus xanthus* Peptide über die SCX-Fraktionen (siehe Tabelle 1).

Bei der Untersuchung der Verschleppung von Peptiden während der SCX-Fraktionierung war auch noch besonders interessant, wie viele dieser Peptide in nicht direkt benachbarten Fraktionen identifiziert werden konnten. Von den 1312 unterschiedlichen Peptiden, die signifikant für den *Myxococcus xanthus* Verdau identifiziert werden konnten, wurden 4.2% der Peptide in SCX-Fraktionen nachgewiesen, die durch eine Fraktion voneinander getrennt waren. 0.7 bzw. 0.1% der Peptide wurden in Fraktionen identifiziert, zwischen denen zwei bzw. vier Fraktionen lagen, in denen jeweils keine signifikanten Treffer für die entsprechenden Peptide erhalten wurden (siehe Abbildung 11). Diese Verteilung der Peptide über isolierte Fraktionen, die schon von Maynard et al. beschrieben^[20] und auf lokale basische Regionen in den Peptiden, sekundäre solvophobe Wechselwirkungen sowie Peptidaggregation zurückgeführt wurde, fällt insgesamt sehr gering aus. Der Hauptteil dieser Peptide wurde über Fraktionen, die durch eine dazwischen liegende Fraktion voneinander getrennt waren, verschleppt (4.2%). Alleine 68% dieser Identifikationen betrafen die ersten vier SCX-Fraktionen. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass dieser Effekt zusätzlich durch kompetitive Ionensuppression während der Ionenerzeugung in der Elektrosprayquelle hervorgerufen wurde, da gerade die ersten Fraktionen eine hohe Anzahl an Peptiden enthielten.

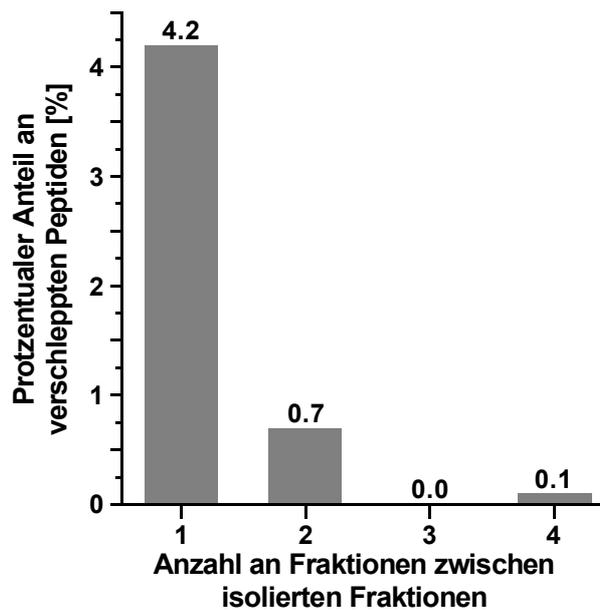


Abbildung 11. Prozentualer Anteil an Peptiden, die in nicht direkt benachbarten SCX-Fraktionen identifiziert wurden.

Da Proteomanalysen hauptsächlich auf die Identifizierung von Proteinen abzielen, spielt die Verschleppung der Peptide über mehrere SCX-Fraktionen keine kritische Rolle. Auf der anderen Seite kann es jedoch dazu kommen, dass hoch-abundante Peptide, die über mehrere Fraktionen eluieren, die Identifizierung von niedrig-abundanten Peptiden erschweren, wodurch der analysierbare dynamische Konzentrationsbereich abnimmt. Des Weiteren gestaltet sich die Quantifizierung, speziell die absolute Quantifizierung, von Proteinen als schwierig^[21].

Abbildung 12 zeigt ein konkretes Beispiel für ein Peptid, das in zwei Fraktionen, welche jeweils vier Fraktionen auseinander lagen, identifiziert wurde. Das tryptische Peptid *TTVTDQGASHAVTGTNLTPGQACIQK* (MXAN 4900; Lipoprotein, putativ) konnte in Fraktion 1 bis 5 und zusätzlich noch in Fraktion 10 identifiziert werden. In Abbildung 12 ist das rekonstruierte totale Ionenstrom Chromatogramm zusammen mit der extrahierten Ionenspur des entsprechenden Peptids für Fraktion 1 und 10 dargestellt. Eine falsch positive Zuordnung dieses Peptids über die Datenbanksuche kann aufgrund der relativ hohen MOWSE Scores, der Identifikationsreproduzierbarkeit pro Fraktion und der nahezu identischen Retentionszeiten, praktisch ausgeschlossen werden. Des Weiteren wird die Identität dieses Peptids durch die Ähnlichkeit der Fragmentspektren bekräftigt (siehe Abbildung 12).

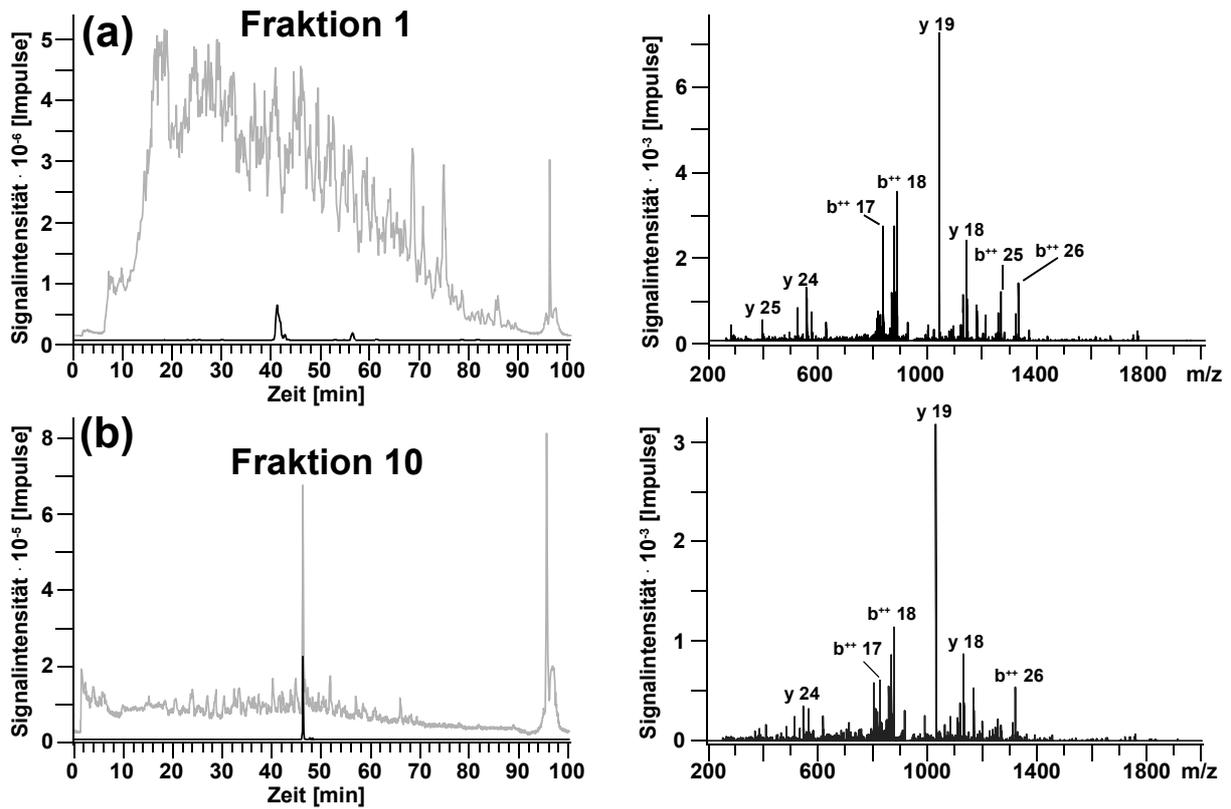


Abbildung 12. Rekonstruierte totale Ionenstrom Chromatogramme von SCX-Fraktion 1 und 10 inklusive der extrahierten Ionenchromatogramme von dem Peptid *TTVTDQGASHAVTGTNLTPEGQACIQK* und den dazugehörigen MS/MS-Spektren als Beispiel für die Verschleppung von Peptiden über nicht direkt benachbarte SCX-Fractionen.

Analysebedingungen, siehe Abbildung 2.

3.5 Orthogonalität und theoretische Peakkapazität des 2D-HPLC Systems

Um die Orthogonalität der beiden gekoppelten Trenntechniken basierend auf starker Kationenaustausch- (ProPac SCX-10) und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie (PS-DVB Monolithen), die schon zum Teil durch die Übereinanderlegung von einigen rekonstruierten totalen Ionenstrom Chromatogrammen in Abbildung 2 belegt werden konnte, graphisch zu visualisieren, wurden die Retentionszeiten aller identifizierten Peptide von beiden Chromatographiemodi gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 13). Bei der Auftragung wurde nur jeweils eine der insgesamt vier Wiederholungsmessungen (jeweils die erste) pro SCX-Fraktion berücksichtigt. Die Verwendung von allen vier Wiederholungsmessungen hätte schon bei leichten Variationen in den Retentionszeiten der einzelnen Messungen zu einer Verfälschung der Auftragung geführt. Da in der 1. Dimension Fraktionen gesammelt wurden, konnten für die Retentionszeiten in der starken Kationenaustauschchromatographie nur die Fraktionierungszeitpunkte angegeben werden. Für die 2. Dimension hingegen konnten die genauen Retentionszeiten ermittelt und für die Auftragung verwendet werden.

Die Peptidhits in Abbildung 13 sind praktisch über den gesamten Trennbereich verteilt, was den hohen Grad an Orthogonalität des entwickelten 2D-HPLC-Systems beweist. Diese Untersuchung bestätigt die Ergebnisse, die bereits bezüglich der Orthogonalität von SCX- und IP-RP-Chromatographie unter Verwendung von kieselgel-basierten starken Kationenaustausch- und Umkehrphasen-Materialien erhalten wurden^[19]. Ein hoher Grad an Orthogonalität der gekoppelten Trennmechanismen ist notwendig, um eine maximale Peakkapazität der mehrdimensionalen Chromatographiesysteme zu gewährleisten. Der geringe Anteil an Peptidhits zwischen Minute 5 - 7 kann auf die bereits diskutierte Abhängigkeit der SCX-Elution von der Peptidladung zurückgeführt werden. Wie in Abbildung 3 ersichtlich konnten in den entsprechenden SCX-Fraktionen, die den Übergang der Elution von 2-fach zu 3-fach positiv geladenen Peptiden bildeten, nur wenige Peptide identifiziert werden.

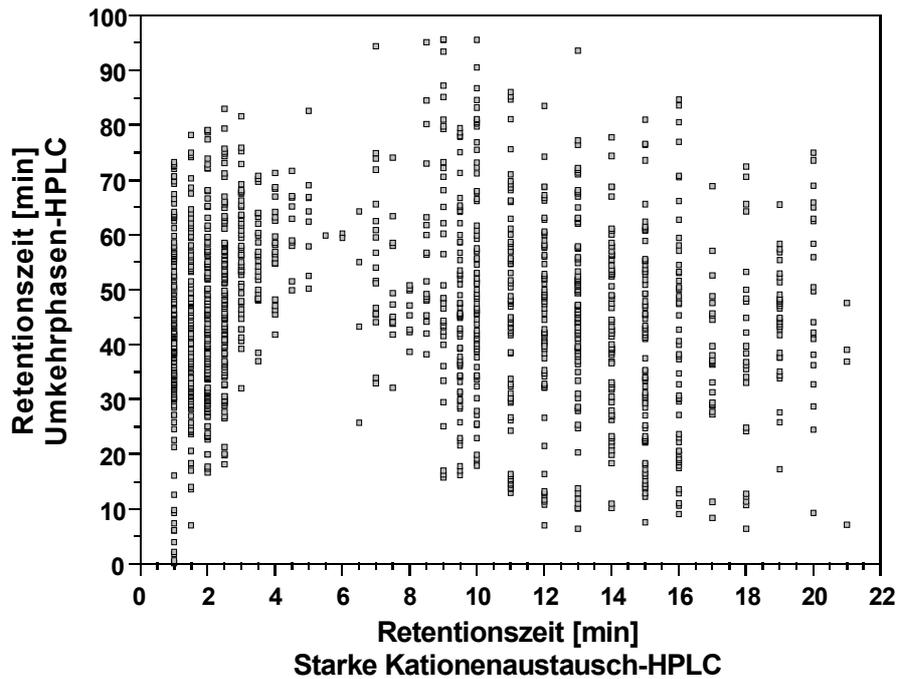


Abbildung 13. Orthogonalität der gekoppelten chromatographischen Trennmechanismen (SCX-HPLC x IP-RP-HPLC), ermittelt anhand der Retentionszeiten der identifizierten Peptide von *Myxococcus xanthus*.

Neben der Orthogonalität von mehrdimensionalen Chromatographiesystemen stellt die theoretische Peakkapazität, die mit dem entsprechenden System erreicht werden kann, ein weiteres wichtiges Charaktermerkmal dar. Aus diesem Grund verwendeten wir die erhaltenen Daten der *Myxococcus xanthus* Studie auch um die Peakkapazität des entwickelten off-line 2D-HPLC-Systems abzuschätzen. Die theoretische Peakkapazität^[22;23], welche definiert ist als die maximale Anzahl an Komponenten, die theoretisch mit einer HPLC-Methode getrennt werden kann (Auflösung = 1), ergibt sich für ein mehrdimensionales orthogonales System aus dem Produkt der Peakkapazitäten der individuellen Dimensionen^[24;25]. Die Berechnung der Peakkapazität (P) kann über die Peakbreite (w_b) gemessen bei 4σ (bei 13.4% Peakhöhe) und die Gradientendauer (t_G) nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$P = 1 + \frac{t_G}{w_b}$$

Da die SCX-Analyse im verwendeten off-line 2D-HPLC-System fraktioniert und anschließend in der 2. Dimension weiter aufgetrennt wurde, war die Peakkapazität

der 1. Dimension auf die Anzahl der gesammelten Fraktionen limitiert (insgesamt 30 Fraktionen). Die Peakkapazität der 2. Dimension konnte über die oben angeführte Gleichung berechnet werden. Die Peakbreite wurde hierbei repräsentativ für die komplette Proteomanalyse aus den Peaks von allen Peptiden, die in den Fraktionen 2, 14 und 21 (jeweils nur für eine Wiederholungsmessung) identifiziert werden konnten, gemittelt. Hierfür wurden die Ionenspuren der Peptide aus den ESI-MS/MS Aufnahmen extrahiert und die erhaltenen Peaks nach ihrer Breite ausgewertet. Die gemittelte Peakbreite betrug für die 90-minütige IP-RP-Trennung der tryptischen Peptide des *Myxococcus xanthus* Verdaus 0.68 min. Dieser Wert liegt im Vergleich zu der normalerweise erreichbaren Trenneffizienz der monolithischen PS-DVB-Säulen für Biomoleküle^[26] (siehe Kapitel III, 3.1.3) relativ hoch. Die Ursache für die relativ große gemittelte Peakbreite liegt darin, dass die extrahierten Ionenspuren der Peptide aus den MS/MS-Aufnahmen, in Form der Fullscans, gefiltert werden mussten. Dadurch waren die erhaltenen Peaks meist sehr breit, da zwischen den Fullscans jeweils drei Fragmentscans lagen (Zyklusdauer: 0.15 min). Mit der ermittelten Peakbreite erhält man für die IP-RP-Trennung mit 90-minütigem Acetonitrilgradienten ($t_G=90$ min) eine Peakkapazität von 133 in der 2. Dimension. Aufgrund der aufnahmebedingten starken Peakverbreiterung kann man davon ausgehen, dass die Peakkapazität für die IP-RP-Analyse mit monolithischen PS-DVB-Säulen in Wirklichkeit um den Faktor zwei bis drei größer ist. Aus den theoretischen Peakkapazitäten der individuellen Dimensionen ergibt sich eine Gesamtpeakkapazität des 2D-HPLC-Systems von 4001 (siehe Tabelle 2). Dieser Wert ist vergleichbar mit den Peakkapazitäten, die bereits in der Literatur für zweidimensionale Chromatographiesysteme, bestehend aus starker Kationenaustausch- und Umkehrphasen-Chromatographie, beschrieben wurden^[19].

Tabelle 2. Peakkapazitäten der individuellen und gekoppelten Trenndimensionen.

	t_G [min]	Mittlere Peakbreite [min]	Peakkapazität
1. Dimension SCX-HPLC ProPac SCX-10	21		30
2. Dimension IP-RP-HPLC PS-DVB Monolith	90	0.68	133
2D-HPLC			4001

Definiert man die Massenspektrometrie als eine weitere Trenndimension (Trennung nach m/z -Verhältnissen), so erhöht sich die Kapazität des 2D-HPLC-ESI-MS Systems noch zusätzlich um ungefähr den Faktor 350 (verwendeter m/z -Scanbereich 450-1500 m/z , mittlere Peakbreite inklusive Isotopenverteilung ≈ 3.0 m/z).

3.6 Identifizierte Proteine von *Myxococcus xanthus* DK1622

Über die zahlreichen Peptididentifikationen für die zweidimensionale Proteomanalyse des *Myxococcus xanthus* Verdaus konnten mit Hilfe der Mascot Software auch die zugehörigen Proteine identifiziert werden. Das Histogramm der signifikanten Proteinhits in Abbildung 14 zeigt die gleiche bimodale Identifikationsverteilung über die SCX-Fraktionen, wie sie bereits für die Peptide beobachtet werden konnte. Die Verteilung der Proteinidentifikationen wurde analog zu den Peptidenidentifikationen ausgewertet. In Abbildung 14a ist die Verteilung über die einzelnen SCX-Fraktionen bezüglich der Anzahl an Proteinhits, die pro Fraktion für insgesamt alle vier Wiederholungsmessungen erhalten wurden, dargestellt. Insgesamt wurden 4738 signifikante Proteinhits für die Proteomanalyse des *Myxococcus xanthus* Lysats erhalten. Die Reproduzierbarkeit der Proteinidentifikation in der 2. Dimension konnte über die Auswertung der Wiederholungsmessungen für jede SCX-Fraktion bestimmt werden (siehe Abbildung 14b). Die Reproduzierbarkeit der Proteinidentifikation ist farblich in den einzelnen Balken hervorgehoben. Im Mittel konnten 39% der Proteine in allen vier IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Wiederholungsmessungen pro SCX-Fraktion nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der 3-fach (13%), 2-fach (16%) und 1-fach (32%) identifizierten Proteine, ergab sich somit eine durchschnittliche Reproduzierbarkeit der Proteinidentifikation pro SCX-Fraktion von 2.6. Das Diagramm in Abbildung 14c repräsentiert die Proteinverteilung in den SCX-Fraktionen, in denen diese zum ersten Mal für die gesamte Messserie in der 2. Dimension identifiziert worden sind. Bei diesen 631 Proteinen handelt es sich um die Gesamtanzahl an unterschiedlichen Proteinen, die signifikant für die Analyse des *Myxococcus xanthus* Proteoms identifiziert werden konnten. Im Anhang sind alle 631 identifizierten Proteine aufgelistet.

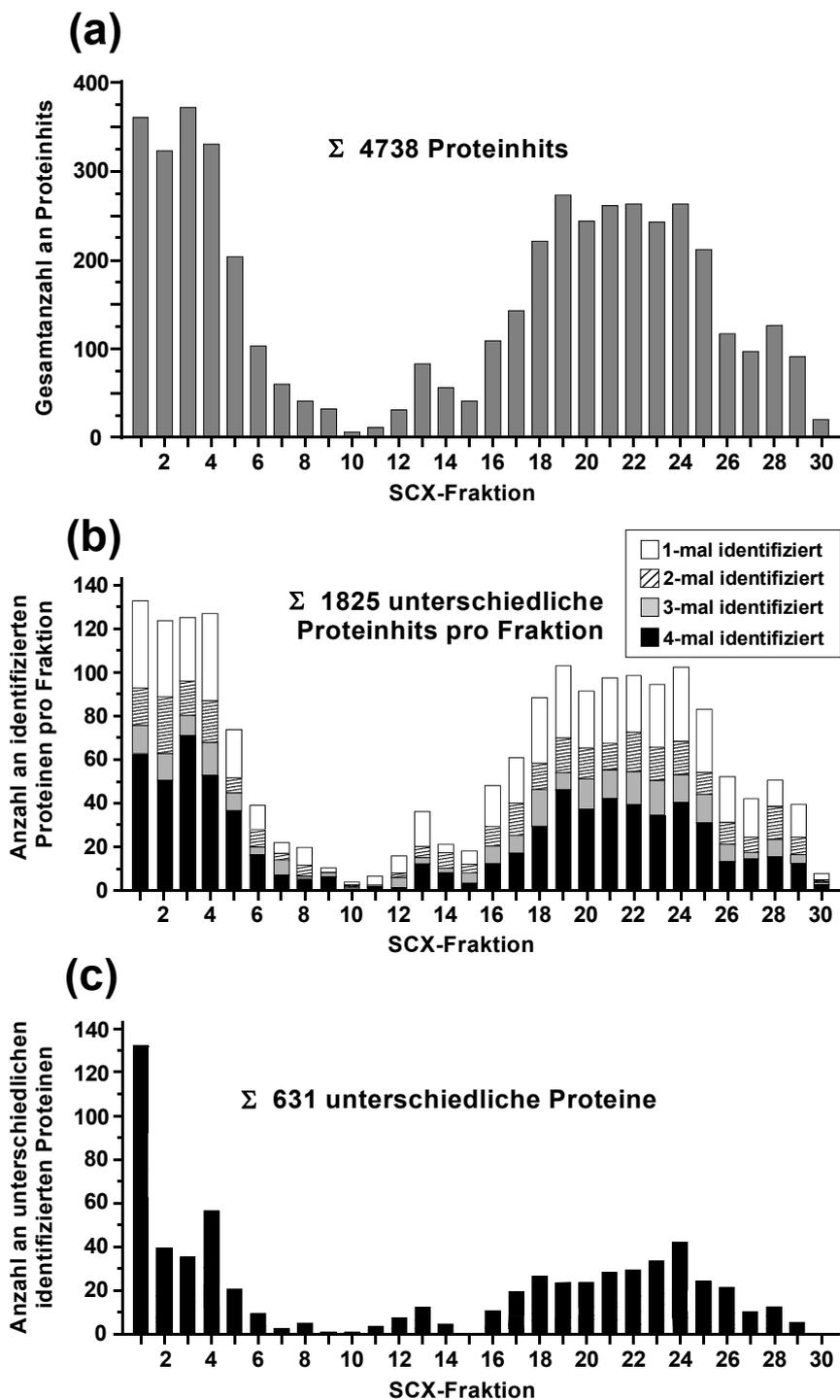


Abbildung 14. Proteinidentifizierung für alle 30 SCX-Fraktionen.

a) Verteilung der Gesamtanzahl an Proteinhits für alle vier IP-RP-Wiederholungsanalysen über die 30 SCX-Fraktionen; b) Verteilung der Proteinhits über die 30 SCX-Fraktionen unter Berücksichtigung von mehrfach Identifikationen pro Fraktion aufgrund der Wiederholungsmessungen, mit zusätzlicher Angabe der Identifikationsreproduzierbarkeit; c) Verteilung der unterschiedlichen Proteine, welche in keinem der vorherigen SCX-Fraktionen identifiziert werden konnten.

Bezogen auf sämtliche Open Reading Frames (ORFs), die in der *Myxococcus xanthus* Datenbank enthalten waren, entspricht die Anzahl der identifizierten Proteine ungefähr 10%. In allen 144 IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analysen (36 SCX-Fraktionen x 4 Wiederholungsmessungen) konnten insgesamt 31% der 631 Proteine nur mit einer Analyse, 13% mit zwei, 9% mit drei und 47% mit vier oder mehr Analysen (bis zu 85 Analysen) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15). Bei den Proteinen, die in vielen Fraktionen über ihre tryptischen Peptide identifiziert werden konnten, handelte es sich meist um große und hoch-abundante Proteine. Bei dem enzymatischen Verdau liefern diese viele unterschiedliche Peptide, die gleichzeitig in einer hohen Konzentration vorliegen. Zusätzliche Wiederholungsmessungen können dazu beitragen die Anzahl an identifizierten niedrig-abundanten Proteinen zu erhöhen, was dazu führt, dass auch eine größere Proteomabdeckung insgesamt erreicht werden kann. Nur jeweils einmal durchgeführte Analysen bergen die Gefahr, dass viele Proteine nicht identifiziert werden, obwohl deren Konzentrationen über der Nachweisgrenze des verwendeten Massenspektrometers liegen.

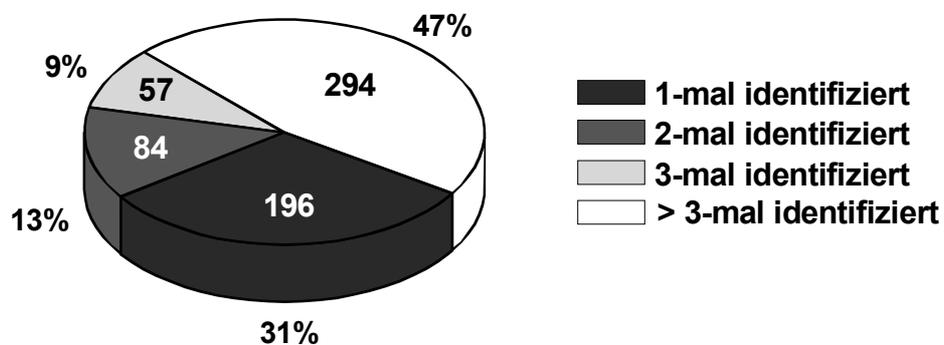


Abbildung 15. Gesamtproduzierbarkeit der Proteinidentifikation.

3.7 Nachweis von Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)

Nichtribosomale Peptide und Polyketide repräsentieren eine interessante Klasse von Naturstoffen, welche eine außergewöhnlich hohe Strukturvielfalt und ein breites Spektrum an pharmakologischen Aktivitäten aufweisen. Sie werden mit Hilfe von multimodularen Enzymkomplexen, den so genannten Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), im Organismus synthetisiert^[27]. Nach der Entschlüsselung des kompletten *Myxococcus xanthus* DK1622 Genoms konnten bis zu 18 Gencluster, die mit der Expression der PKS und NRPS in Verbindung gebracht werden, annotiert werden. Die Analyse der PKS und NRPS, sowohl auf dem Genom- als auch auf dem Proteom-Level, ermöglicht die Abschätzung und Ausnutzung der theoretischen genetischen Kapazität von Mikroorganismen, wie *Myxococcus xanthus* DK1622, für die Gewinnung von neuen, biologisch aktiven Sekundärmetaboliten. Die Identifizierung von PKS und NRPS Proteinen liefert hierbei auch die Bestätigung, ob die zugehörigen annotierten Gencluster wirklich exprimiert werden.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde das Proteinprofil des *Myxococcus xanthus* DK1622 Organismus in der späten exponentiellen Wachstumsphase analysiert, wodurch ein detaillierter Einblick in den metabolischen Zustand des Bakteriums möglich war. Dieser Bakterienstamm war bis vor kurzem noch nicht als Produzent von biologisch aktiven Naturstoffen bekannt. Dies änderte sich erst als bei einer genauen Untersuchung des Sekundärmetabolitenprofils unter verschiedenen Bedingungen Myxalamide, Myxovirescine, Myxochromide, DK-Xanthene (bisher unveröffentlichte Ergebnisse von P. Meiser und H. B. Bode) und Myxocheline (bisher unveröffentlichte Ergebnisse von M. O. Altmeyer, P. Meiser und R. Müller) für diesen Organismus identifiziert werden konnten^[5]. Obwohl diese Ergebnisse bereits belegen, dass es sich bei dem Bakterium *Myxococcus xanthus* um einen Produzenten von Sekundärmetaboliten handelt, erklären sie noch nicht das Vorhandensein der 18 unterschiedlichen biosynthetischen Gencluster im Genom des Mikroorganismus^[5].

Mit Hilfe der zweidimensionalen Proteomanalyse wurden elf PKS bzw. NRPS Proteine identifiziert, die verschiedenen annotierten Genclustern zugeordnet werden

konnten. In Tabelle 3 sind diese Proteine zusammen mit ihrer molekularen Masse und dem zugehörigen Gencluster aufgelistet.

Tabelle 3. Identifizierte Proteine von biosynthetischen Genclustern in *Myxococcus xanthus* DK 1622.

Protein	MXAN Nummer	Molekularmasse [Da]	Zugehöriger Gencluster
PKS	4527	550.283	Myxalamid
NRPS	4403	526.063	Unbekannt 1
PKS/NRPS	4299	318.239	Dkxanthen
PKS	4292	198.448	Dkxanthen
NRPS	4079	486.832	Myxochromid
NRPS	4000	495228	Unbekannt 2
PKS	3932	330.338	Myxovisescin
PKS/NRPS	3779	1.551.772	Unbekannt 3
NRPS + Thioesterase	3636	1.301.994	Unbekannt 4
NRPS	2796	170.024	Unbekannt 5
NRPS	1607	599.646	Unbekannt 6

Fünf der identifizierten PKS/NRPS Proteine stammen von biosynthetischen Genclustern, die den bereits oben erwähnten Sekundärmetaboliten Myxalamid, Myxovirescin, Myxochromid und DK-Xanthen zugeordnet werden können. Nach unserem Wissen ist dies der erste eindeutige Beweis für die Expression dieser Gene in dem naturstoffproduzierenden Bakterium *Myxococcus xanthus* DK1622. Neben diesen konnte die Expression von sechs zusätzlichen biosynthetischen Genclustern, deren Funktion in den *Myxococcus xanthus* Bakterien bis jetzt noch ungeklärt ist, durch die Identifizierung von sechs weiteren Proteinen belegt werden. In der Literatur werden solche biosynthetischen Gencluster mit hypothetischen Funktionen häufig als „still“ (silent) oder „verborgen“ (cryptic) bezeichnet. Ob diese Gencluster für die Produktion von Sekundärmetaboliten verantwortlich sind, konnte bis jetzt noch nicht

eindeutig geklärt werden. Durch die Identifizierung der entsprechenden Proteine konnte zumindest nachgewiesen werden, dass diese sechs Gencluster in *Myxococcus xanthus* exprimiert werden. Dies bildet eine wichtige Grundlage für die Suche nach zugehörigen biosynthetischen Produkten.

4. Zusammenfassung

Mit den erhaltenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich das entwickelte zweidimensionale HPLC-System basierend auf der off-line Kopplung von starker Kationenaustausch- und Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie, für Proteomanalysen von bakteriellen Proteinlysaten nach der Bottom-Up Methode eignet. Durch Verwendung eines sehr flachen Salzgradienten für die SCX-Trennung und dementsprechend angepasste Fraktionierungsintervalle konnten die tryptischen Peptide relativ homogen auf die einzelnen Fraktionen in der 1. Dimension verteilt werden. Es zeigte sich, dass die Trennung der Peptide mit der ProPac SCX-10 Säule hauptsächlich von der Anzahl der basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin und Histidin) pro Peptid abhängig war und nicht von den pI-Werten der Peptide. Dies konnte über ein entsprechendes Elutionsprofil bewiesen werden. Der Einsatz von 20% Acetonitril in den SCX-Eluenten konnte die Verschleppung von Peptiden über benachbarte und voneinander getrennte Fraktionen nicht vollständig unterbinden. Jedoch war aufgrund der Fraktionierungsart, welche sich nach der Zeit und nicht nach den Peaks orientierte, eine prinzipielle Verschleppung von Peptiden über benachbarte Fraktionen sowieso unvermeidbar. Die Durchführung von vier Wiederholungsanalysen pro SCX-Fraktion in der 2. Dimension lieferte einen Einblick in die Reproduzierbarkeit der Peptididentifizierung und steigerte zusätzlich die Anzahl an Peptiden und Proteinen, die insgesamt identifiziert werden konnten. Alles in allem konnten 1312 unterschiedliche Peptide und 631 unterschiedliche Proteine signifikant nachgewiesen werden. Obwohl sich die Peptid- und Proteinidentifizierung bei den HPLC-ESI-MS/MS Analysen durch eine relativ hohe Reproduzierbarkeit auszeichnete, konnte durch die erhaltenen Daten belegt werden, dass zusätzliche Wiederholungsmessungen die Anzahl an identifizierten Peptiden und Proteinen signifikant steigert. Über die Retentionszeiten der tryptischen Peptide in den einzelnen Dimensionen konnte ein hoher Grad an Orthogonalität der gekoppelten Trenntechniken bestätigt werden. Durch die Identifizierung von insgesamt elf Polyketidsynthasen bzw. nichtribosomalen Peptidsynthetasen konnte die Expression von zehn annotierten Genclustern, die in Verbindung mit der Produktion von Sekundärmetaboliten gebracht werden, bewiesen werden. Die durchgeführte Proteomanalyse bildet somit die Grundlage für weitere eingehendere Untersuchungen der Proteine, die bei der Produktion von biologisch aktiven

Sekundärmetaboliten involviert sind. Das entwickelte 2D-HPLC-System bietet für die Proteomanalyse nicht nur die Identifikation von relativ vielen exprimierten Proteinen, sondern auch die Möglichkeit Proteine, nahezu ohne Limit in der molekularen Größe zu analysieren. Dieser Punkt spielt gerade bei der Analyse der PKS und NRPS Proteine eine wichtige Rolle, da diese sehr große molekulare Massen von einigen hundert bis hin zu tausend Dalton besitzen. Die Analyse solcher Proteine gestaltet sich als sehr schwierig bis zu unmöglich mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese, Spot-Picking und anschließender MALDI-MS/MS Detektion. Aufbauend auf dieser Studie kann nun die qualitative und quantitative Genexpression in *Myxococcus xanthus* Wildtyp- und Mutant-Zellen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen untersucht werden. Ziel ist es, die genauen biologischen Abläufe, die für die Synthese der Sekundärmetaboliten verantwortlich sind, aufzuklären, um somit deren Produktion beeinflussen und optimieren zu können. Ähnliche Untersuchungen für den Mikroorganismus *Stigmatella aurantiaca* führten bereits zu der Entdeckung von neuen Naturstoffen^[4;28;29]. Diese Untersuchungen basierten jedoch nicht auf einer vorherigen Bestätigung der Expression der biosynthetischen Gencluster.

Die durchgeführte Analyse zeigt, dass mit Hilfe der entwickelten 2D-HPLC-MS/MS Methode sowohl detaillierte Einblicke in hoch-komplexe Proteinmischungen von Zellen in einem bestimmten Kultivierungsstadium als auch ein umfassender Überblick über die Genexpression gewonnen werden kann.

5. Literatur

1. K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.*, 106 (2003), 233-53.
2. D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 67 (2004), 1216-38.
3. H. Reichenbach, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 27 (2001), 149-56.
4. B. Silakowski, B. Kunze, R. Müller, *Gene*, 275 (2001), 233-40.
5. H. B. Bode, R. Müller, *J. Ind. Biotechnol.*, 33 (2006), 577-588.
6. H. B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 44 (2005), 6828-46.
7. R. Westermeier, *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*, Wiley-VCH, Weinheim 1997.
8. C. T. Walsh, *Science*, 303 (2004), 1805-10.
9. D. B. Wall, M. T. Kachman, S. Gong, R. Hinderer, S. Parus, D. E. Misek, S. M. Hanash, D. M. Lubman, *Anal. Chem.*, 72 (2000), 1099-1111.
10. N. L. Kelleher, *Anal. Chem.*, 76 (2004), 197A-203A.
11. S. L. Wu, I. Jardine, W. S. Hancock, B. L. Karger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (2004), 2201-7.
12. B. Bogdanov, R. D. Smith, *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (2005), 168-200.
13. A. Premstaller, H. Oberacher, C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 72 (2000), 4386-4393.
14. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72 (1976), 248-54.
15. D. J. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.*, 3 (1993), 327-32.
16. D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis*, 20 (1999), 3551-67.
17. W. C. e. al. Nierman, *PLOS Biology* (2006), submitted.

18. M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, J. C. Gebler, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005), 1694-703.
19. M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, J. C. Gebler, *Anal. Chem.*, 77 (2005), 6426-34.
20. D. M. Maynard, J. Masuda, X. Yang, J. A. Kowalak, S. P. Markey, *J. Chromatogr. B*, 810 (2004), 69-76.
21. B. M. Mayr, O. Kohlbacher, K. Reinert, M. Sturm, C. Gröpl, E. Lange, C. Klein, C. G. Huber, *J. Proteome Res.*, 5 (2006), 414-421.
22. U. D. Neue, *J. Chromatogr. A*, 1079 (2005), 153-61.
23. M. Gilar, A. E. Daly, M. Kele, U. D. Neue, J. C. Gebler, *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004), 183-92.
24. J. C. Giddings, *J. High Res. Chromatogr.*, 10 (1987), 319-323.
25. J. C. Giddings, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995), 3-15.
26. W. Walcher, H. Toll, A. Ingendoh, C. G. Huber, *J. Chromatogr. A*, 1053 (2004), 107-117.
27. D. Schwarzer, M. A. Marahiel, *Naturwissenschaften*, 88 (2001), 93-101.
28. S. C. Wenzel, B. Kunze, G. Höfle, B. Silakowski, M. Scharfe, H. Blocker, R. Müller, *Chembiochem.*, 6 (2005), 375-85.
29. B. Kunze, H. Reichenbach, R. Müller, G. Höfle, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 58 (2005), 244-51.

Anhang

Auflistung der 631 identifizierten Proteine von *Myxococcus xanthus* DK1622:

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 1-50)
1	aac, aculeacin A acylase 3782436:3784976 forward MW:91404
2	aap1, At4g33090/F4110_20 7943628:7946180 reverse MW:93821
3	accA, acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, alpha subunit 2232706:2233674 forward MW:35544
4	accC51, acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase 42206:43591 forward MW:51109
5	acdA_3, acyl-CoA dehydrogenase family protein 2616148:2617290 forward MW:41713
6	acnA, aconitate hydratase 1 5579732:5582461 reverse MW:98216
7	ahcY, adenosylhomocysteinase 8280222:8281652 reverse MW:52319
8	alaS, alanyl-tRNA synthetase 9124927:9127866 reverse MW:107182
9	ald, alanine dehydrogenase 2086577:2087650 reverse MW:37389
10	alkK, medium-chain fatty acid--CoA ligase 8461876:8463501 reverse MW:59171
11	aroC, chorismate synthase 3075924:3076943 forward MW:36257
12	arsC, arsC 6521131:6521538 reverse MW:14941
13	aspS, aspartyl-tRNA synthetase 1308757:1310577 forward MW:67344
14	atoC22, response regulatory protein 238047:238640 reverse MW:21932
15	atoC49, response regulatory protein 3039254:3040621 forward MW:49474
16	atpA, ATP synthase F1, alpha subunit 7714234:7715868 reverse MW:59127
17	atpC, ATP synthase F1, epsilon subunit 7843811:7844221 forward MW:14595
18	atpD, ATP synthase F1, beta subunit 7841743:7843188 forward MW:51766
19	atpG, ATP synthase F1, gamma subunit 7839781:7840665 forward MW:32501
20	atpH, ATP synthase F1, delta subunit 7717658:7718206 reverse MW:19948
21	bcp-1, bacterioferritin comigratory protein 8164499:8165323 forward MW:27813
22	cafA, cytoplasmic axial filament protein VC0419 [imported] 177611:180421 reverse MW:101489
23	carA, carbamoyl-phosphate synthase, small subunit 3086252:3087439 reverse MW:41907
24	cheA_2, chemotaxis protein CheA [imported] 7792945:7794939 forward MW:69776
25	clpP, ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit ClpP 4838998:4839618 reverse MW:22786
26	cysK_2, cysteine synthase A 5335757:5336677 forward MW:33343
27	dcp-1, peptidyl-dipeptidase Dcp 4526010:4528193 reverse MW:80912
28	def_3, polypeptide deformylase 7353677:7354183 forward MW:19197
29	deoC, deoxyribose-phosphate aldolase 98061:98882 forward MW:28351
30	dihydroliipoamid 2-oxo acid dehydrogenase, E2 component 2002998:2004128 forward MW:39276
31	dksA, DnaK suppressor protein 3432050:3432379 reverse MW:12553
32	dnaA, chromosomal replication initiator protein DnaA 7181117:7182352 reverse MW:46541
33	dnaK_2, chaperone protein DnaK 3440397:3442415 reverse MW:72581
34	EC2.5.1.18, glutathione transferase (EC 2.5.1.18) class alpha chain Ya2, hepatic 2931949:2932509 forward MW:20491
35	eno, enolase 1667831:1669129 forward MW:46144
36	entC, isochorismate synthase 3071064:3072329 reverse MW:45099
37	fabD, malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase 1213521:1214462 forward MW:32153
38	fabF-1, 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II 1215640:1216893 forward MW:43882
39	fabG_4, 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase 5516599:5517360 forward MW:26027
40	fad-3, PUTATIVE ENOYL-COA HYDRATASE PROTEIN 7579908:7580660 reverse MW:26932
41	fadE8, fadE8 7385156:7386931 forward MW:64344
42	frnE_2, frnE protein 8189813:8190469 reverse MW:25108
43	frr, ribosome recycling factor 535624:536181 forward MW:20913
44	ftsH, cell division protein FtsH 1815084:1817000 forward MW:70448
45	fusA_2, translation elongation factor G 4378783:4380741 forward MW:72399
46	galU, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 5503888:5504829 reverse MW:33947
47	gap, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I 3894717:3895727 reverse MW:36489
48	gcvT, glycine cleavage system T protein 3613909:3614991 reverse MW:38348
49	glmS, glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase, isomerizing 5552922:5554757 reverse MW:66459
50	glmU, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 5554865:5556121 reverse MW:43997

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 51-100)
51	glnS, glutaminyl-tRNA synthetase 4434222:4435910 reverse MW:64688
52	gltA, citrate synthase I 3079377:3080678 forward MW:48897
53	glyA, serine hydroxymethyltransferase 1217395:1218651 forward MW:44654
54	glyS, glycyl-tRNA synthetase, beta subunit 3547161:3549272 reverse MW:76788
55	GMXORF0009, hypothetical protein 14484:15671 reverse MW:42359
56	GMXORF0012, Putative methyltransferase superfamily 17345:17965 reverse MW:23311
57	GMXORF0020, pilin 26558:27220 forward MW:23388
58	GMXORF0027, type IV pilus biogenesis protein PilM, putative 33979:34944 forward MW:34385
59	GMXORF0029, type IV pilus biogenesis protein PilO, putative 35664:36281 forward MW:22883
60	GMXORF0030, hypothetical protein 36094:36888 forward MW:28629
61	GMXORF0047, TolB protein, putative 60996:62984 reverse MW:71170
62	GMXORF0061, conserved hypothetical protein 73421:75247 forward MW:64784
63	GMXORF0074, putative Mrr restriction endonuclease 89203:90222 reverse MW:37835
64	GMXORF0078, conserved hypothetical protein 92973:93266 reverse MW:10701
65	GMXORF0096, RNA binding protein DEF-3 111240:111605 forward MW:13283
66	GMXORF0100, chloroplast membrane-associated 30 kDa protein precursor (m30), putative 115068:115781 forward MW:2
67	GMXORF0102, lamin A, putative 117103:117798 forward MW:26245
68	GMXORF0103, lipoprotein, putative 117908:119563 forward MW:57225
69	GMXORF0117, hypothetical protein 137055:137882 forward MW:30765
70	GMXORF0118, lipoprotein, putative 137897:138505 forward MW:22598
71	GMXORF0141, batD protein, putative 161142:163073 forward MW:69318
72	GMXORF0213, hypothetical protein 243501:245312 forward MW:64910
73	GMXORF0217, conserved hypothetical protein 249413:250462 forward MW:37716
74	GMXORF0343, hypothetical protein 389195:394207 forward MW:183892
75	GMXORF0347, hypothetical protein 401823:403637 forward MW:63993
76	GMXORF0401, hypothetical protein 475360:475614 reverse MW:8788
77	GMXORF0414, glycosyl hydrolase, family 13, putative 493544:495889 forward MW:84377
78	GMXORF0448, phosphohistidine phosphatase SixA, putative 538155:538652 reverse MW:17714
79	GMXORF0455, hypothetical protein 548615:549142 forward MW:18087
80	GMXORF0464, conserved hypothetical protein 556456:559233 reverse MW:100311
81	GMXORF0467, TPR Domain domain protein 562110:564548 forward MW:87362
82	GMXORF0471, lipoprotein, putative 567727:568557 forward MW:27920
83	GMXORF0476, cold-shock domain family protein-related protein 571781:572050 forward MW:9652
84	GMXORF0489, lipoprotein, putative 585405:586475 forward MW:37860
85	GMXORF0521, conserved hypothetical protein 627008:629266 forward MW:81615
86	GMXORF0578, RNA polymerase sigma factor rpoD 685575:687701 reverse MW:80399
87	GMXORF0581, GatB/Yqey domain superfamily 689947:690360 reverse MW:14716
88	GMXORF0589, OmpA family protein 698013:699443 reverse MW:51414
89	GMXORF0596, hypothetical protein 703414:705552 forward MW:72260
90	GMXORF0618, outer membrane protein OmpA VC2213 [imported] 735759:736274 reverse MW:18219
91	GMXORF0620, lipoprotein, putative 737955:738695 reverse MW:24897
92	GMXORF0629, OmpA family domain protein 748788:749537 forward MW:26335
93	GMXORF0634, conserved hypothetical protein 751130:753799 reverse MW:96879
94	GMXORF0640, bli7148, putative 761322:762293 forward MW:35735
95	GMXORF0656, MrpC 782196:782942 reverse MW:27279
96	GMXORF0669, universal stress protein family, putative 796433:797377 reverse MW:34001
97	GMXORF0695, hypothetical protein 824505:824882 reverse MW:13482
98	GMXORF0705, ribosomal protein S6, putative 832820:833296 reverse MW:17697
99	GMXORF0707, ribosomal 5S rRNA E-loop binding protein Ctc/L25/TL5 834225:834887 reverse MW:23336
100	GMXORF0728, hypothetical protein 855064:856017 reverse MW:34100

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 101-150)
101	GMXORF0729, cell wall surface anchor family protein [imported], putative 856005:862049 forward MW:219401
102	GMXORF0739, serine/threonine kinase PKN9 870693:874364 reverse MW:136411
103	GMXORF0742, outer membrane protein A-like protein 878605:880446 reverse MW:65136
104	GMXORF0744, aldehyde dehydrogenase family protein 882739:884601 forward MW:67853
105	GMXORF0755, Junction associated molecule protein 1, isoform a, putative 898515:899558 reverse MW:38608
106	GMXORF0758, hypothetical protein 902297:903781 reverse MW:53064
107	GMXORF0760, PUTATIVE OUTER MEMBRANE RECEPTOR PROTEIN 905352:907760 forward MW:86474
108	GMXORF0762, isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, putative 908363:909421 forward MW:36759
109	GMXORF0819, lipoprotein, putative 973267:974352 forward MW:39120
110	GMXORF0824, Domain of unknown function, putative 979003:979830 forward MW:27975
111	GMXORF0838, PUTATIVE LIPOPROTEIN TRANSMEMBRANE, putative 995029:995586 forward MW:19764
112	GMXORF0881, hypothetical protein 1053276:1054469 reverse MW:42520
113	GMXORF0885, glutaredoxin 1057598:1057921 reverse MW:11936
114	GMXORF0886, chaperonin, 60 kDa 1058006:1059442 reverse MW:50198
115	GMXORF0909, hypothetical adventurous gliding motility protein U 1081837:1085622 forward MW:142517
116	GMXORF0910, TPR Domain domain protein 1085643:1087058 forward MW:50700
117	GMXORF0911, hypothetical protein 1087012:1087455 forward MW:15950
118	GMXORF0915, adventurous gliding motility protein K 1092095:1104493 forward MW:456391
119	GMXORF0918, CHP 1106909:1107787 forward MW:30087
120	GMXORF0965, secreted protein Hcp, putative 1166948:1167493 reverse MW:19894
121	GMXORF1027, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase family protein, putative 1233841:1234893 forward MW:36529
122	GMXORF1051, cationic outer membrane protein OmpH, putative 1264208:1264762 forward MW:20484
123	GMXORF1063, ABC transporter, HlyB/MsbA family CC3274 [imported] 1274161:1275945 forward MW:63236
124	GMXORF1081, sporulation protein SpoIID-related protein 1296447:1297550 forward MW:39508
125	GMXORF1138, hypothetical protein 1355775:1357376 reverse MW:56623
126	GMXORF1139, two-component hybrid sensor and regulator, putative 1357722:1360373 forward MW:97180
127	GMXORF1142, Protein of unknown function, DUF583 superfamily 1363199:1363540 forward MW:11595
128	GMXORF1143, Protein of unknown function, DUF583 superfamily 1363594:1363917 forward MW:11293
129	GMXORF1145, Protein of unknown function, DUF583 family 1363921:1364643 forward MW:24651
130	GMXORF1192, hypothetical protein 1448182:1449963 reverse MW:63168
131	GMXORF1217, branched-chain keto acid dehydrogenase E1, alpha subunit 1482983:1484191 reverse MW:44068
132	GMXORF1226, MC8 1498362:1500542 reverse MW:81408
133	GMXORF1236, adenylate cyclase, putative 1510210:1514358 forward MW:152273
134	GMXORF1242, hypothetical protein 1518433:1520688 reverse MW:82123
135	GMXORF1249, pyoverdine chromophore precursor synthetase 1527387:1533851 forward MW:233803
136	GMXORF1253, Beta-ketoacyl synthase, N-terminal domain protein 1547937:1553510 forward MW:198890
137	GMXORF1254, MxaC 1553652:1569071 forward MW:550283
138	GMXORF1314, conserved hypothetical protein 1653383:1653733 forward MW:12755
139	GMXORF1334, sensor histidine kinase/response regulator, putative 1674291:1677440 forward MW:116602
140	GMXORF1339, conserved hypothetical protein 1682004:1684217 reverse MW:83947
141	GMXORF1341, hypothetical protein 1684130:1687726 forward MW:127399
142	GMXORF1344, Response regulator receiver domain protein 1690840:1692612 reverse MW:64483
143	GMXORF1356, lipoprotein, putative 1705588:1706079 reverse MW:16940
144	GMXORF1361, hypothetical conserved protein, putative 1708312:1708746 forward MW:15131
145	GMXORF1378, non-ribosomal peptide synthetase, terminal component 1747520:1761826 reverse MW:526063
146	GMXORF1397, Acyl-CoA hydrolase 1791850:1792212 forward MW:12921
147	GMXORF1400, hypothetical protein 1793579:1793956 forward MW:13862
148	GMXORF1414, Methyltransferase 1804866:1805657 forward MW:29057
149	GMXORF1421, hypothetical protein 1812623:1812883 reverse MW:9558
150	GMXORF1442, probable nuclear antigen 1834386:1836602 reverse MW:81560

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 151-200)
151	GMXORF1456, Glutamate/Leucine/Phenylalanine/Valine dehydrogenase family 1854152:1855681 reverse MW:56970
152	GMXORF1473, hypothetical protein 1871613:1875059 reverse MW:127675
153	GMXORF1482, MtaD 1893372:1902125 forward MW:318239
154	GMXORF1488, hypothetical protein 1919759:1920229 forward MW:16258
155	GMXORF1489, StiF protein 1920251:1925836 forward MW:198448
156	GMXORF1495, conserved hypothetical protein 1931264:1931884 reverse MW:23634
157	GMXORF1506, hypothetical protein 1943766:1944983 forward MW:43797
158	GMXORF1515, 3-oxoadipate:succinyl-CoA transferase, subunit A, putative 1952669:1953466 reverse MW:28395
159	GMXORF1553, conserved hypothetical protein 1994810:1996135 forward MW:46895
160	GMXORF1571, TPR Domain domain protein 2015433:2015981 reverse MW:20256
161	GMXORF1579, ABC transporter, ATP-binding protein 2022489:2023694 reverse MW:42856
162	GMXORF1591, DNA mismatch repair protein MutS, putative 2033563:2035968 reverse MW:87446
163	GMXORF1593, serine/threonine-protein kinase pkn2 2036787:2038157 forward MW:48389
164	GMXORF1597, hypothetical protein 2040732:2041208 forward MW:17081
165	GMXORF1601, hypothetical protein 2046134:2047618 forward MW:53241
166	GMXORF1603, 63 kDa protein 2048423:2050570 forward MW:77139
167	GMXORF1607, membrane fusion efflux protein, putative 2053255:2054514 forward MW:44267
168	GMXORF1625, hypothetical protein 2072708:2073565 forward MW:32490
169	GMXORF1633, hypothetical protein 2081892:2082845 forward MW:34615
170	GMXORF1642, frzcd protein 2091230:2092483 forward MW:43584
171	GMXORF1646, hypothetical protein 2097695:2098015 reverse MW:11678
172	GMXORF1648, hypothetical protein 2099635:2101233 forward MW:56166
173	GMXORF1651, beta transducin-like protein HET-D2Y 2105434:2109633 forward MW:155689
174	GMXORF1702, non-ribosomal peptide synthetase, terminal component 2155038:2168435 reverse MW:486832
175	GMXORF1728, reticulocyte binding protein 2207395:2212764 reverse MW:195338
176	GMXORF1747, soluble lytic murein transglycosylase, putative 2236840:2238936 reverse MW:75567
177	GMXORF1749, SCP-like extracellular protein subfamily, putative 2239645:2241159 reverse MW:53960
178	GMXORF1758, hypothetical protein 2251264:2252250 forward MW:36613
179	GMXORF1782, non-ribosomal peptide synthetase, terminal component 2291878:2305464 forward MW:495228
180	GMXORF1786, hypothetical protein 2308045:2312718 forward MW:171197
181	GMXORF1790, lipoprotein, putative 2319068:2320282 forward MW:44386
182	GMXORF1798, band 7/Mec-2 family protein 2327421:2329052 reverse MW:57947
183	GMXORF1827, adenylate cyclase 2360983:2362713 forward MW:61634
184	GMXORF1828, serine/threonine kinase Pkn10 2362710:2364953 forward MW:80508
185	GMXORF1831, hypothetical protein 2366048:2368405 reverse MW:86987
186	GMXORF1850, hypothetical protein 2424146:2425603 forward MW:53219
187	GMXORF1851, reticulocyte binding protein, putative 2425465:2440917 forward MW:552588
188	GMXORF1852, polyketide synthase, putative 2440910:2450023 forward MW:330338
189	GMXORF1868, glutamate synthase, large subunit 2465843:2470408 reverse MW:165721
190	GMXORF1881, efflux transporter, RND family, MFP subunit subfamily 2483168:2484355 forward MW:41200
191	GMXORF1931, Patatin-like phospholipase family 2549500:2550576 forward MW:39446
192	GMXORF1941, Uncharacterised ACR, COG1354 2560614:2561234 forward MW:23404
193	GMXORF1943, conserved hypothetical protein subfamily, putative 2562235:2564472 forward MW:77867
194	GMXORF1951, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type 2575976:2576515 forward MW:19426
195	GMXORF1952, hypothetical protein 2576598:2577575 reverse MW:35883
196	GMXORF1956, hypothetical protein 2579891:2581465 reverse MW:57139
197	GMXORF1961, hypothetical protein 2586301:2588109 reverse MW:64455
198	GMXORF1984, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD binding domain family 2613814:2614623 forward MW:28944
199	GMXORF1985, enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein family 2614663:2615439 forward MW:27168
200	GMXORF1992, Thiolase, N-terminal domain subfamily, putative 2623914:2625095 forward MW:40714

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 201-250)
201	GMXORF1993, Coenzyme A transferase superfamily 2625177:2625875 forward MW:25520
202	GMXORF1994, CoA transferase, subunit B 2625839:2626543 forward MW:25117
203	GMXORF2004, non-ribosomal peptide synthetase, terminal component 2636829:2679653 reverse MW:1551772
204	GMXORF2007, hypothetical protein 2683869:2684372 reverse MW:18538
205	GMXORF2009, conserved hypothetical protein 2686278:2688602 reverse MW:85299
206	GMXORF2017, LipR, putative 2695466:2696113 reverse MW:22299
207	GMXORF2020, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type, putative 2698788:2699339 reverse MW:19815
208	GMXORF2024, Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain protein 2701785:2702741 reverse MW:34350
209	GMXORF2041, hypothetical protein 2723105:2724028 forward MW:32658
210	GMXORF2042, hypothetical protein 2724373:2724744 reverse MW:13726
211	GMXORF2067, Peptidase M16 inactive domain family 2750729:2752168 reverse MW:51170
212	GMXORF2084, lipoprotein, putative 2768260:2769006 forward MW:27336
213	GMXORF2130, Cysteine-rich domain family 2819239:2822442 forward MW:118995
214	GMXORF2136, oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family superfamily 2830059:2830832 forward MW:2
215	GMXORF2137, isochorismate synthases subfamily 2830944:2832188 forward MW:43672
216	GMXORF2140, amino acid adenylation domain protein 2834804:2839144 forward MW:155659
217	GMXORF2144, Siderophore-interacting protein superfamily 2843046:2843666 reverse MW:22470
218	GMXORF2147, non-ribosomal peptide synthetase, terminal component 2847655:2883474 reverse MW:1301994
219	GMXORF2148, pyoverdine chromophore precursor synthetase 2883478:2896698 reverse MW:473809
220	GMXORF2175, hypothetical conserved protein, putative 2974329:2976401 reverse MW:76905
221	GMXORF2194, conserved hypothetical protein 2998293:3000503 reverse MW:81750
222	GMXORF2195, cold-shock domain family protein-related protein 3000535:3000723 reverse MW:6855
223	GMXORF2196, Angiotensin-converting enzyme superfamily 3000854:3002920 reverse MW:76792
224	GMXORF2232, nucleoside diphosphate kinase 3050212:3050649 reverse MW:16134
225	GMXORF2235, succinate dehydrogenase and fumarate reductase iron-sulfur protein subfamily 3053059:3053868 revers
226	GMXORF2267, NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein 3093007:3093951 reverse MW:33865
227	GMXORF2268, NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein 3093997:3095226 reverse MW:44665
228	GMXORF2299, lipoprotein, putative 3126845:3128536 reverse MW:61912
229	GMXORF2317, chemoreceptor Mcp2, putative 3154833:3157046 forward MW:78661
230	GMXORF2333, reticulocyte binding protein 3177300:3182564 forward MW:192984
231	GMXORF2365, transcription elongation factor GreA 3222939:3223457 reverse MW:18946
232	GMXORF2388, hypothetical protein 3246538:3247572 reverse MW:35985
233	GMXORF2398, hypothetical adventurous gliding motility protein U, putative 3258313:3261921 reverse MW:135330
234	GMXORF2408, soluble lytic murein transglycosylase 3270586:3271317 forward MW:26348
235	GMXORF2410, Protein of unknown function family 3272899:3273867 forward MW:35231
236	GMXORF2417, hypothetical protein 3280591:3282357 forward MW:65836
237	GMXORF2425, cold-shock domain family protein-related protein 3290085:3290288 reverse MW:7368
238	GMXORF2444, ribosomal protein S11 3312404:3312844 reverse MW:15115
239	GMXORF2451, ribosomal protein L30, putative 3316950:3317219 reverse MW:9719
240	GMXORF2469, ribosomal protein S10 3325688:3326185 reverse MW:18406
241	GMXORF2508, putative glycosyltransferase 3363579:3364781 reverse MW:44628
242	GMXORF2564, membrane protein, putative 3423267:3425237 forward MW:70491
243	GMXORF2565, endoribonuclease L-PSP, putative 3425324:3425710 reverse MW:13620
244	GMXORF2602, OmpA family domain protein 3473202:3474422 reverse MW:43555
245	GMXORF2612, ethanolamine ammonia-lyase large subunit 3486185:3488509 forward MW:84358
246	GMXORF2644, MbtH-like protein-related protein 3526123:3526374 forward MW:9708
247	GMXORF2660, lipoprotein, putative 3545545:3547023 reverse MW:51192
248	GMXORF2679, Tgl protein 3569563:3570207 reverse MW:24049
249	GMXORF2704, acetyltransferase, GNAT family 3598228:3598764 reverse MW:19857
250	GMXORF2708, ferredoxin, 4Fe-4S 3600896:3601231 reverse MW:12304

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 251-300)
251	GMXORF2750, kinesin-related protein 3645877:3648138 reverse MW:80117
252	GMXORF2758, LysM domain protein 3657786:3659021 reverse MW:44624
253	GMXORF2771, L6202.3, putative 3672588:3676724 forward MW:151604
254	GMXORF2794, probable periplasmic linker protein VC1674 [imported], putative 3702822:3703901 forward MW:36952
255	GMXORF2795, AcrB/AcrD/AcrF family protein [imported] 3703937:3707077 forward MW:111483
256	GMXORF2851, asgB protein 3771827:3772237 reverse MW:15644
257	GMXORF2874, CalU2 3805091:3806440 forward MW:49563
258	GMXORF2887, carbohydrate kinase, FGGY family, putative 3819874:3821367 reverse MW:54277
259	GMXORF2917, hypothetical protein 3859719:3860990 reverse MW:44360
260	GMXORF2933, Aha1 domain superfamily 3878940:3879416 reverse MW:17727
261	GMXORF2954, HD domain protein, putative 3903393:3904844 forward MW:52792
262	GMXORF2958, methionyl-tRNA synthetase 3908574:3910685 reverse MW:77332
263	GMXORF2966, non-ribosomal peptide synthetase, terminal component 3923311:3927978 forward MW:170024
264	GMXORF2970, hypothetical protein 3932578:3933675 reverse MW:39455
265	GMXORF3044, hypothetical protein 4012613:4012912 reverse MW:10466
266	GMXORF3054, lipoprotein, putative 4018623:4020161 reverse MW:54523
267	GMXORF3069, hypothetical protein 4034275:4035804 forward MW:54177
268	GMXORF3085, serine/threonine protein kinase 4054376:4056607 forward MW:79534
269	GMXORF3090, conserved hypothetical protein 4061342:4061749 forward MW:14928
270	GMXORF3094, pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase 4065948:4067531 reverse MW:55096
271	GMXORF3095, pyruvate dehydrogenase E1 component, beta subunit 4067538:4068524 reverse MW:35487
272	GMXORF3103, lipoprotein, putative 4077071:4079041 forward MW:71268
273	GMXORF3105, hypothetical protein 4079119:4080654 forward MW:55613
274	GMXORF3115, vegetative protein 4088518:4088853 forward MW:11940
275	GMXORF3122, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D, putative 4094465:4096030 forward MW:57326
276	GMXORF3132, conserved hypothetical protein 4104786:4105304 reverse MW:20162
277	GMXORF3149, ATP-dependent nuclease, subunit A, putative 4125637:4129560 reverse MW:142281
278	GMXORF3176, hypothetical protein 4163672:4164709 reverse MW:36197
279	GMXORF3194, protease, putative 4183219:4184964 forward MW:64596
280	GMXORF3231, conserved hypothetical protein 4225091:4227112 reverse MW:75995
281	GMXORF3236, AMP-binding family protein 4231182:4232996 forward MW:66702
282	GMXORF3255, pmbA protein, putative 4252240:4253586 forward MW:47917
283	GMXORF3259, type II secretion pathway protein XcpQ, putative 4257201:4259852 forward MW:94055
284	GMXORF3274, conserved hypothetical protein 4273955:4276132 reverse MW:79574
285	GMXORF3300, 5'-nucleotidase family protein, putative 4305927:4307468 reverse MW:53539
286	GMXORF3305, TPR domain protein, putative 4314053:4314991 forward MW:35384
287	GMXORF3308, hypothetical protein 4318442:4319323 forward MW:31114
288	GMXORF3310, hypothetical protein 4320098:4320322 forward MW:7677
289	GMXORF3315, hypothetical protein 4323388:4323969 reverse MW:20323
290	GMXORF3336, hypothetical protein 4340241:4340516 reverse MW:9718
291	GMXORF3339, ABC transporter, ATP-binding protein 4342139:4342882 forward MW:26693
292	GMXORF3342, hypothetical protein 4346304:4347086 forward MW:29941
293	GMXORF3347, conserved hypothetical protein 4351131:4352636 forward MW:53813
294	GMXORF3354, conserved hypothetical protein 4362365:4368106 reverse MW:207091
295	GMXORF3384, excinuclease ABC, subunit A 4399906:4405050 reverse MW:184404
296	GMXORF3423, PilB-related protein 4450934:4451356 forward MW:15336
297	GMXORF3479, Protein of unknown function (DUF574) superfamily 4516355:4517164 forward MW:30287
298	GMXORF3497, submaxillary mucin, putative 4539700:4540200 forward MW:16841
299	GMXORF3563, HYPOTHETICAL SIGNAL PEPTIDE PROTEIN 4632832:4633329 reverse MW:18276
300	GMXORF3565, conserved hypothetical protein 4634261:4637032 reverse MW:100093

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 301-350)
301	GMXORF3670, hypothetical protein 4761409:4762485 reverse MW:39672
302	GMXORF3718, cystathionine beta-synthase 4810258:4811625 forward MW:49363
303	GMXORF3731, aminopeptidase P II 4824048:4825592 forward MW:56799
304	GMXORF3734, glutaredoxin-related protein 4827096:4827455 reverse MW:13025
305	GMXORF3735, Bola/YrbA family protein [imported] 4827431:4827688 reverse MW:9642
306	GMXORF3755, competence protein ComL, putative 4849155:4849940 reverse MW:30042
307	GMXORF3822, methyltransferase frzF 4922729:4923316 forward MW:22015
308	GMXORF3825, hypothetical adventurous gliding motility protein U, putative 4926583:4929915 forward MW:125613
309	GMXORF3851, protein kinase, putative 4964048:4965220 reverse MW:42763
310	GMXORF3903, conserved hypothetical protein 5016106:5017716 forward MW:57556
311	GMXORF3905, hypothetical protein 5018256:5018951 forward MW:24017
312	GMXORF3987, hypothetical protein 5110650:5113235 forward MW:94684
313	GMXORF3988, Lipoxygenase domain protein 5113057:5115357 forward MW:86841
314	GMXORF3995, hypothetical protein 5123467:5124894 forward MW:53150
315	GMXORF4000, L6202.3, putative 5131811:5134156 reverse MW:85984
316	GMXORF4021, serine/threonine kinase PKN8 5152054:5155164 forward MW:112898
317	GMXORF4023, hypothetical protein 5156317:5157141 forward MW:28695
318	GMXORF4042, Mxcl, putative 5181603:5182982 reverse MW:48758
319	GMXORF4043, Mxch 5182930:5185467 reverse MW:91116
320	GMXORF4057, alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase, putative 5197159:5199054 forward MW:69303
321	GMXORF4106, peptidase, M16 family [imported], putative 5253587:5255008 reverse MW:51095
322	GMXORF4107, peptidase, M16 family [imported] 5255021:5256457 reverse MW:53184
323	GMXORF4125, non-ribosomal peptide synthetase, terminal component 5274083:5290693 forward MW:599646
324	GMXORF4140, FAD-binding monooxygenase, PheA/TfdB family, putative 5308312:5309889 forward MW:56735
325	GMXORF4158, multidrug-efflux transporter 5330200:5331702 reverse MW:51394
326	GMXORF4159, putative translation initiation factor IF-2 5330671:5332269 forward MW:57308
327	GMXORF4168, urea amidolyase-related protein 5341177:5341998 forward MW:28162
328	GMXORF4172, alkyl hydroperoxide reductase 5345519:5346073 forward MW:20732
329	GMXORF4173, alkyl hydroperoxide reductase D 5346080:5346604 forward MW:18942
330	GMXORF4187, membrane protein, putative 5360798:5362666 reverse MW:66328
331	GMXORF4196, lipoprotein, putative 5374612:5375637 forward MW:35557
332	GMXORF4202, SWIB (YM74) complex protein 5383617:5383934 reverse MW:11379
333	GMXORF4205, hypothetical protein 5386032:5387642 forward MW:60574
334	GMXORF4227, hypothetical protein 5411053:5412822 forward MW:64886
335	GMXORF4250, serine/threonine kinase PKN8 5437231:5440854 forward MW:129601
336	GMXORF4271, hypothetical protein 5460083:5460586 reverse MW:18665
337	GMXORF4277, hypothetical protein 5466334:5466996 forward MW:23314
338	GMXORF4279, hypothetical protein 5467706:5468617 reverse MW:33473
339	GMXORF4281, putative lipoprotein mlpa precursor 5470390:5470980 reverse MW:20365
340	GMXORF4282, ompa-related protein precursor 5471137:5474322 reverse MW:114486
341	GMXORF4284, biopolymer transport protein TolQ 5475381:5476064 forward MW:23842
342	GMXORF4285, ExbD/TolR family protein 5476196:5476606 forward MW:14772
343	GMXORF4286, tolR protein 5476606:5477106 forward MW:18012
344	GMXORF4303, DnaJ domain protein 5494312:5499864 reverse MW:196525
345	GMXORF4315, hypothetical protein 5515583:5516461 forward MW:30743
346	GMXORF4316, chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease precursor, putative 5516586:5517338 reverse MW:26612
347	GMXORF4330, transcriptional regulator, LysR family, putative 5530843:5531751 forward MW:33186
348	GMXORF4335, phycocyanin alpha phycocyanobilin lyase, putative 5535667:5537262 forward MW:56873
349	GMXORF4345, alkaline phosphatase, putative 5548282:5550507 reverse MW:81402
350	GMXORF4394, lipoprotein, putative 5605504:5606850 reverse MW:47985

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 351-400)
351	GMXORF4419, hemin ABC transporter, periplasmic hemin-binding protein 5638187:5639146 reverse MW:32718
352	GMXORF4420, PROBABLE HEMIN TRANSPORT PROTEIN 5639086:5640174 reverse MW:40536
353	GMXORF4422, hypothetical tonB-linked outer membrane receptor PG13, putative 5640895:5642910 reverse MW:72331
354	GMXORF4439, Protein kinase domain, putative 5658272:5659126 reverse MW:31563
355	GMXORF4468, Patatin-like phospholipase family 5698216:5700054 forward MW:65695
356	GMXORF4473, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 5704283:5706136 forward MW:68398
357	GMXORF4540, aminopeptidase N [imported], putative 5776826:5779531 forward MW:98794
358	GMXORF4544, TPR Domain domain protein 5787168:5790827 forward MW:135013
359	GMXORF4561, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type 5812439:5813185 forward MW:26264
360	GMXORF4574, lipoprotein, putative 5825804:5829583 forward MW:134763
361	GMXORF4644, response regulator, putative 5908452:5909033 forward MW:21532
362	GMXORF4661, histidine kinase 5925709:5928201 reverse MW:89652
363	GMXORF4668, D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, putative 5934664:5936910 reverse MW:79342
364	GMXORF4676, lipoprotein, putative 5940565:5941350 reverse MW:27942
365	GMXORF4677, acetyltransferase, GNAT family 5941364:5942014 reverse MW:24446
366	GMXORF4678, RNA polymerase sigma-54 factor 5942078:5943595 reverse MW:56974
367	GMXORF4691, UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase family protein 5955208:5956506 reverse MW:47907
368	GMXORF4718, hypothetical protein 5990108:5993371 reverse MW:113319
369	GMXORF4813, conserved hypothetical protein 6125470:6127143 forward MW:60697
370	GMXORF4869, conserved hypothetical protein 6193692:6195869 reverse MW:79305
371	GMXORF4875, glutathione S-transferase family protein 6200489:6201115 forward MW:23328
372	GMXORF4886, OmpA family protein 6210887:6211690 reverse MW:28857
373	GMXORF4922, TonB system transport protein ExbD 6247882:6248316 reverse MW:15355
374	GMXORF4948, peptidase, M16 family [imported], putative 6278877:6280337 reverse MW:51138
375	GMXORF4949, peptidase, M16 family [imported], putative 6280334:6281743 reverse MW:52265
376	GMXORF4969, iron ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative 6302528:6303754 reverse MW:42797
377	GMXORF4988, conserved hypothetical protein 6323640:6325805 reverse MW:78582
378	GMXORF5038, hypothetical protein 6379952:6380452 forward MW:18033
379	GMXORF5045, oxidoreductase, aldo/keto reductase family 6385745:6386983 forward MW:44333
380	GMXORF5054, iron compound ABC transporter, periplasmic iron compound-binding protein 6397175:6398008 forward MW:30154
381	GMXORF5069, cold-shock domain family protein-related protein 6409808:6410095 forward MW:10707
382	GMXORF5075, AcrB/AcrD/AcrF family protein [imported] 6412828:6415944 reverse MW:111436
383	GMXORF5080, hypothetical protein 6419616:6420140 reverse MW:18655
384	GMXORF5084, lipoprotein, putative 6422038:6423759 forward MW:61239
385	GMXORF5087, hypothetical protein 6426613:6427875 forward MW:45110
386	GMXORF5159, PUTATIVE SIGNAL PEPTIDE PROTEIN, putative 6509299:6514017 reverse MW:168608
387	GMXORF5171, hypothetical protein 6522085:6522915 reverse MW:29182
388	GMXORF5175, hypothetical protein 6527778:6529811 reverse MW:72159
389	GMXORF5180, extracellular protein, gamma-D-glutamate-meso-diaminopimelate muropeptidase, putative 6532985:65346
390	GMXORF5183, penicillin-resistant DD-carboxypeptidase 6537769:6538677 forward MW:31181
391	GMXORF5214, Isoflavone reductase 6575097:6576272 reverse MW:41935
392	GMXORF5216, aspartate aminotransferase, putative 6577713:6579017 reverse MW:47093
393	GMXORF5225, lipoprotein, putative 6594532:6596175 reverse MW:57450
394	GMXORF5227, conserved hypothetical protein 6596991:6601541 forward MW:164468
395	GMXORF5300, lipoprotein, putative 6676745:6677014 reverse MW:9978
396	GMXORF5317, bli5629 6697581:6698705 forward MW:41837
397	GMXORF5336, ATP synthase F0, B subunit 6716659:6717213 reverse MW:20615
398	GMXORF5384, putative sigma-54 dependent transcriptional activator 6766655:6768085 reverse MW:52819
399	GMXORF5429, aldo/keto reductase 6824389:6825399 forward MW:36909
400	GMXORF5442, AhpC/TSA family family 6836499:6837080 reverse MW:20711

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 401-450)
401	GMXORF5459, TonB-dependent receptor, putative 6854779:6857967 forward MW:113717
402	GMXORF5522, oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family 6923727:6924473 forward MW:26263
403	GMXORF5549, AsmA family superfamily 6959665:6962367 forward MW:94449
404	GMXORF5589, PBS lyase HEAT-like repeat domain protein 7009088:7015624 forward MW:231206
405	GMXORF5591, RNA-directed DNA polymerase from retron mx162-rt 7017875:7019332 forward MW:52959
406	GMXORF5622, macrolide ABC efflux protein 7056076:7057296 reverse MW:44153
407	GMXORF5631, peptidase, M28D family 7066341:7067846 reverse MW:51988
408	GMXORF5657, Amidohydrolase family domain protein 7096549:7099722 reverse MW:116049
409	GMXORF5678, conserved hypothetical protein 7120285:7121496 reverse MW:45391
410	GMXORF5698, ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative 7139497:7140507 forward MW:35514
411	GMXORF5703, hypothetical protein 7144486:7146525 reverse MW:75749
412	GMXORF5705, hypothetical protein 7147012:7148175 forward MW:42377
413	GMXORF5710, lipoprotein, putative 7154382:7155116 forward MW:25166
414	GMXORF5726, peptidase, M16 family [imported], putative 7173995:7175512 reverse MW:53273
415	GMXORF5727, peptidase, M16 family 7175512:7177056 reverse MW:56712
416	GMXORF5762, Protein of unknown function, DUF583 family 7219922:7220374 forward MW:15923
417	GMXORF5797, cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcB, putative 7262074:7263177 forward MW:37933
418	GMXORF5799, outer membrane protein precursor CzcC PA2522 [imported], putative 7266382:7268160 forward MW:64407
419	GMXORF5832, vegetative protein 7295517:7296026 forward MW:17621
420	GMXORF5862, serine/threonine protein kinase, putative 7324241:7325485 reverse MW:45019
421	GMXORF5879, vegetative protein 7346406:7347116 forward MW:24483
422	GMXORF5892, TPR domain protein, putative 7357625:7358614 reverse MW:36629
423	GMXORF5895, lipoprotein, putative 7360128:7360967 reverse MW:29987
424	GMXORF5906, oxidoreductase, zinc-binding 7371614:7372663 reverse MW:38023
425	GMXORF5919, short chain dehydrogenase family protein [imported] 7386849:7387817 forward MW:34561
426	GMXORF5978, hypothetical protein 7462391:7462849 forward MW:16362
427	GMXORF5980, serine/threonine protein kinase, putative 7463695:7467234 forward MW:129360
428	GMXORF5997, hypothetical protein 7485998:7486495 forward MW:17771
429	GMXORF6022, hypothetical protein 7512518:7512964 reverse MW:14804
430	GMXORF6035, lipoprotein, putative 7531485:7533434 reverse MW:66257
431	GMXORF6046, hypothetical protein 7545841:7546638 forward MW:28199
432	GMXORF6075, aminopeptidase N 7576973:7579843 forward MW:104477
433	GMXORF6127, conserved hypothetical protein 7633635:7635179 reverse MW:54178
434	GMXORF6129, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type 7636320:7637288 forward MW:33873
435	GMXORF6135, oligopeptidase A, putative 7642988:7645048 reverse MW:76843
436	GMXORF6145, zinc-binding dehydrogenase 7650305:7651414 forward MW:38903
437	GMXORF6146, esterase [imported] 7651510:7652361 forward MW:30945
438	GMXORF6150, hypothetical protein 7655296:7655979 forward MW:24222
439	GMXORF6157, serine/threonine protein kinase 7659886:7662951 forward MW:111367
440	GMXORF6201, lipoprotein, putative 7702200:7705184 reverse MW:104975
441	GMXORF6204, flagellar motor protein MotB 7705919:7706806 reverse MW:31816
442	GMXORF6218, chaperone protein DnaK 7718398:7720224 forward MW:65275
443	GMXORF6244, sensor histidine kinase 7751314:7753878 forward MW:93383
444	GMXORF6295, bacteriophytochrome histidine kinase 7808466:7810232 reverse MW:62497
445	GMXORF6297, sensor histidine kinase/response regulator 7811349:7813529 reverse MW:76707
446	GMXORF6312, hypothetical protein 7833628:7835544 forward MW:68502
447	GMXORF6336, TonB-dependent siderophore receptor, putative 7851589:7853697 reverse MW:75909
448	GMXORF6362, hypothetical protein 7883027:7883563 forward MW:18577
449	GMXORF6382, MotA/ToIQ/ExbB proton channel family protein 7902251:7902880 forward MW:22003
450	GMXORF6395, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type 7916116:7916439 forward MW:11269

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 451-500)
451	GMXORF6415, similar to late embryogenesis abundant proteins [imported], putative 7935364:7936197 reverse MW:289
452	GMXORF6495, hypothetical protein 8014254:8015666 forward MW:49463
453	GMXORF6503, 2-oxo acid dehydrogenases acyltransferase (catalytic domain) protein 8022472:8024358 forward MW:66688
454	GMXORF6512, sensor histidine kinase/response regulator 8031611:8038939 forward MW:262387
455	GMXORF6543, ribosomal protein alanine N-acetyl transferase-like protein 8071364:8071900 reverse MW:19417
456	GMXORF6577, grps protein 8115823:8116704 forward MW:31574
457	GMXORF6588, hypothetical protein 8127988:8128740 forward MW:25304
458	GMXORF6607, hypothetical protein 8146272:8147192 forward MW:33008
459	GMXORF6649, prolyl oligopeptidase family protein [imported] 8190432:8192660 forward MW:82149
460	GMXORF6657, conserved hypothetical protein 8201314:8203017 reverse MW:63056
461	GMXORF6671, lipoprotein, putative 8217245:8218582 forward MW:45828
462	GMXORF6705, extracellular protease 8260629:8261303 reverse MW:24027
463	GMXORF6722, lipoprotein, putative 8272305:8272901 reverse MW:21716
464	GMXORF6725, conserved hypothetical protein 8278014:8278589 reverse MW:21717
465	GMXORF6732, DGPF domain superfamily 8286053:8286385 reverse MW:12414
466	GMXORF6744, phosphomannomutase AlgC 8304426:8305796 forward MW:50311
467	GMXORF6757, outer membrane protein, putative 8318156:8319559 reverse MW:50244
468	GMXORF6760, TonB system transport protein ExbD 8321069:8321503 reverse MW:15433
469	GMXORF6761, biopolymer transport protein ExbB 8321507:8322283 reverse MW:27433
470	GMXORF6813, serine/threonine kinase, putative 8386124:8389594 forward MW:127918
471	GMXORF6834, IPT/TIG domain protein 8425137:8429099 reverse MW:138492
472	GMXORF6840, ABC transporter, ATP-binding protein 8434177:8434905 reverse MW:26237
473	GMXORF6870, Phosphofructokinase 8463611:8464648 reverse MW:37044
474	GMXORF6876, lipoprotein, putative 8469109:8469654 reverse MW:19944
475	GMXORF6891, adventurous gliding motility protein Q 8485564:8487201 reverse MW:56700
476	GMXORF6903, DSBA-like thioredoxin domain family 8496224:8497642 forward MW:49098
477	GMXORF6906, NAD-dependent isocitrate dehydrogenase alpha subunit 8498447:8499319 reverse MW:31119
478	GMXORF6987, sporulation protein 8594034:8595431 reverse MW:51438
479	GMXORF6988, putative nucleotide-binding protein 8595467:8596876 reverse MW:51595
480	GMXORF6991, HYR domain family 8600955:8605133 reverse MW:143280
481	GMXORF7000, sheath polysaccharide-degrading enzyme 8614564:8616144 reverse MW:55472
482	GMXORF7021, transcription regulator, ArsR family [imported] 8633786:8634160 forward MW:13944
483	GMXORF7032, fatty aldehyde dehydrogenase [imported] 8644714:8646279 reverse MW:53965
484	GMXORF7040, hypothetical protein 8652705:8653394 forward MW:24970
485	GMXORF7052, hypothetical protein 8668340:8669290 reverse MW:35028
486	GMXORF7058, AcrA/AcrE family protein VCA0639 [imported], putative 8676257:8677399 reverse MW:41199
487	GMXORF7107, conserved hypothetical protein 8747537:8747896 reverse MW:13028
488	GMXORF7108, glutathione S-transferase 8747893:8748501 reverse MW:22323
489	GMXORF7116, membrane protein, putative 8758861:8760594 forward MW:63317
490	GMXORF7120, hypothetical protein 8763731:8764348 forward MW:22537
491	GMXORF7141, cytochrome c oxidase, subunit II [imported], putative 8783310:8784356 reverse MW:39364
492	GMXORF7143, hypothetical protein 8785271:8785738 reverse MW:16594
493	GMXORF7145, putative DNA-invertase 8786976:8788163 reverse MW:42516
494	GMXORF7148, molybdopterin oxidoreductase, iron-sulfur binding subunit 8789560:8792763 reverse MW:116582
495	GMXORF7149, Cytochrome c3 8792751:8793413 reverse MW:24591
496	GMXORF7167, phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase/chorismate mutase 8814604:8815617 reverse MW:36145
497	GMXORF7176, heat shock protein HtpG 8825176:8827140 reverse MW:73272
498	GMXORF7177, F20B17.11 8827139:8829058 forward MW:69460
499	GMXORF7191, dipeptidyl peptidase IV [imported] 8842777:8844981 forward MW:81342
500	GMXORF7192, cold-shock domain family protein-related protein 8845085:8845291 reverse MW:7317

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 501-550)
501	GMXORF7200, sensor histidine kinase/response regulator 8853771:8855915 forward MW:76885
502	GMXORF7211, Putative RNA methylase family UPF0020 family 8867672:8868823 reverse MW:40508
503	GMXORF7227, ABC transporter, ATP-binding protein 8885243:8886250 forward MW:37050
504	GMXORF7230, iron compound ABC transporter, periplasmic iron compound-binding protein 8887928:8888884 reverse MW
505	GMXORF7255, conserved hypothetical protein 8913963:8914364 forward MW:14510
506	GMXORF7300, Peptidase family M48 family 8960596:8961420 reverse MW:29200
507	GMXORF7321, hypothetical protein 8980080:8981588 reverse MW:54971
508	GMXORF7348, sensor histidine kinase/GAF domain protein, putative 9009117:9012695 forward MW:130497
509	GMXORF7356, Uncharacterized BCR 9019664:9020278 forward MW:21762
510	GMXORF7364, DEAD-box protein 9031529:9033979 reverse MW:89838
511	GMXORF7380, acetyl-CoA synthetase 9049250:9051214 reverse MW:72190
512	GMXORF7389, lipoprotein, putative 9061443:9062285 reverse MW:31427
513	GMXORF7399, oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family 9075159:9076007 forward MW:29205
514	GMXORF7419,blr0227 9107769:9108446 reverse MW:25184
515	groEL, TCP-1/cpn60 chaperonin family superfamily 1648809:1650452 forward MW:58146
516	groES, chaperonin, 10 kDa 1059694:1059984 reverse MW:10650
517	GST6, glutathione S-transferase III homolog 5502401:5502898 reverse MW:18610
518	GTPase, translation initiation factor IF-2 4779504:4782722 reverse MW:111901
519	hbd-10, putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase FadB 766861:769155 forward MW:83688
520	hemK, HemK protein 1043190:1044071 reverse MW:32019
521	hisG, ATP phosphoribosyltransferase 1991176:1991955 forward MW:27692
522	hisS, histidyl-tRNA synthetase 2739311:2740588 reverse MW:46990
523	hppD, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase 3939376:3940440 reverse MW:39807
524	htrA, serine protease 1697603:1698742 reverse MW:40010
525	hutU, urocanate hydratase 1831411:1833066 reverse MW:60264
526	icd, isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent 3056990:3058288 reverse MW:47296
527	ileS_2, isoleucyl-tRNA synthetase 8627025:8630768 reverse MW:140233
528	kamA, L-lysine 2,3-aminomutase 1292189:1293559 forward MW:52605
529	kdpB, potassium-translocating P-type ATPase, B subunit 6980985:6983045 reverse MW:72263
530	ksgA, dimethyladenosine transferase 4795847:4796698 reverse MW:30839
531	L8, ribosomal protein L10 3582901:3583398 reverse MW:17724
532	lcrD_2, type III secretion inner membrane protein SctV TC0365 [imported] 4316180:4318303 reverse MW:76427
533	livJ_2, branched chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein 8123161:8124225 f
534	lon, ATP-dependent protease La 2316348:2319020 reverse MW:97307
535	lpdA, dihydrolipoamide dehydrogenase 2000233:2001630 forward MW:49641
536	lysA, diamino pimelate decarboxylase 8964648:8965862 forward MW:43149
537	manC, mannose-1-phosphate guanylyltransferase 8300982:8302025 forward MW:36779
538	mdh, malate dehydrogenase, NAD-dependent 3056013:3056957 reverse MW:33043
539	metK, S-adenosylmethionine synthetase 8278954:8280018 forward MW:38644
540	MI-1-Psynthase, myo-inositol-1-phosphate synthase 6666098:6667348 forward MW:46369
541	mitochondrial3- acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 9014279:9015475 forward MW:42070
542	murB, UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase 220893:221897 forward MW:34592
543	mutS_2, DNA mismatch repair protein MutS 2492631:2495252 forward MW:94215
544	nuoB, NADH dehydrogenase I, B subunit 3997983:3998546 forward MW:20871
545	nuoE, NADH dehydrogenase I, E subunit 5914635:5915123 forward MW:18059
546	nuoF, NADH dehydrogenase I, F subunit 5915282:5916499 forward MW:43965
547	nuoG, NADH dehydrogenase I, G subunit CC1946 [imported] 4003365:4005245 forward MW:67532
548	nuoL, NADH dehydrogenase I, I subunit 4006739:4007503 forward MW:28497
549	nusA, N utilization substance protein A [imported] 4783159:4784859 reverse MW:62714
550	nusG, transcription termination/antitermination factor NusG 3585162:3585734 reverse MW:21355

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 551-600)
551	obg, GTP-binding protein 5449681:5451138 reverse MW:50608
552	pdhA, pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, pyruvate dehydrogenase alpha subunit 4068578:4069513
553	pep_2, prolyl endopeptidase 3513997:3516042 forward MW:74288
554	pep_3, prolyl endopeptidase 4835138:4837207 reverse MW:76848
555	pepA, cytosol aminopeptidase 976327:977922 reverse MW:56219
556	pepO, peptidase, M13 family 3174427:3176670 forward MW:82972
557	pgi, glucose-6-phosphate isomerase 7855523:7857112 reverse MW:58323
558	pgk, phosphoglycerate kinase 3893490:3894677 reverse MW:42706
559	pgm, phosphoglucomutase, alpha-D-glucose phosphate-specific 1062635:1064272 reverse MW:58652
560	pheT, phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit 2986931:2989243 reverse MW:82727
561	pilQ, type IV pilus biogenesis protein PilQ 36982:39651 forward MW:94343
562	pilT, twitching motility protein 20945:22033 forward MW:39505
563	pksP_2, Ta1 2396996:2424088 forward MW:976405
564	pnpA, polyribonucleotide nucleotidyltransferase [imported] 4774489:4776945 reverse MW:87254
565	polA, DNA polymerase I 3533457:3536183 reverse MW:99558
566	proS, prolyl-tRNA synthetase 8133167:8134438 reverse MW:47981
567	protein_MGC:7, unnamed protein product 3710273:3710596 reverse MW:11636
568	pruA, delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 9004516:9006066 reverse MW:56234
569	ptsl, phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase 8266289:8268247 forward MW:72262
570	pyrG, CTP synthase 5905292:5906932 forward MW:60536
571	recA_3, recA protein 5550671:5551762 reverse MW:39007
572	rho, transcription termination factor Rho 184268:185896 forward MW:60313
573	rplA, ribosomal protein L1 3583819:3584532 reverse MW:25131
574	rplB, ribosomal protein L2 3323841:3324686 reverse MW:30630
575	rplC, ribosomal protein L3 3266248:3266892 reverse MW:23476
576	rplD, ribosomal protein L4/L1 family 3325011:3325634 reverse MW:22809
577	rplE, ribosomal protein L5 3319655:3320308 reverse MW:24243
578	rplF, ribosomal protein L6 3318232:3318798 reverse MW:20345
579	rplI, ribosomal protein L9 831902:832345 reverse MW:16301
580	rplK, ribosomal protein L11 3584569:3585015 reverse MW:15581
581	rplL, ribosomal protein L7/L12 3582429:3582797 reverse MW:12503
582	rplM, ribosomal protein L13 4853226:4853672 reverse MW:16523
583	rplO, ribosomal protein L15 3316402:3316929 reverse MW:18700
584	rplP, ribosomal protein L16 3321974:3322393 reverse MW:15511
585	rplQ, ribosomal protein L17 3309939:3310358 reverse MW:15584
586	rplR, ribosomal protein L18 3317767:3318213 reverse MW:16156
587	rplS, ribosomal protein L19 3046427:3046810 reverse MW:14514
588	rplT, ribosomal protein L20 2990617:2990964 reverse MW:13044
589	rplV, ribosomal protein L22 3323164:3323508 reverse MW:12590
590	rpmE, ribosomal protein L31 763547:763768 forward MW:8113
591	rpoA, DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit 3310542:3311564 reverse MW:37566
592	rpoB, DNA-directed RNA polymerase, beta subunit 3578025:3582251 reverse MW:157534
593	rpoC, DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit 3573679:3577890 reverse MW:156284
594	rpsA, ribosomal protein S1 2619343:2621055 forward MW:63547
595	rpsA_2, 30S ribosomal protein S1 3033764:3036145 reverse MW:83598
596	rpsB, ribosomal protein S2 532581:533804 forward MW:44334
597	rpsD, ribosomal protein S4 3311708:3312334 reverse MW:23936
598	rpsD_2, ribosomal protein S4 7959555:7960253 reverse MW:26361
599	rpsG, ribosomal protein S7 3329753:3330223 reverse MW:17958
600	rpsH, ribosomal protein S8 3318863:3319375 reverse MW:18521

Nr.	Identifizierte Proteine von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Nr. 601-631)
601	rpsM, ribosomal protein S13p/S18e 3312906:3313289 reverse MW:14213
602	rpsO, ribosomal protein S15 4777041:4777310 reverse MW:10463
603	rpsP, ribosomal protein S16 3048526:3048786 reverse MW:9450
604	rpsQ, ribosomal protein S17 3321305:3321619 reverse MW:11930
605	rpsS, ribosomal protein S19 3323544:3323831 reverse MW:10596
606	sdhA, succinate dehydrogenase subunit A 3053913:3055790 reverse MW:69113
607	secA, preprotein translocase, SecA subunit 529511:532447 forward MW:110488
608	secF, protein-export membrane protein SecF 1302200:1303378 forward MW:42406
609	slyD, peptidylprolyl isomerase (EC 5.2.1.8) 4385918:4386403 reverse MW:17109
610	sodC1, superoxide dismutase, Cu-Zn 9043076:9043630 reverse MW:19175
611	soxA, sarcosine oxidase, subunit alpha 8647246:8648523 reverse MW:45200
612	sucA, 2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component 8846635:8849526 reverse MW:107058
613	sucB, 2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase 8845449:8846645 re
614	sucC, succinyl-CoA synthase, beta subunit 3051612:3052547 reverse MW:33421
615	sucD, Succinyl-CoA synthetase alpha chain 3050683:3051582 reverse MW:30621
616	tal, transaldolase 8970819:8972192 forward MW:47938
617	tig, trigger factor 4839640:4840803 reverse MW:43779
618	tkl, transketolase 7341538:7343769 reverse MW:81775
619	tmbC, membrane lipoprotein 106857:108044 reverse MW:41451
620	TpF1, Dps family protein 5346649:5347212 forward MW:20807
621	tpiA, triosephosphate isomerase 3892680:3893450 reverse MW:26803
622	trmE, tRNA modification GTPase TrmE 7191179:7192570 forward MW:48352
623	trpS, tryptophanyl-tRNA synthetase 2559038:2560201 forward MW:42563
624	trx, thioredoxin 4087227:4087559 forward MW:11988
625	trxB_2, thioredoxin reductase 4888661:4889635 reverse MW:34920
626	tsf, translation elongation factor Ts 533961:534614 forward MW:24147
627	tuf, translation elongation factor Tu 3326198:3327388 reverse MW:43416
628	tuf_2, translation elongation factor Tu 3586611:3587801 reverse MW:43430
629	ushA, 5'-nucleotidase family protein 4074782:4077070 forward MW:84208
630	uvrC, excinuclease ABC, C subunit 4105442:4107382 reverse MW:73432
631	uvrD, ATP-dependent DNA helicase 3124722:3126800 reverse MW:76858