

Analyse und Charakterisierung der Proteinphosphorylierung auf der Peptidebene mittels massenspektrometrischer Methoden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Minh Tri Hoang
aus Saigon

Frankfurt (2009)
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen

Dekan: Herr Professor Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Herr Professor Dr. Michael Karas

Herr Professor Dr. Rolf Marschalek

Datum der Disputation: 17.11.2009

Danksagung

Ein ganz besonders großer Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Karas für die sehr interessante Aufgabenstellung. Die hervorragende apparative Ausstattung des Arbeitskreises, das Ermöglichen der Besuche von nationalen und internationalen Kongressen zur Präsentation der wissenschaftlichen Arbeiten, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine sehr hilfreichen Denkanstöße haben zu einem erheblichen Anteil zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Für die Übertragung der Praktikumsverantwortung für das 2. Semester der Pharmazie danke ich Ihnen ausserordentlich. Durch diese Tätigkeit habe ich menschlich und organisatorisch sehr viel gelernt.

Mein Dank gilt meinen lieben Büro-Kollegen Thorsten Jaskolla und Markus Weidlich (sogenannte Mitglieder des „Office Number One“). Die teils sehr lehrreichen, aber stets amüsanten und humorvollen Unterhaltungen während der Promotionszeit im „office number one“ werde ich stets in bester Erinnerung behalten.

Ein ganz lieber Dank geht an alle meine Kollegen, mit denen ich die Praktikumsbetreuung übernehmen durfte. Isam, du bist bis heute für mich der beste Praktikumsleiter gewesen! Marianne, thank you for the nice time during the practical courses. I will never forget the time we shared supervising students! And I will never forget your “killing eyes” you had for unwilling students! Lieber Eric, die Studentenbetreuung mit Dir war stets Herz-erfrischend! Liebe Sandra und Sabrina, ich danke euch für die stets humorvolle und entspannte Atmosphäre! Markus Persike danke ich für die große Geduld, die du stets in der Arbeit mit den Studenten hattest!

Herrn Prof. Dr. Robert Tampé und Ali Tinazli vom Institut für Biochemie (Goethe-Universität Frankfurt am Main) danke ich für die gute Kooperation und das zur Verfügung stellen des synthetisierten Bis-NTAs. Ihre Anregungen und Diskussionen mündeten in stets fruchtbaren Resultaten.

Herrn Dr. Udo Roth, Frau Dr. Steinert und Herrn Dr. Menzel der Firma Qiagen danke ich herzlich für die exzellente Zusammenarbeit bei den Entwicklungsarbeiten zur Phosphonat-Oberfläche. Herrn Dr. Roth danke ich für die intensive Bearbeitung der MAPK1 und des

HSP, sowie Ermittlung der Kapazität der Phosphonat-Oberfläche per ICP-MS. Udo, die Arbeit mit Dir war sehr freundschaftlich und schön!

Ich bedanke mich bei Herrn Eckhardt, Herrn Becht und Herrn Rosenmeyer für ihren nicht ersetzbaren Einsatz bei der Organisation der Studentenpraktika und diverser administrativer Angelegenheiten. Ich konnte mich stets auf euch Drei verlassen!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Proteinphosphorylierung als posttranslationale Modifikation (PTM)	3
1.2 Ionisationstechniken in der Biomassenspektrometrie	5
1.2.1 Elektrospray Ionisation (ESI)	6
1.2.2 Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)	8
1.3 Peptide Mass Fingerprint (PMF) und Proteomics	10
1.4 Fragmentierungstechniken für die Charakterisierung von Peptiden und Proteinen	11
1.6 Analysetechniken für die Charakterisierung von Phosphoproteinen	14
1.6.2 Phosphoselektive Färbemethoden	15
1.6.3 Einsatz von dephosphorylierenden Proteinphosphatasen:	16
1.6.4 Isotopenlabeling	17
1.6.5 Immunoblotting	17
1.6.6 Chemische Derivatisierung/Affinity-Tagging:	18
1.6.7 Edmansequenzierung mit ³² P markierten Proteinen:	19
1.6.8 Mutationsanalyse:	20
1.7 Massenspektrometrie in der Phosphorylierungsanalyse:	20
1.7.1 <i>Precursor Ion Scanning</i> :	20
1.7.2 <i>Neutral Loss Scanning</i>	21
1.7.3 Weitere Entwicklungen	22
1.8.1 Befüllte Pipettenspitzen	24
1.8.2 Modifizierte Oberflächen für die Anreicherung von Phosphopeptiden	27
1.8.3 <i>Self assembled monolayers</i> (SAMs):	27
1.9 Zielsetzung der Dissertation	30
2. Material und Methoden	33
2.1 In-Lösungs-Verdau	33
2.2 Entsalzung mit Zip-Tips	33
2.3 <i>Dried-droplet</i> Präparation für die MALDI-MS	34
2.4 Massenspektrometrie	34
2.4.1 MALDI-MS	34
2.4.2 ESI-MS	36
2.5 Optimierung der MALDI-Matrix für Phosphopeptide	36
2.6 Relative Quantifizierung der Phosphorylierung	37
2.6.1 Dephosphorylierung	38
2.6.2 Validierung der relativen Quantifizierung der Phosphorylierung	38
2.6.3 Anwendung der relativen Quantifizierung auf Ovalbumin	39
2.7 Chemische Modifizierung von Goldoberflächen	39
2.7.1 Anmerkungen zur chemischen Modifizierung von Oberflächen	39
2.7.2 Synthese von multivalenten Chelator-Thiolen	40
2.7.3 Herstellung von goldbedampften Gläsern	40
2.7.4 Modifizierung von Oberflächen mit Bis-NTA	41
2.7.5 Fabrikation von Phosphonat-modifizierten Oberflächen	41
2.7.5.1 Herstellung von Phosphorsäureamid-Oberflächen	41
2.7.5.2 Herstellung von fokussierenden Phosphonat-Oberflächen	42
2.8 His-Tag Protein Aufreinigung	44
2.9 Anreicherungstechniken für Phosphopeptide	44
2.9.1 Aufreinigung von Phosphopeptiden mit Graphit Mikrosäulen	44
2.9.2 Phosphopeptideaufreinigung mit IMAC- <i>Beads</i>	45
2.9.3.1 Bestimmung der Bindekapazität der bis-NTA-Oberfläche	46

2.9.4	Anreicherung von Phosphopeptiden mittels TiO ₂	47
2.9.5	Anreicherung von Phosphopeptiden an Phosphonat-modifizierten Oberflächen	47
2.9.5.1	Bestimmung der Bindekapazität der Phosphonatoberfläche.....	47
2.10	Probengewinnung und Aufarbeitung der MAPK-1	48
2.11	2-D Gelelektrophorese	48
2.12	In-Gel Verdau des HSP1	49
3.	Ergebnisse:	50
3.1	Optimierung der MALDI-Matrix für Phosphopeptide.....	50
3.2	Anreicherungstechniken für Phosphopeptide.....	55
3.2.1	Aufreinigung von Phosphoprotein-Verdaus mit Graphit.....	55
3.2.2	Anreicherung von Phosphopeptiden mit IMAC.....	58
3.2.2.1	Spezifität von IMAC- <i>Beads</i>	59
3.2.3	Analyse von Phosphopeptiden mit bis-NTA-Oberflächen.....	62
3.2.3.1	Etablierung der bis-NTA-Oberflächen mittels Aufreinigung von His-tag- Proteinen 63	
3.2.3.2	Bis-NTA-Oberflächen für die Aufreinigung von Phosphopeptiden	68
3.2.4	Anreicherung von Phosphopeptiden mit TiO ₂ -Säulen.....	72
3.2.4.1	Spezifität von Titandioxid.....	73
3.2.5	Anreicherung von Phosphopeptiden mit Phosphonat-Oberflächen	76
3.2.5.1	Synthese und Charakterisierung von Phosphonat-modifizierten Oberflächen.....	76
3.2.5.2	Analyse von Phosphopeptiden mit Phosphonat-Oberflächen	79
3.2.5.3	Fokussierende Phosphonatoberflächen	81
3.2.5.4	Kompatibilität der Phosphonatoberfläche mit ESI.....	84
3.2.5.5	Spezifität der Phosphonat-Oberfläche.....	87
3.2.6	Gegenüberstellung von IMAC, TiO ₂ und Phosphonatoberfläche	90
3.3	Einsatz der Phosphonat-Oberfläche für die Analyse von realen Proben	98
3.3.1	Untersuchung der Mitogen Activated Protein Kinase 1 (MAPK1)	98
3.3.2	Aufreinigung des Heatshock Protein B1	103
3.4	Quantifizierung der Phosphorylierung von Ovalbumin	106
4.	Diskussion.....	110
4.1	Einfluss von Matrix und Säurekomponente auf die Detektion von phosphorylierten Peptiden.....	110
4.2	Quantifizierung der Phosphorylierung durch Dephosphorylierung.....	112
4.3	Anreicherungstechniken für phosphorylierte Peptide	115
4.3.1	Graphit als Affinitätsmedium für die Anreicherung von Phosphopeptiden. 115	
4.3.2	Einsatz von IMAC im Phosphoproteomics-Anwendungen	116
4.3.4	Phosphonatoberfläche zur Aufreinigung von Phosphopeptiden	120
5.	Zusammenfassung.....	124
	Literaturverzeichnis.....	126
	Abkürzungsverzeichnis.....	137
	Publikationen	139
	Lebenslauf	140

1. Einleitung

1.1 Proteinphosphorylierung als posttranslationale Modifikation (PTM)

Die posttranslationale Modifikation (PTM) von Proteinen kann grundsätzlich durch zwei Mechanismen erfolgen: entweder durch kovalentes Anbringen einer chemischen Gruppe an ein Protein oder durch Prozessierung des Proteins, nachdem es in der Proteinbiosynthese translatiert wurde. In der Literatur sind weit über 300 unterschiedliche PTMs bekannt (Glinski *et al.*, 2006), von denen hier exemplarisch nur die Glykosylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung genannt werden sollen.

Neben der Untersuchung der Glykosylierung ist die Analyse der reversiblen Phosphorylierung im zentralen Fokus der Erforschung der posttranslationalen Modifikationen mittels moderner Biomassenspektrometrie. Die Bedeutung der Proteinphosphorylierung erkennt man nicht zu letzt an der Würdigung der Arbeiten von Edmond H. Fischer und Edwin G. Krebs auf diesem Gebiet mit dem Nobelpreis für Physiologie bzw. Medizin im Jahre 1992. In diesem Abschnitt der Einleitung soll erörtert werden, welche bedeutende Rolle die reversible Phosphorylierung als regulierender Mechanismus für alle lebenden Zellen besitzt.

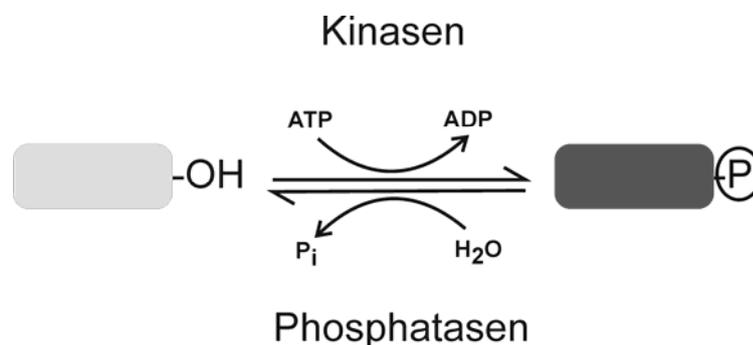


Abb. 1.1: Vereinfachtes Schema der reversiblen Proteinphosphorylierung. Proteinkinasen phosphorylieren Hydroxoaminosäuren unter Verbrauch von einem ATP-Molekül. Bei der Dephosphorylierung durch Phosphatasen wird anorganisches Phosphat abgespalten.

Das dynamische Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen ist Gegenstand intensiver Forschungen, da sich herausgestellt hat, dass die Phosphorylierung als PTM in sehr vielfältiger Weise biochemische Prozesse in lebenden Organismen reguliert. Das Wechselspiel zwischen Phosphorylieren und Dephosphorylieren wird oft als "An-/Ausmechanismus" für die Zelle betrachtet, der es ermöglicht, gezielt regulatorisch in

vielfältiger Weise in Prozesse einzugreifen. Obwohl der Einbau eines Phosphatrestes keinen bemerkenswerten Einfluss auf die molekulare Größe des Proteins hat, so kann er doch entscheidend die Faltung und damit die funktionelle Struktur eines Proteins stark verändern (Kern *et al.*, 1999).

Modifikationen von Aminosäuren mit OH-Gruppen (Serin, Threonin und Tyrosin) durch Phosphatreste sind hinlänglich bekannt. Neben diesen drei Aminosäuren kennt man noch die Phosphorylierung von Histidinen, welche vornehmlich im prokaryotischen Reich anzutreffen ist. Sehr wenig erforscht ist hingegen die Phosphorylierung an Lysin und Arginin (N-Phosphate), Glutaminsäure (Acylphosphate) und Cystein (S-Phosphate bzw. S-Phosphothioester) (Matthews 1995).

Die relative Häufigkeit von Phosphat an oben genannten Aminosäuren ist interessanterweise nicht gleichverteilt. Phosphoserine treten mit einer Häufigkeit von ca. 90 %, Phosphothreonine mit ca. 10 % und Phosphotyrosine mit ca. 0,05 % auf. Man vermutet, dass phosphorylierte Histidine 10-100 Mal seltener auftreten, als Phosphotyrosine (Klumpp *et al.*, 2002). Jedoch ist einschränkend anzumerken, dass die Frage der Häufigkeit der Phosphorylierung für eine Aminosäure nicht exakt beantwortet werden kann, da die verschiedenen Phosphoaminosäuren verschiedene chemische Stabilitäten aufweisen. Während Phosphoserin, -threonin und -tyrosin relativ säurestabil sind, sind Phosphohistidine und -lysine dies nicht. Letztere hingegen zeigen im alkalischen Milieu ausgeprägte Stabilitäten, während die erstgenannten drei Phosphoaminosäuren bei höheren pH-Werten dephosphoryliert werden (Sickmann *et al.*, 2002).

1.2 Ionisationstechniken in der Biomassenspektrometrie

Obwohl Thomson das Prinzip der Massenspektrometrie (MS) bereits am Ende des 19. Jahrhunderts vorgestellt hatte, gelang es erst Ende der 1980-er Jahre mit der Einführung der sanften Ionisationstechniken von MALDI (Karas *et al.*, 1987) und ESI (Fenn *et al.*, 1989) die Massenspektrometrie für große Biomoleküle wie Proteine und DNA nutzbar zu machen.

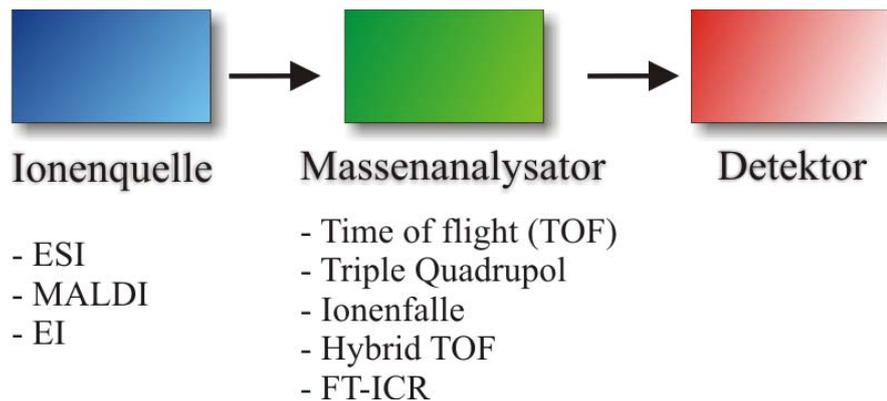


Abb. 1.3: Allgemeiner schematischer Aufbau eines Massenspektrometers. In der Ionenquelle werden geladene Ionen aus dem Analyten gebildet, welche im Massenanalysator nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) separiert und anschließend am Detektor registriert werden.

Am Anfang der Entwicklung der Massenspektrometrie bestanden Analyte aus Atomen bzw. kleinen, leicht flüchtigen, organischen Molekülen. Bei den klassischen Ionisierungsmethoden "Elektronenstoß-Ionisation" (EI) und der "Chemischen Ionisation" (CI) wird der Analyt in einer ersten Stufe zunächst durch Erhitzen und probenabhängig nach einer chemischen Derivatisierung in die Gasphase überführt und anschließend dort ionisiert. Die am weitesten verbreitete EI führt als "harte" Ionisationstechnik meist zur Bildung von einer Vielzahl von Fragment-Ionen, welche genutzt werden können zur Aufklärung der chemischen Struktur des Analyten. Das Entstehen der Fragment-Ionen wird durch die hohe Energieübertragung während des EI-Prozesses erklärt. Zur massenspektrometrischen Analyse von großen, polaren Biomolekülen, wie Proteinen oder Peptiden, sind EI und CI Methoden gänzlich ungeeignet, da solche Analyten mittels Heizen nicht zersetzungsfrei in die Gasphase überführt werden. Erste Erfolge für die Analyse von größeren Peptiden bis etwa 6000 Da wurden Ende der 80-er Jahre mit Fast Atom Bombardement (FAB) (Barber *et al.*, 1981) und der Plasmadesorption (Macfarlane *et al.*, 1976) erreicht. Den Siegeszug der modernen Biomassenspektrometrie jedoch ermöglichten erst die Entwicklung der "weichen" Ionisierungstechniken Electrospray Ionisation (ESI) und Matrix-unterstützte-Laser-Desorptions/Ionisation (MALDI), welche die

Basis für die massenspektrometrische Analyse von intakten Biomolekülen wie Proteinen und DNA (700 Da bis mehrere Megadalton) bilden. Im folgenden Abschnitt der Einleitung soll näher auf diese beiden bahnbrechenden Ionisierungsmethoden eingegangen werden.

1.2.1 Elektrospray Ionisation (ESI)

Neben MALDI ist ESI die wichtigste "schonende" Ionisierungstechnik, die heute in der Bioanalytik eingesetzt wird. Bei der ESI werden die Ionen anders als in den meisten anderen Ionisierungsmethoden bei Atmosphärendruck bzw. auf dem Weg ins Vakuum des Massenspektrometers erzeugt. Grundlage des ESI-Prozesses ist die Dispersion einer Lösung, welche die Analyten enthält, in einem elektrischen Feld. Die Analytlösung, oftmals nur wenige Mikroliter, wird aus einer Kapillaröffnung gesprüht, welche einige Millimeter vor dem Ioneneinlass eines Massenspektrometers justiert wird. Je nach Polung kann sowohl im Positiv- als auch Negativmodus gemessen werden. Dabei wird zwischen der ESI-Metallkapillare oder einer metallbedampften Glas- oder Quarzkapillare und dem Probeneinlass des Massenspektrometers eine Spannungsdifferenz von einigen Kilovolt angelegt. Werden positiv geladene Analyten analysiert, so liegt an der Kapillare eine positive Spannung an, während die Einlassöffnung eine negative Polung (bzw. Erdpotential) aufweist. Im Negativmodus kehrt sich die Polung entsprechend um.

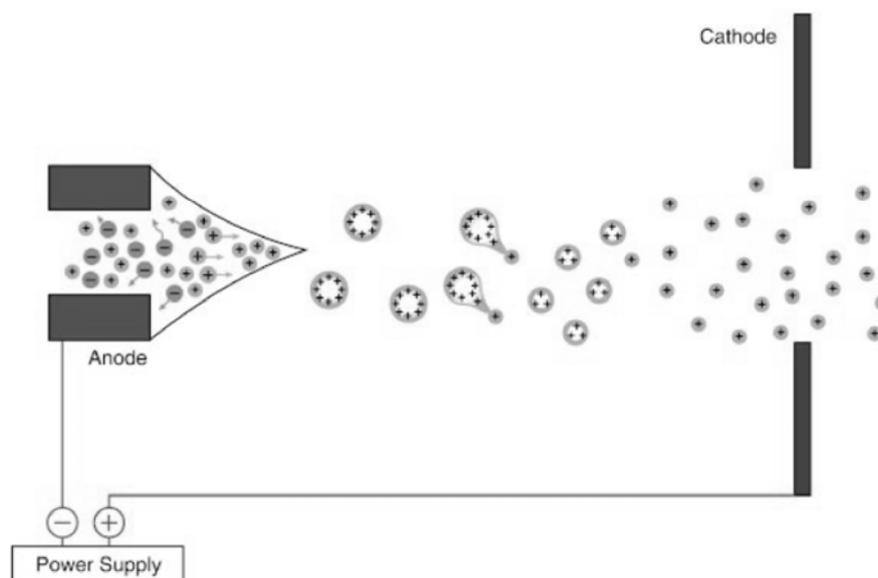


Abb. 1.4: Schema der Ionenbildung bei der Elektrospray Ionisation (ESI) im Positivmodus. (Kearle et al., 1997)

Am Ende der Kapillarspitze bildet die Flüssigkeitsoberfläche unter bestimmten technischen randbedingungen (elektrische Feldstärke, aber auch Lösungseigenschaften, wie Oberflächenspannung, Leitfähigkeit) einen sogenannten Taylor-Konus, aus der etwa μm -große, hochgeladene Tröpfchen freigesetzt werden. Durch Verdampfen des Lösemittels nimmt die Tröpfchengröße kontinuierlich ab. Hierdurch erhöht sich die Ladungsdichte im Tröpfchen weiter, welche eine Steigerung der Coulomb-Abstoßungskräfte bewirkt. Wird im Laufe dieses Prozesses das Rayleigh-Limit erreicht, so überwiegen die Coulomb-Abstoßungskräfte die Oberflächenspannung des Tröpfchens, und dieses zerfällt in noch kleinere, gleichfalls geladene Tröpfchen. Irgendwann sind die Tröpfchen zu klein, um sich weiter zu teilen. Dann dampft das Restlösungsmittel ab und die Ladungen werden auf den Analyten übertragen.

Elektrospray Ionisation kann sowohl online als auch offline betrieben werden. Es besteht die Möglichkeit, die Probe vor der Überführung ins MS-Gerät über eine HPLC aufzutrennen, oder direkt ohne chromatographische Separierung aus einer Kapillare zu sprühen. Die Kopplung von LC und MS im Bereich der Proteomics war bis vor wenigen Jahren auf ESI beschränkt. Doch seit kurzem kommen aufgrund verbesserter Automatisierungen im Bereich des *Spotting*s vermehrt LC-MALDI-Kopplungen zum Einsatz, welche z.T. komplementäre Analyseergebnisse, ausgelöst durch unterschiedliche Analytdiskriminierungen der beiden verschiedenen Ionisierungstechniken, liefern.

Das erhaltene ESI-Spektrum enthält in der Regel für Analyten unter 1000 Da meist einfach geladene Signale, während Analyten mit einem höheren Molekulargewicht als höhergeladene Ionen am Detektor registriert werden, mit typisch einer Ladung/1000 Da. Bei einem Peptidgemisch werden in der Regel mehrere Ladungszustände im Massenspektrum aufgezeichnet. Deshalb wird häufig eine Dekonvolution zu einfach geladenen Signalen durchgeführt. Für eine Totalmassenbestimmung eines intakten Proteins mittels ESI ist eine Dekonvolution unumgänglich, da selbst für ein einziges Protein, welches als Analyt vorliegt, je nach Größe des Proteins, Ladungszustände im zweistelligen Bereich auftreten können.

Im Gegensatz zur MALDI-Technik ist die Elektrospray-Ionisation nur begrenzt geeignet für Proben, die Salze, Puffersubstanzen, Detergentien und andere Verunreinigungen enthalten. Diese Zusätze sind oftmals aber stabilisierend in der Probe enthalten, da die darin befindlichen Analyten andernfalls nicht in Lösung gehalten werden können und sich somit einer massenspektrometrischen Analyse entziehen würden. Die höhere Robustheit des MALDI-Prinzips gegenüber Verunreinigungen ist einer der wichtigsten Gründe, warum MALDI teils ergänzend, teils die Elektrospray-Ionisation ersetzend eingesetzt wird.

1.2.2 Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

MALDI bildet neben ESI die wichtigste Ionisierungstechnik im Bereich der Bioanalytik. Die Entwicklung der MALDI-Technik ist verbunden mit den Namen Michael Karas und Franz Hillenkamp, die dieses Prinzip Ende der 80-er Jahre des 20. Jahrhunderts an der Universität Münster entwickelten. MALDI stellt *die* ideale Plattform für die Analyse von großen, nicht flüchtigen Biomolekülen wegen ihrer ausserordentlich hohen Sensitivität, Geschwindigkeit, Präzision und (im Gegensatz zu ESI) relativen Unempfindlichkeit gegenüber Probenzusätzen wie Puffersubstanzen und Detergentien dar (Kallweit *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1998).

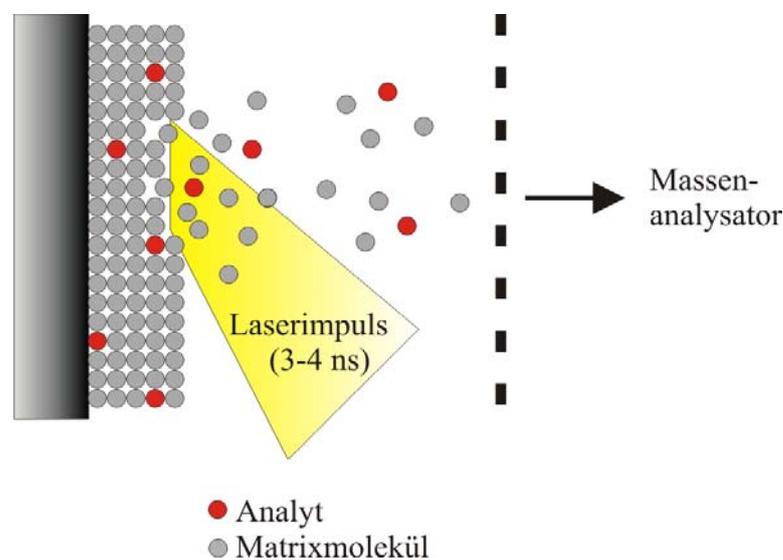


Abb. 1.5: Vereinfachte Darstellung des MALDI-Prozesses. Matrixmoleküle und Analyten werden durch einen gepulsten Laserschuss desorbiert und gelangen ionisiert in die Gasphase.

Da bei MALDI mit gepulstem Laserlicht (3-4 ns) gearbeitet wird, hat sich eine Kopplung zu einem Flugzeitanalysator (TOF = *time of flight*) durchgesetzt. Moderne MALDI-TOF Geräte erreichen heute erstaunliche Ergebnisse, was den geringen Verbrauch an Probe, Schnelligkeit und Einfachheit der Durchführbarkeit angeht. Oft reichen weniger als 1 μL Peptidlösung, die wenige Femtomol Probe enthält. Dieser Probentropfen wird auf einem Edeltahltablett mit einem Tropfen Matrixlösung gemischt und durch einen warmen Luftstrom zu charakteristischen Kristallen getrocknet. Die Matrix, die im Vergleich zum Analyten im hohen molaren Überschuss vorliegt, hat die Funktion die Energie des einstrahlenden Lasers zu absorbieren, ein Zersetzen des Analyten zu verhindern und den Analyten zu inkorporieren. Als Matrixsubstanzen kommen kleine, organische Moleküle zum Einsatz, welche bei der Wellenlänge des UV-Lasers (Stickstofflaser mit 337 nm Wellenlänge oder Nd-YAG Laser

mit 355 nm Wellenlänge) eine hohe Eigenabsorption zeigen. Der gepulste Laser trägt mehrere Schichten der Matrix/Analyt-Kristalle ab, wobei entstandene Analytionen in die Gasphase überführt werden, im Hochvakuum in einem elektrischen Feld beschleunigt werden und schließlich den Detektor am Ende einer feldfreien Driftsstrecke erreichen. Die Flugzeit der einzelnen Analyten nur abhängig von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z). Da im MALDI fast ausschließlich einfach geladene Ionen generiert werden, hängt die Flugzeit des Analyten letztendlich von der jeweilig vorliegenden Molekularmasse ab. Die Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse wird durch folgende Gleichung wiedergegeben: $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} * m * v^2 = z * e * U$. Hierin steht E_{kin} für die kinetische Energie. Aus der Gleichung geht hervor, dass das Produkt aus Ionenladung z , Elementarladung e und Beschleunigungsspannung U direkt proportional zum Produkt der Masse m und dem Quadrat der Geschwindigkeit v der Ionen ist. Die ersten funktionsfähigen MALDI-TOF Instrumente waren limitiert, was die Sensitivität und Massengenauigkeit angeht. Eine lineare Messanordnung ermöglichte die Massenbestimmung bis in den Megadaltonbereich. Entscheidend wurde die Auflösung von MS-Geräten durch die Einführung des Reflektors (Mamyrin *et al.*, 1973) sowie der "Verzögerten Extraktion" (*Delayed Extraction*) (Brown *et al.*, 1995; Vestal *et al.*, 1995) verbessert. Erst die Implementierung dieser beiden Techniken in kommerzielle MALDI-TOF Geräte sorgte für einen merkbaren Schub für die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen mittels MALDI-TOF MS auf Peptidebene.

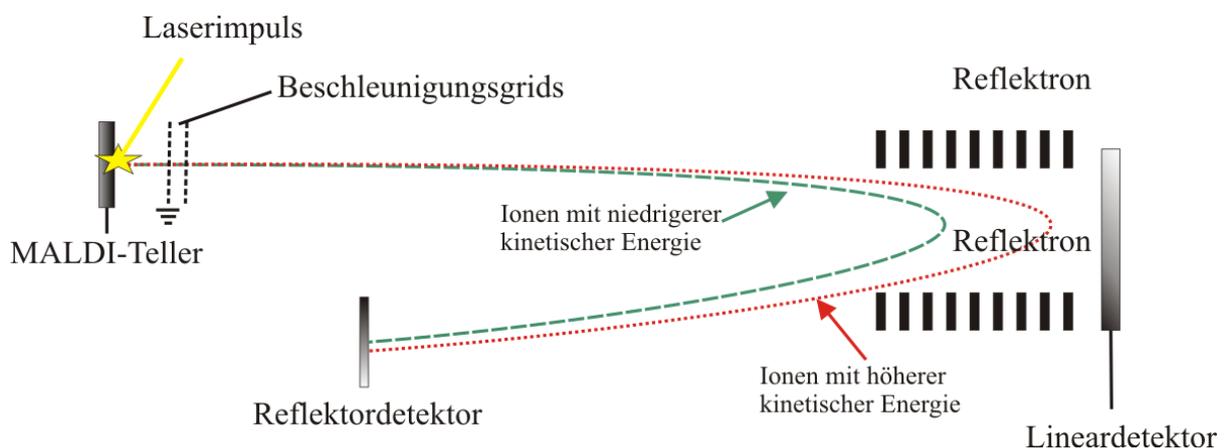


Abb. 1.6: Schema eines MALDI-TOF Massenspektrometers, hier betrieben im Reflektormodus. Wird eine Messung im Linearmodus notwendig, etwa bei Messungen von intakten Proteinen, so wird der Reflektor ausgeschaltet und die beschleunigten Ionen treffen auf den linear angeordneten Detektor.

Im Bereich der Proteomics wird im überwiegenden Teil α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (HCCA) eingesetzt (Beavis *et al.*, 1992). Neben der leicht automatisierbaren Messung durch die spezielle Kristallform bietet HCCA den Vorteil, dass sie nach dem Trocknen mit einer

kalten wässrigen Lösung zur Entfernung von Puffersubstanzen und anderen Verunreinigungen kurz behandelt werden kann, da HCCA und damit die in ihr inkorporierten Analyten sehr wenig wasserlöslich sind. Die zweite häufig eingesetzte Matrix ist 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (Strupat *et al.*, 1991). Sie wird vornehmlich für die Messung von intakten Proteinen eingesetzt. Im Gegensatz zu HCCA kristallisiert sie nicht homogen über die gesamte Fläche, sondern ringförmig in größeren breiten Nadeln. Der äußere Ring mit den Kristallen enthält die inkorporierten Analyten; Laserschüsse in diesen Bereichen geben Signale für Analyten, während im inneren, nichtkristallinen Bereich der Präparation, wohin sich vermehrt Salze und Puffersubstanzen abscheiden, keine MS-Signale für den Analyten generierbar sind. Durch dieses Phänomen entsteht ein begrenzter Entsalzungseffekt, so dass bei Einsatz von DHB als MALDI-Matrix mit relativ hohen Salzverunreinigungen gearbeitet werden kann.

1.3 Peptide Mass Fingerprint (PMF) und Proteomics

PMF steht für *Peptide Mass Fingerprint* und bezeichnet eine Technik zur Identifikation und begrenzten Charakterisierung von Proteinen, welche Anfang der 90-er Jahre von mehreren Gruppen vorgestellt wurde (Henzel *et al.*, 1989; Henzel *et al.*, 1993, Mann *et al.*, 1993). Ausgangspunkt dieses Verfahrens ist der Verdau des interessierenden Proteins, welches sich in einem Gelstückchen, in Lösung oder auf einer Blottingmembran befinden kann. Das erhaltene Peptidgemisch gibt einen für jedes Protein spezifischen Fingerabdruck. Die erhaltenen Peptidmassen werden in der Regel mittels MALDI-MS ermittelt, da es fast ausschließlich einfach geladene Signale generiert und leichter zu interpretieren ist als ESI-Spektren. Verglichen wird diese Peptidmassenliste nun mit einem *In-silico*-Verdau des entsprechenden Proteins aus einer Datenbank. Bei entsprechend hoher Massengenauigkeit (50 ppm bzw. besser) und genügender Anzahl an zugeordneten Peptidmassen ermittelt ein spezieller Algorithmus (z.B. MOWSE *Molecular Weight Search* von Mascot (Perkins *et al.*, 1999), ob sich das experimentelle Massenprofil signifikant einem Protein der Datenbank zuordnen lässt.

Der Vorteil dieser Methode liegt eindeutig in ihrer Geschwindigkeit und dem geringen Probenbedarf (wenige Femtomol eines Proteins). Dies sind nachvollziehbare Gründe, weshalb das auf Massenspektrometrie basierende PMF bei der Identifikation von Proteinen die zeitlich aufwendige Edmansequenzierung weitestgehend ersetzt hat. Die Limitierung des PMF zur

Identifizierung liegt nicht in der fehlenden Sensitivität oder Massengenauigkeit heutiger Massenspektrometer sondern in den sich ständig erweiternden Proteindatenbanken. Zum einen sind die Genome längst nicht aller Organismen entschlüsselt und somit auch in die diversen Datenbanken aufgenommen, zum anderen findet sich in den lediglich die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins. Unterschiedliche Spleißingvarianten, Mutationen oder posttranslationale Modifikationen sind in ihnen oft nicht enthalten. Problematisch ist auch die Analyse von kleineren Proteinen (unter 20 kDa) oder Membranproteinen, da diese meist nur wenige Sollschnittstellen haben. Entweder entstehen zu wenige Peptidfragmente oder diese sind zu groß, um sie mit einer notwendigen Massengenauigkeit zu bestimmen, da der normale Messbereich für eine genügend hohe Massengenauigkeit im Bereich von etwa 800 Da bis 3000 Da liegt.

1.4 Fragmentierungstechniken für die Charakterisierung von Peptiden und Proteinen

Fragmentierungen von Peptiden können herangezogen werden, um Sequenzinformationen über den entsprechenden Analyten zu erhalten. Dabei werden diese Fragmentierungsexperimente in sogenannten Tandem-Massenspektrometern durchgeführt. Man unterscheidet zwischen *Tandem-In-Time* und *Tandem-In-Space*-Massenspektrometern. Bei *Tandem-In-Time* findet die Fragmentierung und Massenbestimmung der Fragmentionen zeitlich getrennt im selben Reaktionsraum statt, etwa in einer Quadrupolionenfalle. Findet die Fragmentierung räumlich getrennt von der Messung der Fragmentmassen statt, so spricht man von *Tandem-In-Space*-Massenspektrometern (z.B. Tripel-Quadrupol). Bei beiden Prinzipien findet in einem ersten Schritt die Selektion des zu fragmentierenden Vorläuferions (Precursor Ion) statt, in einem zweiten Schritt wird das ausgewählte Ion fragmentiert und die entstandenen Fragmente gemessen.

Tandem-In-Space-Massenspektrometer sind eine Aneinanderreihung von mehreren Massenanalysatoren (z.B. TOF/TOF (Medzhradszky *et al.*, 2000) oder Triple-Quadrupol (Goodlett *et al.*, 2001)). Neben der Kombination von gleichen Massenanalysatoren besteht auch die Möglichkeit der Kombination von unterschiedlichen Analysatortypen. Solche Geräte (z.B. Quadrupol-orthogonales TOF oder Quadrupolionenfalle-Orbitrap) werden allgemein als Hybridgeräte bezeichnet. Alle Tandem-Massenspektrometer haben aufgrund ihrer

Leistungsdaten, sowie der Herstellungskosten meist spezifische Anwendungsbereiche, sowohl im Proteomics als auch im Bereich der *small molecules*.

Die meisten Fragmentierungsexperimente mit Peptiden geschehen sowohl für Elektrospray, als auch für MALDI mittels CID. *Collision Induced Dissociation* (CID) bezeichnet das gezielte Fragmentieren eines selektierten Vorläuferions in einer Kollisionszelle mit inertem Stoßgas, meist Helium oder Argon. Ist die Stoßenergie durch das Aufeinanderprallen von Stoßgas und Peptid unter 100 eV, so spricht man von Niedrigstoßenergie. Die Stoßenergien in diesem Bereich werden typischerweise in Ionenfallen, Q-TOF- und Tripel-Quadrupol-Instrumenten erreicht. Die Energien im CID führen idealerweise nicht zu einer unkoordinierten Fragmentierung des Peptids, sondern ermöglichen die Bildung von Fragmenten entlang der Peptidkette. Dies ist jedoch maßgeblich von der Peptidsequenz abhängig. Aus den Massendifferenzen der Fragmentionen können Schlüsse auf die Aminosäuresequenz des Peptids gezogen werden. Je nach Qualität und Quantität der Fragmente können Teile des Peptids oder gar die gesamte Aminosäuresequenz des Peptids bestimmt werden. Im Falle von phosphorylierten Peptiden kann zusätzlich noch die genaue Aminosäure ausfindig gemacht werden, die die Phosphatgruppe trägt, da die entsprechende Massendifferenz um genau 79,97 Da größer ist, als beim Vorliegen einer unmodifizierten Aminosäure.

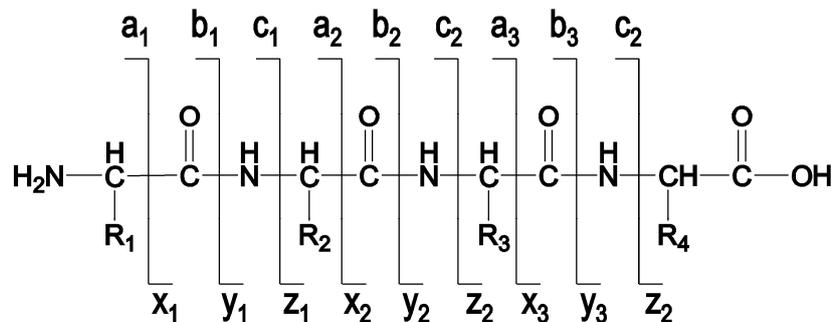


Abb. 1.7: Nomenklatur von Fragmentationen nach Roepstorff und Fohlmann. (Roepstorff et al., 1984)

1.5 Quantifizierungstechniken in der Proteomanalyse

Neben der Identifizierung und Charakterisierung ist im Bereich der Proteomics die Quantifizierung von Proteinen von ausserordentlichem Interesse. Häufig tritt die Fragestellung auf, inwiefern bestimmte biochemische Prozesse bzw. Krankheiten Einfluss auf die Expression von Proteinen haben. Dabei interessiert weniger die absolute Menge, sondern vielmehr die relative Veränderung in den Proteinmengen. Zur Quantifizierung von Proteinen und Peptiden kommen diverse Techniken zum Einsatz.

In der Differentiellen Gelelektrophorese (DIGE) werden zwei verschiedene Proben ("Krank" und "Gesund") mit je unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 oder Cy5) gelabelt (Unlü *et al.*, 1997). Diese beiden Farbstoffe greifen chemisch an Lysinresten, sowie am N-Terminus an. Vorteil der Farbstoffe ist, dass diese die chromatographischen Eigenschaften der markierten Proteine nicht verändern. Zwar sind beide Farbstoffe chemisch sehr ähnlich, doch unterscheiden sie sich in ihrem VIS-Spektrum. Während Cy3 die höchste Absorption bei 569 nm besitzt, zeigt Cy5 ein Absorptionsmaximum bei 645 nm. Die mit den Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proben werden zu gleichen Teilen vereinigt und in einem 2-D Gel aufgetrennt. Die DIGE-Technik minimiert weitestgehend die üblichen Gel-zu-Gel Variabilitäten, da bei diesem Ansatz, Dank der unterschiedlichen Absorptionsmaxima und dem Zusatz eines internen Standards (CY2) in einem einzigen Gel zwei unterschiedliche Proben miteinander verglichen werden können.

Neben diesem Gel-basierten Ansatz kommen noch viele andere Methoden zur Quantifizierung von Proteinen zum Einsatz. Findet die Analyse der Probe auf Peptidebene mittels chromatographischer Trennung und Fragmentierung der Peptide statt, so ist aus deren Signalintensitäten im Massenspektrometer keine quantitative Aussage direkt ableitbar. Deshalb müssen Proben für die mengenmäßige Erfassung der Proteinexpression vor ihrer massenspektrometrischen Analyse behandelt werden.

Bei SILAC wird die Proteinexpression zweier unterschiedlicher Zellkulturen miteinander verglichen (Ong *et al.*, 2002). Dabei erhält eine Population unmodifizierte Aminosäuren, während der anderen unnatürliche Aminosäuren, die schwere Isotope enthalten, angeboten werden. Zwar synthetisieren beide Populationen Proteine mit der identischen Primärstruktur, doch unterscheiden sich diese in einem Massenshift und können somit im MS auf Peptidebene differentiell erfasst werden.

Bei ICAT findet die Markierung der Probe auf Peptidebene statt (Gygi *et al.*, 1999). Vorteil dieser Methode gegenüber SILAC ist die direkte Markierung der Analyten ohne aufwendige

Zellkultur. Quantitative Aussagen sind schon direkt aus den Signalintensitäten im MS¹ möglich, da untersuchte Peptidpaare sich um genau 8 Da in ihrer Gesamtmasse unterscheiden.

In den letzten Jahren wurde für die Quantifizierung von Proteinproben vermehrt die iTRAQ-Technologie eingesetzt (DeSouza *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu ICAT findet die mengenmäßige Analyse der Proteinexpression nicht im MS¹ sondern im MS/MS statt. Bei dieser Technik werden Lysinreste, sowie der N-terminus mit unterschiedlichen Labeling-Reagenzien markiert. Diese besitzen zwar alle dieselbe Nominalmasse, allerdings unterscheiden sie sich in ihrer Zusammensetzung bezüglich verschiedener Isotope. Somit ergeben gelabelte Peptide unterschiedliche Fragmentionen, von deren Intensitäten direkt auf die relative Menge geschlossen werden kann. Vorteile der unterschiedlichen Reporterionen, die für die Quantifizierung herangezogen werden, liegen zum einen in deren geringen Masse im Bereich von 100-200 Da, welche sensitiv bestimmt werden kann, sowie in der Tatsache, dass in diesem Massenbereich ausser Immoniumionen keine Analytsignale zu erwarten sind.

1.6 Analysetechniken für die Charakterisierung von Phosphoproteinen

Die Analyse von Phosphoproteinen bzw. die exakte Bestimmung der Phosphorylierungsstelle eines Proteins hat einen enormen Schub durch den Einsatz der "weichen" Ionisierungstechniken MALDI und ESI bekommen. Moderne Biomassenspektrometrie ist die wichtigste und wahrscheinlich auch erfolgreichste Technik zur Charakterisierung von phosphorylierten Proteinen. Nichtsdestotrotz kommen neben der MS noch andere zahlreiche Verfahren bei der Analyse von Phosphoproteinen zum Einsatz. Jede dieser diversen Techniken hat ihre Vorzüge, aber auch Limitierungen. Die Aussagekraft sowie der Erkenntnisgewinn durch jedes einzelne Verfahren für sich betrachtet ist oftmals unzureichend, was eine Kombination meist mehrerer Methoden bei der Analyse von phosphorylierten Proteinen für eine allumfassende, aussagekräftige Charakterisierung des Analyten notwendig macht. Im folgenden Abschnitt sollen Vor- und Nachteile dieser mannigfaltigen Analysemethoden erörtert werden, um zum einen den derzeitigen Stand der Technik zu durchleuchten, und zum anderen die Notwendigkeit der Entwicklung von neuen Werkzeugen für die Phosphoproteomics zu verdeutlichen.

1.6.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-SDS-PAGE)

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die aufgetragenen Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. In der zweiten Dimension erfolgt dann eine weitere Separierung über die Größe der Proteine (O'Farrell *et al.*, 1975). Um nun Aussagen über veränderte Proteinexpressionen und deren Modifikationen treffen zu können, werden häufig zwei Zellysatsproben je einer 2-D-SDS-PAGE unterzogen. Die erhaltenen korrespondierenden Gele werden dann miteinander verglichen. Der Vorteil der 2-D-SDS-PAGE ist darin begründet, dass sie in der Lage ist, einige Tausend Proteine zu separieren (Kristensen *et al.*, 2000), inklusive Proteinvarianten, die durch Sulfatierung, Glykosylierung und Phosphorylierung und anderen posttranslationalen Modifikationen entstanden sind (Guy *et al.*, 1994). Wird ein Protein mit einem Phosphatrest modifiziert, so sinkt der isoelektrische Punkt des Proteins, so dass in der Folge auch die Lage des entsprechenden Proteins auf dem Gel verändert ist. Man nutzt das unterschiedliche Laufverhalten von phosphorylierten Protein zu seinem unphosphorylierten Pendant, um den Phosphorylierungsstatus zweier verschiedener Proben zu vergleichen. Obwohl diese Methode in relativ kurzer Zeit einen guten Überblick über die detektierbaren Proteine verschafft, so hat die Technik aber ihre Grenzen. Da der dynamische Bereich zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine mit gängigen Färbemethoden begrenzt ist, können schwach exprimierte und substöchiometrisch modifizierte Proteinvarianten nicht sichtbar gemacht werden, so dass sich diese einer weiteren analytischen Untersuchung entziehen (Gygi *et al.*, 1999). Desweiteren können in der 2-D-SDS-PAGE normalerweise nur Proteine zwischen 10 kDa und 100 kDa aufgetrennt werden. Membranproteine sind gänzlich unterrepräsentiert bzw. analytisch nicht erfassbar, da Membranprotein mit einem GRAVY-Score $> 0,4$ nicht mehr in die zweite Dimension überführt werden können (Santoni *et al.*, 2000). Die 2-D-SDS-PAGE kann also als Technik sehr gut eingesetzt werden, um einen Überblick zu verschaffen und um veränderte Proteinmuster zu liefern. Zur Identifikation und Charakterisierung von Phosphoproteinen kann sie nur als Ausgangspunkt betrachtet werden.

1.6.2 Phosphoselektive Färbemethoden

Seit den 70-er Jahren des 20. Jahrhunderts gibt es Bestrebungen, Phosphoproteine selektiv im 1-D bzw. 2-D Gel zu detektieren (Cutting 1984). Diese Methodik fand jedoch keine weite

Verbreitung, da es den eingesetzten Reagenzien an nötiger Spezifität und Sensitivität fehlte. Patton und Kollegen synthetisierten kürzlich (Schulenberg *et al.*, 2003) den Fluoreszenzfarbstoff Pro-Q Diamond. Dieser Farbstoff zeichnet sich durch eine hohe Selektivität zu phosphorylierten Proteinen in 1-D und 2-D Gelen aus, wohingegen unphosphorylierte Proteine nicht detektiert werden. Großer Vorteil von Pro-Q Diamond ist die Kompatibilität mit anderen Proteinfarbstoffen, wie SYPRO Ruby. Kombiniert man die beiden Färbemethoden, so lässt sich auf einem einzigen Gel mit Pro-Q Diamond phosphorylierte Proteine visualisieren, während das eingesetzte SYPRO Ruby sämtliche Proteine detektiert. So ist es nun möglich, über die verschiedenen Phosphorylierungsstadien Aussagen zu machen. Ist ein Protein zu einem hohen Prozentsatz phosphoryliert, dann ist das Signal für das unphosphorylierte Protein schwach; umgekehrt würde ein schwacher Spot von einem substöchiometrisch phosphorylierten Protein ein starkes Signal bei der Färbung mit SYPRO Ruby für den unphosphorylierten Partner liefern (Steinberg *et al.*, 2003). Für Pro-Q Diamond ist ein Detektionslimit im Bereich von ng/mL beschrieben. Auch wenn dies eine deutliche Verbesserung zu früheren phosphospezifischen Farbstoffen darstellt, so reicht die erreichbare Sensitivität mit den derzeitigen Protokollen nicht für eine umfassende Phosphoproteomanalyse mit substöchiometrisch exprimierten Phosphoproteinen aus.

1.6.3 Einsatz von dephosphorylierenden Proteinphosphatasen:

Addition einer Phosphatgruppe an ein Protein verändert die physiko-chemischen Eigenschaften des Proteins und führt deshalb zu einem veränderten Laufverhalten während der Gelelektrophorese gegenüber dem nicht posttranslational modifizierten Protein (Raggiaschi *et al.*, 2006). Genau dieses Verhalten macht man sich zu Nutze und behandelt eine Probe mit alkalischer Phosphatase und ermittelt Phosphoproteine durch ihre veränderte Position im Gel. Die eingesetzte Alkalische Phosphatase spaltet im alkalischen Milieu Phosphatgruppen enzymatisch von Phosphoserin-, Phosphothreonin- und Phosphotyrosinresten. Mit Hilfe der Differentiellen Gelelektrophorese (DIGE) können auf demselben Gel die unbehandelte Probe und mit Phosphatase behandelten Proteine gleichzeitig detektiert werden. Da beim Einsatz der DIGE Gel-zu-Gel Variabilitäten nicht auftreten, kann man sehr elegant die Änderung im Proteinmuster zweier Subproteome auf einem Gel vergleichen.

1.6.4 Isotopenlabeling

Das Markieren von Proteinen mit radioaktivem ^{32}P ist ein immer noch häufig eingesetztes Verfahren bei der Untersuchung von phosphorylierten Proteinen (Wettenhall *et al.*, 1991). Bei diesem Verfahren wird das ^{32}P in Form von anorganischem Phosphat als Substrat *in vivo* und *in vitro* an potentielle Phosphorylierungsstellen addiert. Sichtbar gemacht werden markierte Proteine nach 1-D oder 2-D Gelelektrophorese meist mittels Autoradiographie.

Bei *in vivo* Phosphoproteomstudien wird den Zellen ^{32}P -Phosphat verabreicht. Nach einer gewissen Inkubationszeit werden die Zellen lysiert und analysiert. Die *in vivo* Untersuchungen der Phosphorylierung mit radioaktiv markiertem Phosphat enthüllt die tatsächlich in der lebenden Zelle vorkommenden Phosphorylierungsstellen und birgt nicht die Gefahr der unspezifischen Phosphorylierung, die in *in vitro* Versuchen auftreten können. Der *in vivo* Ansatz hat aber auch seine Tücken; so ist der Einbau an ^{32}P aufgrund der üblicherweise hohen endogenen nicht markierten ATP-Konzentration nicht sehr effizient. In der sich anschließenden Autoradiographie wird zwar eine Vielzahl von phosphorylierten Proteinen visualisiert, allerdings sind ihre Konzentrationen so gering, dass eine Identifizierung mittels MS oftmals nicht möglich ist.

Das oben erläuterte Quantitätsproblem versucht man mit einem *in vitro* Verfahren zu umgehen. Hierbei werden verschiedene phosphorylierende Proteinkinasen eingesetzt, und man untersucht welche Substrate das hinzugegebene ^{32}P eingebaut haben (Gatti 2003). Beim Profiling mit Proteinkinasen *in vitro* ist theoretisch eine Phosphorylierungsrate von 100 % erreichbar, womit wesentlich mehr Material generiert wird, welches leichter einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden kann. Ergebnisse aus *in vitro* Radiolabeling-Experimenten sind immer mit Vorsicht zu betrachten. Es kann durchaus sein, dass gefundene Phosphorylierungsstellen in der lebenden Zelle *in vivo* gar nicht auftauchen, so dass solche Befunde gegebenenfalls durch *in vivo* Phosphorylierungsstudien untermauert werden sollten.

1.6.5 Immunoblotting

Grundvoraussetzung für Immuno- und Westernblots (Towbin *et al.*, 1979) ist das Vorhandensein eines spezifischen Antikörpers für Proteine, die nach einer 1-D oder 2-D

Gelelektrophorese auf eine Membranmatrix übertragen wurden. Epitope von Proteinen können relativ spezifisch von Antikörpern erkannt werden. So wäre es denkbar, die Phosphatgruppe als ein gemeinsames Epitop für Phosphoproteine auszuwählen und Antikörper herzustellen, die selektiv phosphorylierte Proteine erkennen. Leider existiert kein Antikörper, der spezifisch Phosphoserine, Phosphothreonine und Phosphotyrosine anreichert. Alle drei Phosphorylierungstypen können also nicht gleichzeitig durch einen einzigen Antikörper erfasst werden. Deshalb kommt häufig ein Antikörper-Cocktail zum Einsatz, der verschiedene Antikörper enthält und somit alle drei Phosphorylierungsspezies erkennen kann. Gleichwohl ist ein selektiver Antikörper nur für Phosphotyrosin-modifizierte Proteine erhältlich, während für Phosphoserin- und Phosphothreoninphosphorylierungen noch spezifische Antikörper in der Entwicklung sind. Dieser Umstand erklärt auch, warum bis dato wesentlich mehr Phosphotyrosin-Modifikationen untersucht worden sind, als die anderen beiden Phosphorylierungsmodifikationen, obwohl diese in der Natur viel häufiger auftreten (Immler *et al.*, 2000). Damit ist ersichtlich, warum für eine allumfassende Analyse aller drei Phosphorylierungstypen die Immunoblotting-Technik nicht geeignet ist. Neben dem Problem der Spezifität ist natürlich das Bestimmen und Verifizieren einer exakten Phosphorylierungsstelle alleine mit dieser Methode nicht möglich, so dass sie nur komplementär und unterstützend mit anderen Analysetechniken kombiniert werden sollte.

1.6.6 Chemische Derivatisierung/Affinity-Tagging:

Innerhalb eines Peptidgemisches stellt die Phosphatgruppe von phosphorylierten Peptiden eine interessante, chemisch reaktive Gruppe dar. Im Folgenden sollen verschiedene Ansätze vorgestellt und diskutiert werden, die die gezielte chemische Modifizierung des Phosphatrestes nutzt, um Phosphopeptide aus einem komplexen Peptidgemisch in einem sich anschließenden Aufreinigungsschritt anzureichern.

2001 stellten Chait und Kollegen ein Verfahren vor, bei dem nach proteolytischem Verdau der Probe vorhandene Phosphatgruppen von Phosphoserin und Phosphothreoninresten in einer β -Elimination durch Einwirken von starken Laugen reagieren (Oda *et al.*, 2001). Die nach chemischer Modifikation mit Mercaptoethanol entstandenen Dehydroalanin- bzw. Dehydroaminobuttersäurereste können in der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) detektiert werden (Jaffe *et al.*, 1998). Mit derselben Strategie können Strukturelemente mit Biotin eingebaut werden. Es folgt dann eine klassische Affinitätsaufreinigung über die

bekannte Biotin/Streptavidin-Interaktion. Das Mercaptoethanol dient hier als Nukleophil, welches eine reaktive Thiolgruppe anbietet, an die der Biotinrest chemisch angreifen kann. Die starke Interaktion von Biotin mit Streptavidin dient anschließend als Grundlage für eine klassische Affinitätsaufreinigung der chemisch modifizierten Peptide, die vorher eine Phosphatgruppe getragen haben. Bei all den genannten Derivatisierungsansätzen ist immer mit unspezifischen Nebenreaktionen zu rechnen, was die anschließende Analyse per MS wesentlich erschwert. So können reaktive Cysteine oder Methionine an entsprechenden Seitenketten auch chemisch reagieren.

Die bisher erwähnten Derivatisierungsmethoden erfassen aber nur zwei der möglichen drei Phosphorylierungstypen, d.h. Phosphotyrosin modifizierte Peptide werden nicht modifiziert. In einem veränderten Ansatz wird Cystamin an die Phosphatgruppe addiert, welche dann eine Affinitätsaufreinigung der Phosphopeptide an Glas *Beads*, die immobilisierte Iodacetylgruppen tragen, ermöglichen. Elution der Phosphopeptide erfolgt mit Trifluoressigsäure, die die Phosphoramidatbindungen spaltet (Jaffe *et al.*, 1998).

Für alle genannten Derivatisierungsstrategien ist anzumerken, dass sie alle nicht selektiv auf die Phosphatgruppe beschränkt sind. Neben dem Problem der Seitenkettenreaktionen konnte bisher nicht gezeigt werden, dass auch mit geringen Mengen Protein erfolgreiche Analysen nach Derivatisierung möglich sind.

1.6.7 Edmansequenzierung mit ^{32}P markierten Proteinen:

Die benötigte Menge an mit ^{32}P markiertem Protein liegt im Bereich von 10-50 pmol. Ist der Umstand gegeben, dass man eine solch hohe Probenmenge hat, wird diese zunächst mit einer Protease enzymatisch in Peptidfragmente gespalten. Das erhaltene Peptidgemisch bestehend aus nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Peptiden wird über eine HPLC aufgetrennt. Über die C-Termini werden die Peptide an eine inerte Membran gecrosslinkt. Die radioaktive Matrixmembran wird dann der eigentlichen Edmansequenzierung zugeführt, bei der man nach jedem Zyklus die Radioaktivität misst und so die Phosphorylierungsstelle anhand eines Ausschlages am Szintillationszähler erkennt. Aufgrund des sehr hohen Probenbedarfs, der Arbeit mit Radioaktivität und dem doch sehr langwierigen Prozess der Sequenzierung, ist mit dieser Methode kein Hochdurchsatz für die Phosphoproteomanalyse möglich.

1.6.8 Mutationsanalyse:

Vermutete und experimentell ermittelte Phosphorylierungsstellen können anhand einer Mutationsanalyse bestätigt werden. Hierbei wird die vermutete Aminosäure, die phosphoryliert ist, durch eine andere Aminosäure, welche nicht phosphoryliert ist, ersetzt. Die Expression des durch Punktmutation veränderten Proteins geschieht meist in *E. coli* Zellkulturen. Grundvoraussetzung für diese Methode ist die Vermutung, dass die Faltung des mutierten Proteins sich nicht von dem phosphorylierten Protein unterscheidet. Vergleicht man beide Proteine in Bioassays auf ihre biochemische Funktion, so können Schlüsse gezogen werden, ob gerade diese spekulative Phosphorylierungsstelle für eine eventuell veränderte Zellantwort verantwortlich ist (Toroser *et al.*, 1999). Auch wenn die Mutationsanalyse gerade im Bereich der funktionellen Biochemie häufig eingesetzt wird, so ist ihre Anwendung aufgrund des zeitlichen Aufwandes nicht anwendbar für die Bestimmung von unbekanntem Phosphorylierungsstellen.

1.7 Massenspektrometrie in der Phosphorylierungsanalyse:

Mit diversen Fragmentierungstechniken (MS/MS) können massenspektrometrisch eindeutig Phosphorylierungsstellen exakt ermittelt werden. Mit modernen Massenspektrometern werden vornehmlich zwei Scanningmethoden eingesetzt, die oft automatisiert durchgeführt werden können.

1.7.1 Precursor Ion Scanning:

Im CID (*collision induced dissociation*) liefern Phosphopeptide neben sequenzspezifischen Fragmenten auch phosphatgruppenspezifische Fragmente. Diese phosphatspezifischen Fragmentationen dienen als sogenannte "Reporter-Ionen" für phosphorylierte Peptide in *Precursor Ion Scanning* Ansätzen mittels MS/MS (Wilm *et al.*, 1986). Im Negativmodus betrieben, liefern Phosphopeptide Markerionen bei m/z 79 (PO_3^-) und m/z 63 (PO_2^-). Werden Phosphothreonin- und Phosphoserinpeptide einer CID unterzogen, so ist im Positivmodus meist der charakteristische Neutralverlust (H_3PO_4) über eine β -Elimination zu beobachten. Im MS/MS ist häufig der Neutralverlust mit m/z 98 für einfachgeladene und m/z 49 für

doppeltgeladene Precursor zu detektieren, der auch meist die höchste Signalintensität aller Fragmente aufweist. Im Gegensatz zu Phosphothreonin- und Phosphoserinpeptiden ist bei Phosphopeptiden, die an einem Tyrosin phosphoryliert sind, keine β -Elimination im MS/MS detektierbar. Phosphotyrosinpeptide geben allerdings ein charakteristisches Immoniumion bei m/z 216. Mehrere Gruppen haben dieses Immoniumion als Signalfragment für die Detektion von Phosphotyrosinpeptiden benutzt (Roepstorff *et al.*, 1984; Hoffmann *et al.*, 1995). Einschränkend muss aber angemerkt werden, dass bei diesem Ansatz ein Massenspektrometer mit einer hohen Auflösung (z.B. mit Hilfe einer Orbitrap) benutzt werden muss, da auch andere a,b und y-Ionen ebenfalls Signale bei 216 m/z liefern können. Wenn im Negativmodus gescannt wird, so hält man nach 79 Da Fragmenten Ausschau, die spezifisch für Phosphothreonin- und Phosphoserinpeptide sind (Ding *et al.*, 2006). Bei diesem Ansatz wird meist ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im Negativmodus eingesetzt. Die detektierten Reporterionen dienen zur Identifizierung des entsprechenden Precursors des Phosphopeptids. So fallen im *Precursor Ion Scan* alle Peptide heraus, die keinen 79 Da Verlust zeigen. In einem zweiten Schritt werden nach Wechsel in den Positivmodus nur noch die Peptide mit charakteristischem PO_3^- -Verlust einer MS/MS Untersuchung unterzogen, um Sequenzinformation zu bekommen und die exakte Phosphorylierungsstelle zu bestimmen.

1.7.2 *Neutral Loss Scanning*

Phosphoserin- und Phosphothreoninpeptide zeigen im MS/MS durch β -Elimination in der Gasphase einen Neutralverlust von 98 Da (H_3PO_4) bzw. werden dephosphoryliert, erkenntlich als 80 Da Verlust (HPO_3). *Neutral Loss Scanning* wird meist auf einem Triple-Quadrupol-Instrument durchgeführt, da dieses eine hohe Scan-Geschwindigkeit erlaubt. In den erhaltenen MS/MS-Spektren gibt ein Abstand von 69 Da (für das Dehydroalanin) oder 83 Da (Dehydroaminobuttersäure) die exakte Phosphorylierungsstelle an. Die Gefahr, falschpositive Ergebnisse zu akkumulieren und die Tatsache, dass der Ladungszustand des Precursors vorher bekannt sein müssen sind die größten Limitierungen dieser Methode.

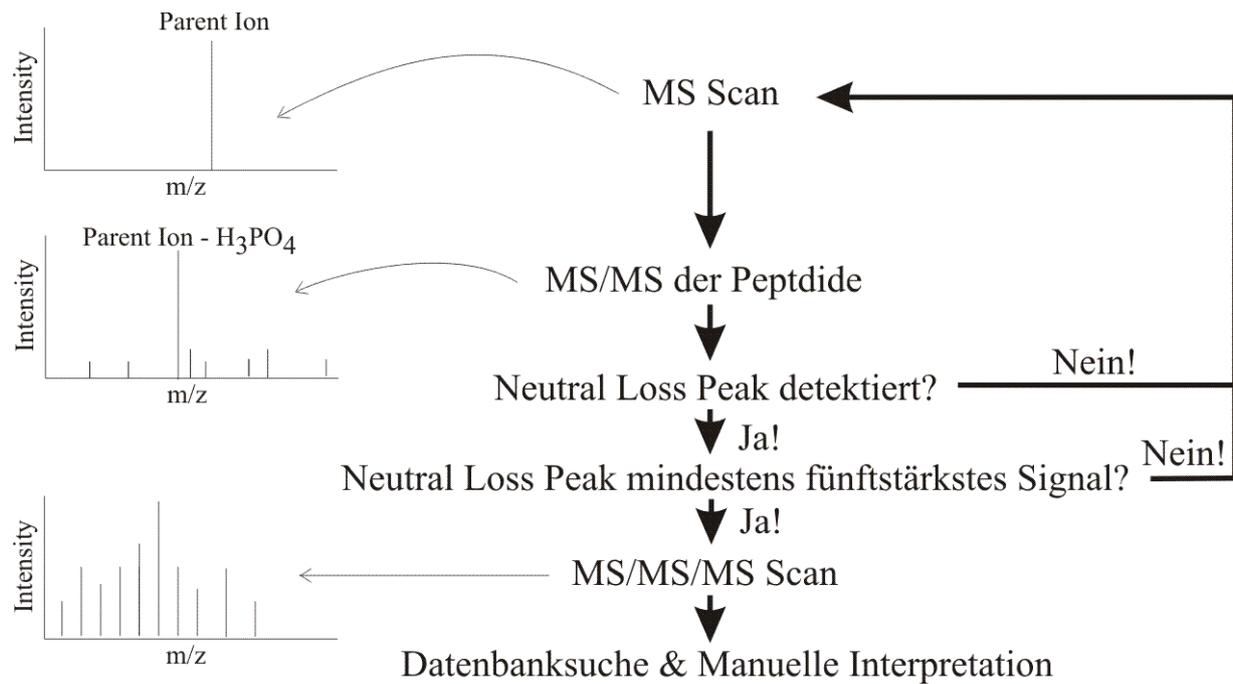


Abb. 1.8: Schematische Darstellung eines auf Neutral Loss Scan mittels CID basierenden Methode zur Analyse von phosphorylierten Peptiden

1.7.3 Weitere Entwicklungen

Obwohl Edmansequenzierung und MS/MS mit CID heute zumeist eingesetzt werden für Bestimmung der Phosphorylierungsstelle, so gibt es noch diverse andere vor allem MS-basierte Ansätze, die in der Entwicklung sind und neue analytische Perspektiven bieten können.

Alternativ zu den vorher genannten Ansätzen, die sich über viele Experimentierstufen und -methoden erstrecken, gibt es Bestrebungen, die Analyse mit nur einem datenabhängigen LC-MS Experiment durchzuführen. Die LC dient zur Reduktion der Komplexität der Probe. Häufig wird eine zweidimensionale Separierung favorisiert. Zuerst wird in der ersten Dimension über einen starken Kationenaustauscher (*strong cation exchange* SCX) separiert, gefolgt von einer Auftrennung per C18-Säule (Shi et al 2001). Identifiziert werden die Phosphopeptide über *Precursor Ion Scan* oder *Neutral Loss Scan*. Die sich daraufhin anschließenden MS/MS Experimente liefern Fragmentationenspektren für die Bestimmung der Phosphorylierungsstelle. Die vorangehende LC erleichtert wesentlich die massenspektrometrische Analyse der Phosphopeptide, da sie die meist komplexe Probe stark auftrennt, so dass die Supprimierung von Phosphopeptiden durch nicht phosphorylierte Peptide mit ähnlichen m/z -Werten weitestgehend verhindert wird.

Zunehmend werden die neuen Fragmentierungstechniken ETD (*electron transfer dissociation*) (Molina *et al.*, 2007) und ECD (*electron capture dissociation*) (Stensballe *et al.*, 2000; Chalmers *et al.*, 2004) zur Phosphoproteinanalyse eingesetzt. Da es sich bei diesen Fragmentierungstechniken um schonendere Fragmentierungstechniken als CID handelt, ist die exakte Bestimmung zu einer Aminosäure leichter, da nicht der alles dominierende Neutralverlust-Fragment die restlichen Fragmente überschattet; d.h. es sind mehr sequenzspezifische Fragmente, bzw. Ionenserien zu detektieren. Wobei hier im Gegensatz zum CID, nicht y- und b-Ionenserien auftreten, sondern vor allem c- und z-Ionenserien beobachtet werden.

1.8 Methoden zur Anreicherung von Phosphopeptiden

1.8.1 Befüllte Pipettenspitzen

Ziel des Einsatzes von Affinitätschromatographischen Methoden auf dem Gebiet der Analyse von Phosphopeptiden ist die selektive Anreicherung von phosphorylierten Peptiden in Anwesenheit von nicht-phosphorylierten Peptiden. Meist findet die Aufreinigung eines Phosphoproteinverdau im Mikromaßstab statt. Eingebettet in die Spitze einer Pipettenspitze (meist ein Gelloadertip) befindet sich das Affinitätsmedium, welches mehr oder weniger stark eine Affinität zu Phosphopeptiden aufweist, während es sich unphosphorylierten Peptiden gegenüber indifferent verhält. Allen Methoden ist gemeinsam, dass eine Aufreinigung aus drei wesentlichen Schritten besteht: Inkubation, Waschschrift, und Elution des Analyten. Der Erfolg einer Anreicherung von Phosphopeptiden aus einem Phosphoproteinverdau ist von verschiedenen Kriterien abhängig. Zu allererst bestimmt die Stärke der Affinität des in der Spitze immobilisierten Chromatographiematerials zum Analyten den Ausgang der Aufreinigung. Eine starke Bindung ermöglicht ein stringentes Waschen zum Entfernen von störenden Fremdstoffen und unphosphorylierten Peptiden. Eine zu schwache Bindung limitiert die Auswahl der Waschlösung bezüglich ihrem Anteil an organischem Lösemittel und pH-Wert. Gerade hier besteht die Gefahr, dass bei zu stringenten Waschschriften neben den unerwünschten unphosphorylierten Peptiden auch anzureichernde Analyten nicht vom Affinitätsmedium zurückgehalten werden, so dass hierdurch ein erhöhter Probenbedarf besteht bzw. im Eluat neben Phosphopeptiden auch unmodifizierte Peptide detektierbar sind, welche die MS-Analyse komplizierter machen.

In mehreren Publikationen berichtete die Arbeitsgruppe um Roepstorff (Gobom *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2004) über den Einsatz von Graphit in Spitzen von Gelloadertips. Ziel der Untersuchung war die Aufreinigung von Peptidgemischen nach einem proteolytischen Verdau, welche typischerweise viel Puffersubstanzen, Salze und andere Verunreinigungen enthalten, welche zu nur unzureichenden Signalen im MALDI-TOF durch Supprimierung bzw. Adduktbildung führen würden. Graphit zeigte die ausgeprägte Fähigkeit, insbesondere kleine Peptide (ca. 800 Da - 1200 Da) aufzureinigen, die sich durch eine relativ hohe Hydrophilie auszeichnen. Diese Beobachtung machten die Autoren an unmodifizierten Proteinen. Durch Applikation dieses Affinitätsmediums auf ein phosphoryliertes Protein stellte sich heraus, dass Graphit auch in der Lage ist, Phosphopeptide aus einem Peptidgemisch anzureichern. Die Addition einer Phosphatgruppe an eine Aminosäure macht das

entsprechende Peptid hydrophiler als die meisten unmodifizierten Peptide, was die höhere Affinität von Phosphopeptiden im Gegensatz zu unphosphorylierten Peptiden erklärt.

Für die Anreicherung von verdauten Phosphoproteinen findet die IMAC-Technik weite Verbreitung. IMAC steht hier für *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*. Sie wurde erstmals von Anderson und Kollegen (Porath *et al.*, 1986) vorgestellt. Man macht sich bei dieser Methode die starke Interaktion von mehrwertigen Kationen, welche mit Hilfe von Chelatoren an *Beads* immobilisiert werden, mit der Phosphatgruppe zu nutze. Eine Vielzahl von Phosphoproteomstudien (Neville *et al.*, 1997; Posewitz *et al.*, 1999; Ficarro *et al.*, 2002) wurde mit Hilfe dieser Technik durchgeführt. Ein Hauptnachteil des Einsatzes von IMAC-*Beads* ist die Tatsache, dass neben Phosphopeptiden auch saure, nicht-phosphorylierte Peptide binden. Um dieses Problem zu umgehen, können saure Carboxylgruppen von Glutaminsäuren, Asparaginsäuren und des C-Terminus über Veresterungen mit einer Methylgruppe hydrophober gemacht werden (Ficarro *et al.*, 2002; Haydon *et al.*, 2003). Hierdurch wird eine signifikante Reduktion der Bindung von sauren, unphosphorylierten Peptiden erreicht, wodurch das Eluat merklich an Komplexität verliert, was die weitere Analyse wesentlich vereinfacht. Da es sich hierbei um eine chemische Modifizierung handelt, treten sämtliche Probleme auf, die man bei einer Derivatisierung erwartet; so ist die Umwandlung der Carboxylgruppen weder quantitativ noch können ungewollte Seitenreaktionen verhindert werden. Deshalb hat das Prinzip der Methylierung von sauren Peptiden sich bis heute nicht durchgesetzt.

Getrieben von dem Problem der ungewollten Bindung von sauren, nicht-phosphorylierten Peptiden wurde nach neuen, höher-affinen Chromatographiemedien gesucht. Eine mögliche Antwort hierauf war die Einführung von TiO₂ (Ikeguchi *et al.*, 1997; Sano *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006). Dieses Material sollte eine stärkere Bindung zu Phosphopeptiden haben als IMAC. Dadurch sollte das Problem der unspezifischen Bindung, wie bei IMAC-*Beads* beobachtet, komplett umgangen werden. Die höhere Affinität ermöglicht ein stringenteres Waschen und minimiert die Wahrscheinlichkeit, dass man im Eluat neben Phosphopeptiden auch unphosphorylierte Peptide findet. Leider stellte man nach der ersten Euphorie fest, dass auch das Titandioxid nicht immun gegen saure Peptide ist. Larsen *et al.*, (2005) zeigten, dass man durch eine Modifikation bei der Beladung mit Probe wesentlich weniger unspezifische Bindungen erhält. Durch Zugabe von DHB in die Probe und anschließende Inkubation in der Pipettenspitze konnte eine merkliche Reduktion an unspezifischer Bindung festgestellt werden. Leider konnte bis heute nicht gezeigt werden, dass TiO₂-Tips in der Lage sind, auch

im niedrigen Femtomolbereich erfolgreich Phosphopeptide anzureichern.

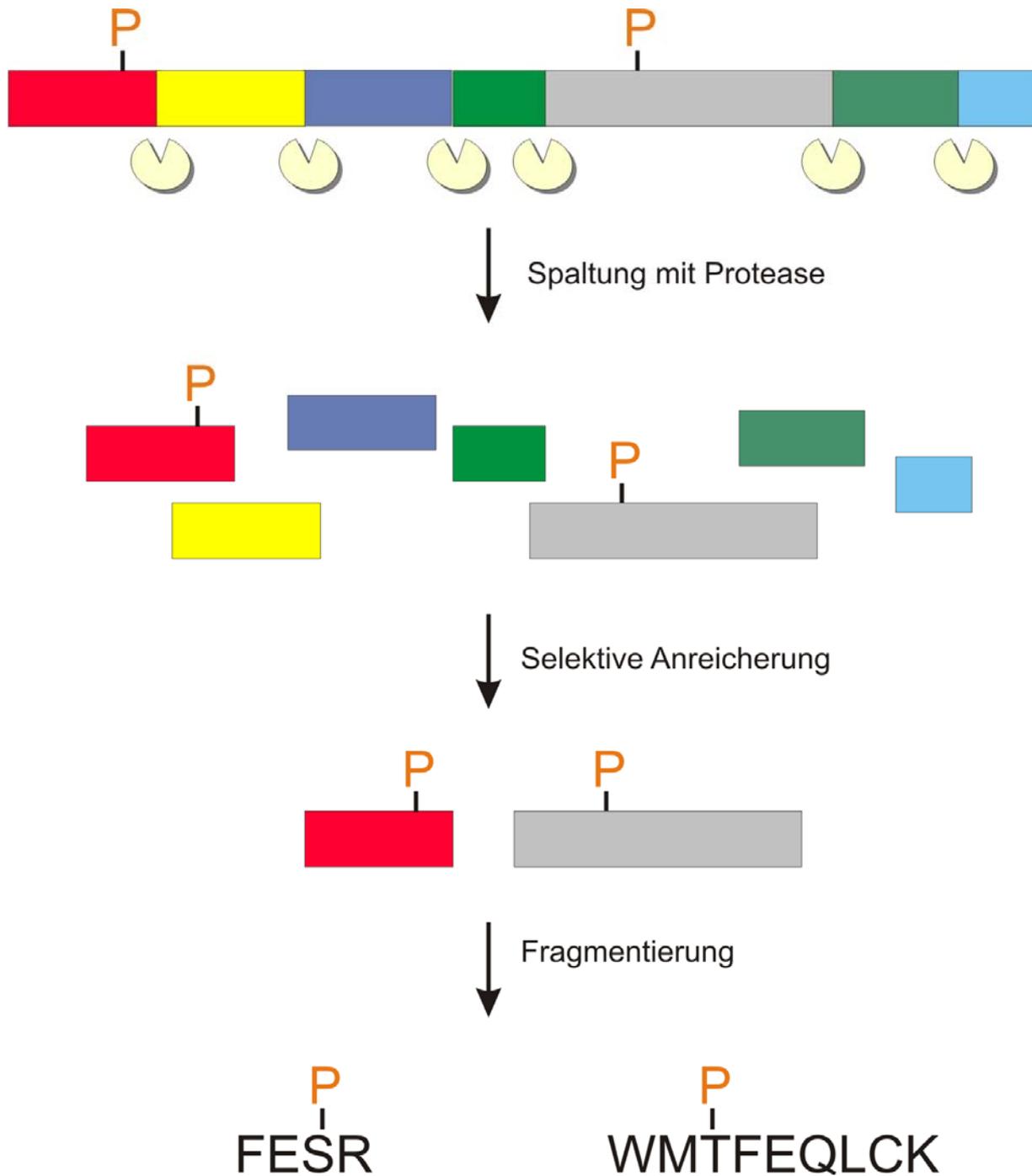


Abb. 1.9: Strategisches Vorgehen bei der Analyse der Proteinphosphorylierung mit Affinitätsanreicherung. Ausgangspunkt der Untersuchung ist der proteolytische Verdau des phosphorylierten Proteins. Im obigen Schema besitzt das Modellprotein zwei Phosphorylierungsstellen. Das erhaltene Peptidgemisch besteht aus den beiden Phosphopeptiden, sowie diversen anderen unphosphorylierten Peptiden. Anreicherung der phosphorylierten Peptide geschieht durch Affinitätschromatographie mit diversen Medien, wie etwa IMAC-Beads oder TiO_2 . Die aufgereinigten Analyten werden im Massenspektrometer fragmentiert. Die resultierenden Ionenserien ermöglichen die exakte Zuordnung der Phosphatgruppe zu einer bestimmten Aminosäure; im obigen Beispiel wären das die Aminosäuren Serin und Threonin.

1.8.2 Modifizierte Oberflächen für die Anreicherung von Phosphopeptiden

Neben den bisher beschriebenen Methoden, bei denen Affinitätsmedien sich am Ende einer Pipettenspitze befindet, gibt es seit kurzer Zeit das Bestreben von den Gelloadertips wegzukommen, um die Aufreinigung auf einer planaren Oberfläche durchzuführen. Vorteile dieses Formates ist zum einen die Möglichkeit geringere Volumina und damit weniger Probe handhaben zu können, zum anderen können diese Oberfläche gleichzeitig direkt als MALDI-Probenteller eingesetzt werden. Damit könnten Aufreinigung und MALDI-MS Messung integriert auf derselben Plattform durchgeführt werden. Es gibt diverse Möglichkeiten, Oberflächen chemisch zu modifizieren. Im folgenden Unterabschnitt soll kurz auf die bestehenden Techniken zur Oberflächenmodifizierung eingegangen werden, wobei der Fokus auf *Self Assembled Monolayers* (SAM) liegen soll.

1.8.3 *Self assembled monolayers* (SAMs):

Self Assembled Monolayers werden durch Absorption von Molekülen aus der Gasphase oder einer Flüssigkeit an Grenzflächen durch nicht-kovalente Bindung gebildet. In Technik und Wissenschaft werden SAMs zumeist aus Alkylsiloxanen auf Glas, Fettsäuren auf Oxidoberflächen oder Alkanthiolen auf Gold gebildet. Im weiteren Verlauf soll im Detail auf die Bildung von SAMs durch Alkanthiole auf Goldoberflächen eingegangen werden, da diese am häufigsten eingesetzt werden und ein außerordentlich großes Anwendungsgebiet besitzen. SAMs werden u.a. eingesetzt für zur Immobilisierung von Proteinen und Enzymen, als Korrosionsschutz, zur molekularen Erkennung oder zur Ausrichtung von Flüssigkristallen. Die ersten künstlichen, sich selbst organisierenden Monoschichten werden William Zisman mit seiner Publikation aus dem Jahre 1946 zugeschrieben (Bigelow *et al.*, 1946). Das Grundprinzip von SAMs ist denkbar einfach: Die SH-Kopfgruppe mit hochaffinem Charakter zu Gold besitzt über eine Alkankette, welche als *Spacer* fungiert, eine funktionelle chemische Endgruppe, welche nach außen gerichtet ist. Die endständige Methylgruppe kann durch nahezu beliebige funktionelle Gruppen ersetzt werden (Faucheux *et al.*, 2004). Die chemische Modifizierung kann aber auch nachträglich an fertig ausgebildeten SAMs durchgeführt werden.

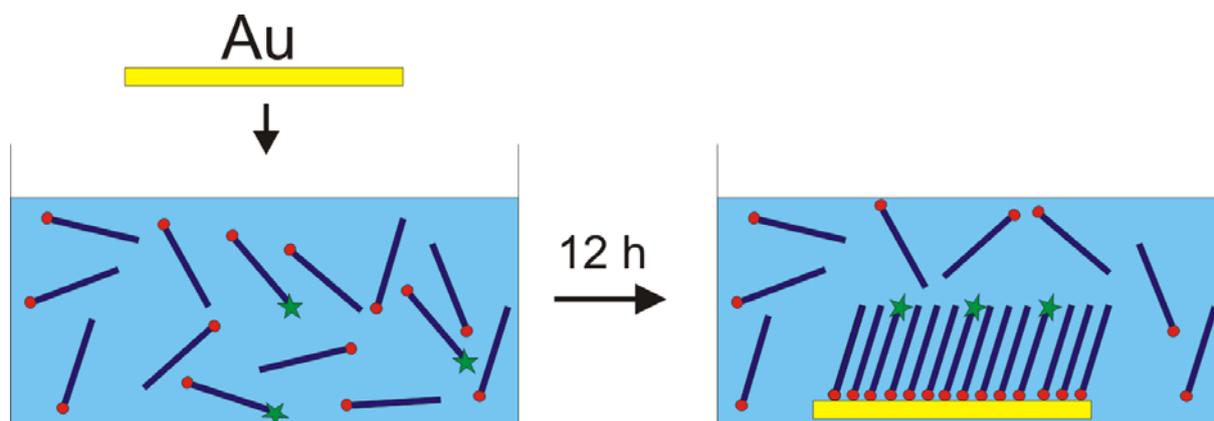


Abb. 1.10: Prinzip der SAM-Bildung auf Gold. In die Lösung bestehend aus einer Mischung zweier Thiolverbindungen bildet sich nach einer Inkubationszeit eine Monoschicht.

Dieses Verfahren wird sehr häufig gewählt, da eine Vielzahl von Alkanthiolen kommerziell erhältlich ist (s. 2.7.5). Häufig anzutreffen sind folgende Endgruppen: $-\text{CH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CF}_3$.

Die Bildung der SAMs geschieht in der Regel durch Inkubation des Goldsubstrates in einer meist in Ethanol gelösten Thiolverbindung. Auch wenn die Ausbildung der SAMs sehr schnell erfolgt, wird trotzdem im Sinne der Reproduzierbarkeit und der Ausbildung von perfekt intakten Monoschichten eine Inkubationszeit zwischen 12 und 72 Stunden gewählt. Das Interessante hierbei ist, dass selbst bei längerer Exposition des Goldes mit dem Thiolmolekül keine Mehrschichten zu beobachten sind. Zur Charakterisierung von SAMs kommt neben der IRAS (Infrarot-Absorptionsspektrometrie) vor allem die Ellipsometrie (Porter *et al.*, 1987) zum Einsatz. Bei SAMs mit Kettenlängen ab 10 Kohlenstoffatomen binden die Thiolgruppen primär an dreizähligen Furchen der Au(111)-Oberfläche, wobei sie bei diesem Prozess ein Proton verlieren, und ein $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ overlay bilden.

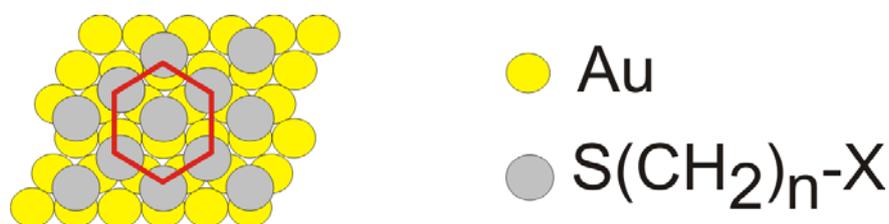


Abb. 1.11: Darstellung des Au(111)-Gitters mit der sich darüber befindlichen Thiolat-Schicht in $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ Anordnung. Der Abstand zwischen zwei Thiolaten beträgt $4,99 \text{ \AA}$.

Die hohe Stabilität der SAMs ist begründet durch die hohe Bindungsenergie der Gold-Thiolat-Bindung von 44 kcal/mol, welche noch verstärkt und stabilisiert wird durch die vorhandenen van-der-Waals-Kräfte, die zwischen den Alkylresten benachbarter Moleküle auftreten. Messungen mit der Ellipsometrie ergaben für eine SAM aus Hexadecanthiol eine Schichtdicke von 21 Å. Dieser Wert bestätigt die Neigung der Kette um 30 °, da bei Hexadecanthiol eine Moleküllänge von 24,4 Å prognostiziert ist. Neben der hier beschriebenen Technik der *Self Assembled Monolayers* gibt es noch diverse andere Methoden, die zur chemischen Modifizierung einer Oberfläche mit dem Ziel der Aufreinigung von Peptidgemischen im Allgemeinen und Phosphopeptiden im Speziellen Verwendung finden. Allen diesen Prinzipien ist gemeinsam, dass die MALDI-Messung und vorher erfolgte Anreicherung der Probe auf derselben Oberfläche geschieht.

Eine Möglichkeit der Dekontamination von mit Salzen verunreinigten Peptidgemischen kann durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen Analyt und einer C18-Phase geschehen, welche mit Hilfe einer SAM fabriziert wurde (Brockman *et al.*, 1997). Orlando und Mitarbeiter stellten SAMs mit ionischem Charakter her, welche über elektrostatische Wechselwirkungen Peptide von Verunreinigungen wie Triton X-100 und Urea befreien können (Warren *et al.*, 1998). Mehrere Gruppen immobilisierten auf *Self Assembled Monolayern* basierenden Techniken Chelatoren wie Iminodiessigsäure- (Xu *et al.*, 2006) oder Nitrilotriessigsäure-Derivate (Shen *et al.*, 2005), welche nach Beladung mit entsprechenden Metallkationen für die Anreicherung von Phosphopeptiden dienen. Neben der geforderten hohen Spezifität zeigten letztgenannte Techniken vor allem im Bereich der Sensitivität große Defizite.

1.9 Zielsetzung der Dissertation

In den Untersuchungen des ABRF (*Association of Biomolecular Resource Facilities*) aus dem Jahre 2003 (Arnott *et al.*, 2003) wurden Laboratorien und eingeladen, an einer groß angelegten Studie zur massenspektrometrischen Analyse von phosphorylierten Peptiden teilzunehmen. 106 Arbeitskreise erhielten verschiedene Proben, die sie mit frei wählbaren Analysemethoden und Instrumenten untersuchen sollten. Die an das ABRF zurückgesandten Ergebnisse der Arbeitsgruppen offenbarten zum einen sehr deutlich, dass nur sehr wenige Gruppen auf dem Gebiet der massenspektrometrischen Analyse der Proteinphosphorylierung arbeiteten und zum anderen, dass die bis dato eingesetzten und verfügbaren Techniken nicht den Ansprüchen und Anforderungen an eine sensitive und allumfassende Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen genügten.

Die Proben, die für diese Studie untersucht wurden, enthielten 2 nicht phosphorylierte Proteine (5 pmol und 200 fmol) sowie 2 Phosphopeptide zu je 1 pmol. Lediglich 3 von 54 Teilnehmern waren in der Lage, die Phosphorylierungsstellen beider Phosphopeptide zu bestimmen. Um die ernüchternden Ergebnisse dieser groß angelegten Studie darzustellen, soll ein Teil aus der Zusammenfassung dieser Publikation zitiert werden:

„...The relative lack of success using IMAC enrichment suggests that optimized and well-characterized procedures for this approach still are lacking or not sufficiently disseminated among the scientific community. False positive assignments of the component proteins and phosphopeptides suggest that explicit criteria for reliable identifications still are needed. A solution to the problem of dynamic range, that is, the analysis of minor components in mixtures, is needed as a matter of urgency as proteomics of blood plasma and other complex samples grows in importance. Such developments need to be instrument-independent to have the widest application. To this end, advances in the chemistry of selective enrichment on the femtomole scale is likely to be the most cost-effective way of achieving this goal.”

In genau diesen Kontext ist die hier vorliegende Dissertation einzuordnen. Aus dem o.g. Zitat aus der Untersuchung des ABRF ergab sich die Aufgabenstellung dieser Arbeit. Im Folgenden soll ein kurzer Abriss zu den Zielen dieser Dissertation gegeben werden.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden für die Analyse der Proteinphosphorylierung auf der Peptidebene. Anhand dieser Techniken sollte es möglich

sein, die massenspektrometrische Charakterisierung von substöchiometrisch unterrepräsentierten Phosphopeptiden in einem komplexen Peptidgemisch durchzuführen.

Aufgrund der im Bereich der Phosphoproteomics überaus großen Dynamik in der Entwicklung in den letzten Jahren, bestand ein Teil der vorliegenden Arbeit in der extensiven und kritischen Evaluierung der zu Beginn dieser Dissertation verfügbaren Analysetechniken. Ein Teilaspekt dieser Dissertation war die Untersuchung von bestehenden Anreicherungstechniken auf ihre Fähigkeit, Phosphopeptide aus realen komplexen Proben aufzureinigen zu können. Darüberhinaus sollten entsprechende Protokolle untersucht und durch Modifikationen so optimiert werden, dass für die jeweilige Methode die zufriedenstellendsten Ergebnisse ermöglicht werden konnten

Der Hauptfokus der Arbeit sollte in der Entwicklung und Etablierung einer neuartigen Technik zur Anreicherung von Phosphopeptiden aus komplexen Proben liegen.

Mit einer neuartigen, auf SAMs basierenden Oberfläche, sollte eine selektive und sensitive Methode erarbeitet werden, die den bestehenden Systemen bezüglich Spezifität und Sensitivität überlegen sein sollte und sich zudem durch eine einfache Handhabbarkeit auszeichnen sollte. Sie sollte so konzipiert sein, dass sie ohne größeren Aufwand in jedem Labor selbständig genutzt werden könnte.

Da die Wahl der geeigneten Matrix bei MALDI eine herausragende Stellung einnimmt, musste auch im Hinblick auf die Anwendung zur Phosphorylierungsanalyse eine geeignete Matrix (gegebenenfalls mit Zusätzen) gefunden werden. Für normale Proteomicsanwendungen hat sich CHCA weitestgehend als MALDI-Matrix etabliert und kann als Goldstandard bezeichnet werden. Bei ihrer Anwendung für Phosphopeptide zeigen sich allerdings etliche Nachteile, so dass auf diesem Gebiet auch Untersuchungen zur Matrix und dem Einfluss von verschiedenen Säurekomponenten auf die Ionisierbarkeit von phosphorylierten Peptiden durchgeführt wurden.

Im Bereich der Bioanalytik gilt neben der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen ein Hauptinteressere der Quantifizierung der Expression von Proteinen. Im Falle von Phosphoproteinen steht in diesem Zusammenhang die Frage nach dem Grad der Phosphorylierung im Vordergrund. Deshalb bestand ein Teilaspekt der Arbeit in der

Erarbeitung und Etablierung einer simplen und schnellen Methode zur Quantifizierung der Phosphorylierung von Proteinen.

2. Material und Methoden

2.1 In-Lösungs-Verdau

Standardproteine wurden in 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung in 600 µL Reaktionsgefäßen gelöst. Zur Reduzierung von Disulfidbrücken wurde den Proben je 10 µL 10 mM DTT hinzupipettiert und für 60 Minuten bei 56 °. Zum Schutz der reaktiven SH-Gruppen wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 10 µL 55 mM Iodacetamid-Lösung 30 Minuten lang im Dunkeln behandelt. Die Proteinlösungen wurden für 120 Minuten in der Vakuumzentrifuge bis zum vollständigen Eintrocknen belassen. Die entstandenen Pellets wurden in 100 µL 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung wiederaufgenommen. Trypsin-Lösung (0,1 µg/µL) wurde hinzugegeben, um ein Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:50 zu erhalten. Die Proben wurden 12 Stunden bei 37 °C verdaut. Zum Beenden des Verdaus wurde 0,1 % TFA hinzugegeben, um den pH-Wert auf 2,5 abzusenken. Die Proben wurden aliquotiert und bis zur weiteren Bearbeitung im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Nach Auftauen wurden sie je nach Analyse mit dem entsprechenden Lösemittel auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt.

2.2 Entsalzung mit Zip-Tips

Das in Pipettenspitzen befindliche C18 *Reversed-Phase* Chromatographiematerial in ZipTips wurde für die Entsalzung von Peptidlösungen verwendet, da diese viele Puffersubstanzen als Verunreinigungen enthalten und die MS-Analyse erschweren. Durch mehrmaliges hoch und runter Pipettieren werden die Peptide an das RP18-Material gebunden, während Salze wegwaschen werden. Die gebundenen Analyten können dann vor der MS mit einem geeigneten Lösemittel eluiert werden.

Für unphosphorylierte Proteine wurde folgendes Aufreinigungsprotokoll verwendet: Waschen des ZipTip mit reinem Acetonitril. Zweimaliges Befeuchten des ZipTip mit 10 µL 50 % Acetonitril / 0,1 % TFA, wobei die Lösungen verworfen wurden. Equilibrierung erfolgte mit 0,1 % TFA. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Bindung der Peptide an das Chromatographiematerial erfolgt durch hoch und runter Pipettieren der Peptidlösung für 60 Sekunden. Nach zweimaligem Waschen mit je 20 µL 0,1 % TFA wird mit 1-5 µL 50 % Acetonitril / 0,1 % TFA in einem neuen Reaktionsgefäß 60 Sekunden lang hoch und runter

pipettiert. Ist nur sehr wenig Probe vorhanden, so kann man direkt mit α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50 % ACN / 0,1 % TFA eluieren. In diesem Falle verringert sich das Elutionsvolumen auf 2 μ L.

Die Anwendung der ZipTip auf Phosphopeptide ist abweichend von dem oben beschriebenen Protokoll. Anstelle der Trifluoressigsäure wurde jeweils 0,1 % Phosphorsäure verwendet. Für die Elution wurde eine Lösung mit 50 % Acetonitril / 1 % Phosphorsäure verwendet.

2.3 Dried-droplet Präparation für die MALDI-MS

Bei sämtlichen MALDI-MS Messungen wurde die sogenannte *dried droplet* Präparation gewählt. Bei dieser Methode werden 0,5 - 1 μ L der Matrixlösung auf einem MALDI-Probenteller gegeben. Dieser wird ein Tropfen, ebenfalls 0,5 - 1 μ L Probenlösung, hinzugegeben. Matrix- und Probenlösung vermischen sich auf dem Probenteller. Die Präparation kann entweder direkt an der Luft trocknen oder der Verdunstungsprozess kann mit Hilfe eines Heissluftföns beschleunigt werden. Bei Verwendung von α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure als Matrix wurde die Präparation bei Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen mit kalter 5%-iger Ameisensäure gewaschen. Dabei wurden 2 μ L Waschlösung auf die getrockneten Matrixkristalle gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 5 - 10 Sekunden wurde die Ameisensäure wieder entfernt.

2.4 Massenspektrometrie

2.4.1 MALDI-MS

Für die Messung der MALDI-TOF Spektren wurden drei verschiedene Instrumente verwendet: Das Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Darmstadt), das Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen) und das 4800 MALDI TOF/TOFTM Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt).

Im Voyager-DE STR ist ein 20 Hz Stickstoff-Laser eingebaut, der bei der Wellenlänge von 337 nm emittiert. Der Messbereich lag bei Einsatz dieses Gerätes in der Regel zwischen 600 und 5000 m/z. Ionen, deren m/z-Werte 500 unterschritten, wurden nicht aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV mit 68,5 % Spannung am ersten Gitter. Die

Verzögerungszeit für die *Delayed Extration* wurde mit 150 ns gewählt, das Reflektor-Spannungsverhältnis betrug 1,12. In der Regel wurden 1000 - 2000 Laserschüsse für die Aufnahme eines Spektrums aufsummiert. Die Laserstärke wurde je nach Matrix so gewählt, dass sie gerade hoch genug war, um Analyten zu desorbieren und zu ionisieren. Zur Visualisierung und Auswertung der Spektren kam die Software „Data Explorer“ Version 4.3 zum Einsatz. Bei MS Messungen auf allen drei Geräten wurde extern auf bekannte Peptidmassen des Peptidstandards Sequazyme Peptide Mass Standard Kit (Applied Biosystems) kalibriert.

Am Bruker Ultraflex TOF/TOF wurden neben MS auch MS/MS Spektren mit Hilfe der LIFT-Technologie aufgenommen. Wie das Voyager-DE STR ist auch dieses Gerät mit einem 337 nm Laser für die Desorption und Ionisation bestückt. Der eingebaute Laser im Gerät der Firma Bruker hat eine Wiederholungsrate von 25 Hz. Dieser Laser sorgte für die Bildung von metastabilen Fragmentionen (PSD *Post Source Decay*), ohne dass ein Kollisionsgas notwendig war. Precursorionen wurden in einem sogenannten *time ion gate* ausgewählt. Nach Erreichen der LIFT-Zelle wurden die Ionen auf 19 kV beschleunigt, wobei das Potential am Reflektor mit 29 kV eingestellt war. Gemessen wurde im Bereich von 600 - 5000 m/z. Bei Aufnahme eines MS-Spektrum wurden zwischen 1000 und 3000 Laserschüsse addiert, während für PSD-Spektren je nach Konzentration der Probe bis zu 7000 Schüsse aufsummiert wurden.

Im Gegensatz zu den beiden oben erwähnten MALDI-TOF Instrumenten besitzt das 4800 MALDI TOF/TOFTM Analyzer einen Nd:YAG Laser mit einer Emissionwellenlänge von 355 nm. Die Wiederholungsrate von 200 Hz ist deutlich höher als bei den ersten beiden genannten Instrumenten. Im MS-Modus wurden Ionen zwischen 600 m/z und 5000 m/z aufgenommen. Der *low mass gate* wurde für Ionen unter 500 m/z eingestellt. Für ausgewählte Vorläuferionen wurden CID MALDI-MS/MS Spektren aufgenommen, wobei zwischen 2000 und 5000 Laserschüsse für ein Spektrum addiert wurden. Bei MS/MS Messungen wurde extern auf bekannte Fragmentionensignale von Angiotensin I kalibriert. Die Spektren wurden mit der Software Data Explorer Version 4.3 ausgewertet.

2.4.2 ESI-MS

ESI-MS und MS/MS Messungen wurden am LCQ Classic von Thermo Finnigan durchgeführt. Die Elektrospraymessungen wurden *offline* durchgeführt, d.h. die Probe wurde in eine nano-ESI-Kapillare pipettiert und direkt versprüht. Die Temperatur der Transferkapillare betrug 200 °C. An der ESI-Nadel wurde eine Spannung von 2,1 kV angelegt. Die Kapillarspannung wurde mit einem Wert von 42 V eingestellt.

Die mittels 4 µL 150 mM Ammoniumhydroxid von der Phosphonat-Oberfläche eluierten Phosphopeptide wurden 1:1 mit 2 % Ameisensäure / Methanol gemischt und aus einer ausgezogene ESI-Nadel mit einer Öffnung von ca. 1 µm versprüht.

2.5 Optimierung der MALDI-Matrix für Phosphopeptide

Da für die Desorption und Ionisation von Phosphopeptiden die eingesetzte MALDI-Matrix eine herausragende Rolle einnimmt, wurden Untersuchungen gemacht, welche Matrixsubstanzen verbesserte Signale im MALDI-TOF im Vergleich zur etablierten Standardpräparation mit α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure haben. Dabei wurden neben den eigentlichen Matrizes auch verschiedenen Säurezusätze ausgetestet.

Sieben verschiedene Matrixsubstanzen, die teilweise für unterschiedliche Analyten eingesetzt werden, wurden in diese Untersuchung eingeschlossen:

3-Hydroxy-Picolinsäure (3HPA), α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), Ferulasäure (FERU), 5-Methoxysalicylsäure (S), Sinapinsäure (SINA), 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP). Für die Bestimmung der jeweiligen optimalen Konzentration der Matrix diente die MALDI-TOF Messung eines BSA-Verdau (300 fmol/µL). Es wurde die Konzentration gewählt, die im Spektrum die meisten Signalen und höchsten S/N-Verhältnisse ergaben. Je nach Löslichkeit wurden die Matrizes in 50 % - 70 % Acetonitril gelöst. Als Säurekomponenten dienten neben 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), 0,1 % Hexafluor-phosphorsäure (HFP6) und 1 % Phosphorsäure. Je 300 fmol β -Casein-Verdau wurde nach *dried droplet* Präparation mit den jeweiligen Matrix/Säure-Gemischen vermessen.

2.6 Relative Quantifizierung der Phosphorylierung

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, liegt der Phosphorylierungsgrad bei etwa 1-2 % *in vivo*. Deshalb liegt nach einem proteolytischen Verdau neben dem mit Phosphat modifizierten Peptid noch das unphosphorylierte Peptid vor. Das Prinzip der hier vorgestellten Methode vergleicht die Änderungen in der Signalintensität für Phosphopeptid und unphosphoryliertes Pendant vor und nach der Behandlung mit Alkalischer Phosphatase. Das folgende Schema soll die Idee, die dahinter steht veranschaulichen:



Abb. 2.1: Prinzip der Quantifizierung der Phosphorylierung mittel Dephosphorylierung. Links: im nativen Zustand findet man neben dem phosphorylierten Peptid (P) auch das unphosphorylierte Peptid (DP), welche sich um 80 Da unterscheiden. Nach Behandlung mit Alkalischer Phosphatase wird die Phosphatgruppe am modifizierten Peptid enzymatisch entfernt, und man erhält im anschließenden Spektrum nur noch ein Signal.

Durch Vergleich der Signalintensitäten von Phosphopeptid zu unphosphoryliertem Peptid lässt sich die unterschiedliche Ionisierbarkeit der beiden Analyte bestimmen. Nimmt das Signal für das dephosphorylierte Peptid nach der Behandlung mit Alkalischer Phosphatase im gleichen Maße zu, wie das Signal für das Phosphopeptid abnimmt, so ist der *Response* Faktor = 1. Ist die Signalzunahme doppelt so hoch wie das ursprüngliche Signal des Phosphopeptids, so wäre der *Response* Faktor = 2 usw. Durch Bestimmen des *Response* Faktors kann man das Verhältnis von unphosphoryliertem Peptid zu Phosphopeptid bestimmen, da unter Berücksichtigung des *Response* Faktors die Signale für die unphosphorylierten Peptide vor und nach Dephosphorylierung direkt miteinander verglichen werden können. Das folgende Schema soll die Bestimmung des *Response* Faktors verdeutlichen:

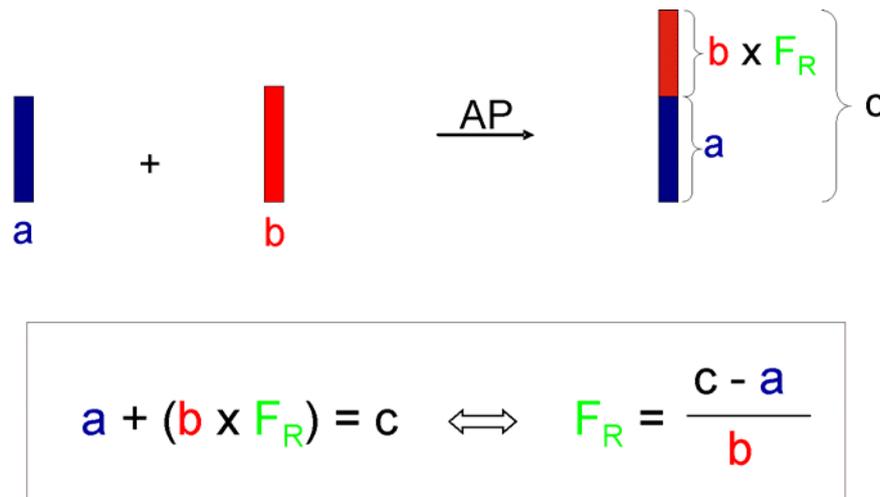


Abb. 2.2 Schema zur Ermittlung des Response Faktors. *a* = unphosphoryliertes Peptid. *b* = Phosphopeptid. *AP* = Alkalische Phosphatase. *FR* = Response Faktor. *C* = resultierendes Signal nach Dephosphorylierung.

2.6.1 Dephosphorylierung

Phosphatgruppen an Tyrosin, Serin und Threonin können enzymatisch mit Alkalischer Phosphatase abgespalten werden. Die Reaktion verläuft, wie der Name des Enzyms schon sagt, im alkalischen Milieu in relativ kurzer Zeit ab. Für die relative Quantifizierung der Phosphorylierung wurde die Alkalische Phosphatase vom Kalb (Boehringer Mannheim) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dephosphorylierung sowohl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen als auch direkt auf einem MALDI-Probenteller durchgeführt. In beiden Fällen wurde die gelieferte Alkalische Phosphatase (1 U/μL) mit 50 mM Ammoniumbicarbonat 1:20 verdünnt, um ein alkalische Milieu mit einem pH-Wert von 8,5 einzustellen. Für die Durchführung in Reaktionsgefäßen wurden die Proben in 100 μL 50 mM Ammoniumbicarbonat gelöst und mit 50 μl der verdünnten Alkalischen Phosphatase bei 37 °C für 60 Minuten auf einem Schüttler belassen.

2.6.2 Validierung der relativen Quantifizierung der Phosphorylierung

Für die Etablierung und Validierung der Methode wurden sieben Lösungen am MALDI-TOF-Gerät Voyager-DE STR vermessen. Die Lösungen enthielten je 200 fmol/μL BSA-Verdau und humanes Angiotensin II (Invitrogen), sowie phosphoryliertes Angiotensin II in den Konzentration 10 fmol/μL, 50 fmol/μL, 100 fmol/μL, 150 fmol/μL, 200 fmol/μL, 300 fmol/μL und 500 fmol/μL. Jede Lösung wurde 10 Mal auf einem MALDI-Probenteller aus

Edelstahl aufgetragen und mit DHB (10 mg/mL) in 1% Phosphorsäure als MALDI-Matrix vermessen. Pro aufgetragenen Spot wurden exakt 2000 Laserschüsse summiert. Von jeder Lösung wurden somit für die spätere Auswertung 20.000 Schüsse aufgenommen.

2.6.3 Anwendung der relativen Quantifizierung auf Ovalbumin

Ovalbumin wurde in-Lösung mit Trypsin nach Reduktion und Alkylierung über Nacht bei 37 °C verdaut. Ein Teil des verdauten Proteins wurde in 50 mM Ammoniumbicarbonat zu einer Zielkonzentration von 500 fmol/μL mit einem pH-Wert von 8,5 verdünnt. Als Kontrolle wurde ein Teil des verdauten Ovalbumins in 0,1 % Phosphorsäure mit pH 2,5 gelöst, welche ebenfalls eine ein Konzentration von 500 fmol/μL besaß. 200 μl des Ovalbumins in alkalischem Milieu wurde mit 100 μL Alkalischer Phosphatase (gelöst in 50 mM Ammoniumbicarbonat mit einer Aktivität von 0,05 U/μL) bei 37 °C für 60 Minuten versetzt. Der Teil des Ovalbumins (200 μL), welcher in saurem Milieu gelöst war, wurde mit 100 μL Alkalischer Phosphatase (0,05 U/μL) behandelt, welche in 0,1 % Phosphorsäure gelöst vorlag und bei 37° C für 60 Minuten inkubiert wurde. Da bei der Kontrolle der pH-Wert im stark sauren Milieu liegt, findet keine Dephosphorylierung von Phosphopeptiden statt.

2.7 Chemische Modifizierung von Goldoberflächen

2.7.1 Anmerkungen zur chemischen Modifizierung von Oberflächen

Bei der Produktion von chemisch modifizierten Oberflächen ist es unabdingbar, dass die eingesetzten Materialien höchsten Ansprüchen bezüglich ihrer chemischen und physikalischen Sauberkeit und Reinheit entsprechen. Nur so kann eine erfolgreiche Derivatisierung der Oberfläche gewährleistet werden. Deshalb wurde bei der Durchführung der Oberflächenbeschichtung jegliches Material, welches während der Fabrikation der Oberfläche benutzt wird (Glasgeräte, Pinzetten etc.), mit einer Reinigungslösung bestehend aus einer 5:1:1 Mischung von MilliQ-Wasser, Wasserstoffperoxid (25 %) und Ammoniak (30 %) zweimal für 15 Minuten bei 85 °C behandelt. Diesen beiden Reinigungsschritten folgte ein extensives ausspülen mit UV-gereinigtem Wasser, welches von einer MilliPore Synergy 185 Wasseranlage stammte. Das per UV-Licht behandelte Wasser verhindert das Einschleusen

von organischen Kontaminaten, welche die chemische Modifizierung negativ beeinflussen würden.

2.7.2 Synthese von multivalenten Chelator-Thiolen

Die Synthese von Matrix-Thiolen und bis-NTA-Thiolen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Tampé vom Institut für Biochemie an der J. W. Goethe Universität Frankfurt durchgeführt. Ausgangspunkt für die Synthese beider Produkte ist die 16-Mercapto-hexadecansäure, welche mit einem Triethylenglykol verlinkt wurde. Nach Schützen der 16-Mercapto-hexadecansäure mit Zinkacetat zu 16-Acetylsulfanyl-hexadecansäure wurde die Verlängerung der *Spacer*gruppe durch Esterbindung mit der Tritethylenglykolgruppe erreicht.

Die synthetisierte Verbindung diente als Vorläufer für die Synthese des Matrix- und bis-NTA-Thiols. Für die Synthese des Matrix-Thiols wurde der Schutz des Schwefels in der Vorläuferverbindung mit Hydraziniumacetat aufgehoben. Mit tert-Butyl-geschützte bis-NTA führte über Carbamat-Verknüpfung und Entschützen der Thiol- und Carboxylgruppen zum bis-NTA. Für detaillierte Synthesebedingungen siehe Tinazli *et al.*, 2005.

2.7.3 Herstellung von goldbedampften Gläsern

Goldoberflächen wurden durch Aufdampfen von dünnen Goldfilmen auf Glas erreicht. Das handelsübliche Glas, welches als herkömmlicher Objektträger in der Mikroskopie verwendet wird, wurde vor und nach der Goldbedampfung zweimal für 15 Minuten und 85 °C mit einer Mischung aus MilliQ-Wasser, Wasserstoffperoxid (25 %) und Ammoniak (30 %) (5:1:1) gereinigt. Anschließend folgte jeweils extensives Spülen mit MilliQ-Wasser.

Durch Bedampfung erhielten die sauberen Gläser zunächst eine 2,5 nm dicke Chromschicht. Auf diese Schicht wurde Gold der Schichtdicke von 150 nm in einer Bal-Tec Med020 Bedampfungsanlage bei einem Vakuum von 10^{-6} mBar aufgedampft.

2.7.4 Modifizierung von Oberflächen mit Bis-NTA

Vor der eigentlichen Inkubation mit den Thiol-Lösungen wurden die goldbedampften Gläser mit HPLC-Grade Acetonitril sorgfältig gespült. Die Gläser wurden in einer Lösung aus einer 3 %-igen Mischung von bis-NTA und Matrix-Thiol (20 μM Gesamtkonzentration an Thiol) in Acetonitril für 36 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Formation der SAMs auf den Goldoberflächen wurden diese mit reinem Acetonitril, Ethanol und abschließend mit MilliQ-Wasser jeweils im Ultraschallbad bei Raumtemperatur für 30 Minuten behandelt. Die fertigen Substrate wurden bei 4 °C in MilliQ-Wasser bis zur Anwendung gelagert.

2.7.5 Fabrikation von Phosphonat-modifizierten Oberflächen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Oberflächen synthetisiert, die einen PO_3H_2 -Rest enthielten. Bei den im Arbeitskreis hergestellten modifizierten Oberflächen handelte es sich um Phosphorsäureamide. Die in Kooperation mit der Firma Qiagen hergestellten Oberflächen besaßen eine Phosphonatschicht. Da bei beiden Oberflächen der PO_3H_2 -Rest die entscheidende chemische Funktion für die Aktivierung mit Zirkoniumionen besitzt, wird in dieser Arbeit die Bezeichnung „Phosphonat“ durchgehend verwendet. Die Bezeichnung „Phosphonat“ oder „*Phosphonate*“ im Englischen hat sich in der Literatur im Bereich der Aufreinigung von Phosphopeptiden etabliert. Auch bei den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen (Feng *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2006) handelt es sich chemisch gesehen um Phosphorsäureamide, da die beschriebenen Synthesewege stets von einem primären Amin ausgehen.

2.7.5.1 Herstellung von Phosphorsäureamid-Oberflächen

Goldbedampfte Gläser wurden zweimal für 15 Minuten in sogenannter Piranha-Lösung (30 % Wasserstoffperoxid und konzentrierte Schwefelsäure 1:3) bei Raumtemperatur behandelt. Es folgten zwei Waschschrte mit MilliQ-Wasser und einer mit reinem Acetonitril. Die Goldoberflächen wurden bei Raumtemperatur für 48 Stunden in eine 1 μM Lösung aus 11-Aminoundecanthiol (Dojindo Molecular Technologies) in absolutem Ethanol gelegt. Nach Formation der SAMs wurde zweimal für 15 Minuten mit absolutem Ethanol gereinigt. Vor

der Derivatisierung der Aminofunktion der SAMs wurde 15 Minuten lang zweimal mit reinem Acetonitril im Ultraschallbad behandelt. Die Gläser wurden für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 0,2 M POCl_3 und 2,4,6-Collidin in reinem Acetonitril inkubiert. Nach zweifacher Behandlung für 15 Minuten im Ultraschallbad mit Acetonitril folgten zwei Waschschrte mit MilliQ-Wasser zur Entfernung des Acetonitrils. Die Gläser wurden in MilliQ-Wasser für 2 Stunden hydrolysiert. Abschließend wurden die modifizierten Gläser zweimal im Ultraschallbad mit MilliQ-Wasser für 15 Minuten behandelt. Bis zu Verwendung wurden die Gläser in MilliQ-Wasser bei 4 °C gelagert.

2.7.5.2 Herstellung von fokussierenden Phosphonat-Oberflächen

In Kooperation mit der Firma Qiagen wurden Phosphonat-modifizierte Oberflächen entwickelt, die fokussierende Eigenschaften besitzen. Diese bieten den großen Vorteil, dass aufgetragene Lösungen während des Verdunstungsprozesses sich zusammenziehen und somit einen gewissen Aufkonzentrierungseffekt.

Edelstahlträger wurden zunächst mit einer 25 nm Ti/W (9:1) Schicht und einer 100 nm Schicht bestehend aus reinem Gold mit einem CPA 9900 RF *sputtering system* bei einem Vakuum von 10^{-7} Torr bedampft.

Die fokussierenden MALDI-Probenräger wurden mit Hilfe der *UV-Photopatterning*-Technik hergestellt. Die Goldoberflächen wurden zunächst mit einer Schicht aus hydrophoben $\text{HS}(\text{C}_{11})\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$ -Molekülen versehen und nachfolgend mit $\text{HS}(\text{C}_{11})\text{PO}_3\text{H}_2$ (ProChimnia, Polen) ersetzt (Zhou und Walker., 2006). Die entsprechenden SAMs wurden durch Inkubation der Goldoberflächen in den jeweiligen 1 mM Thiollösungen in Ethanol für 24 h und anschließendem Waschen mit Ethanol erhalten.

Synthese von $\text{HS}(\text{C}_{11})\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$:

Darstellung von 11-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluorooctyloxy)undec-1-en (1)

Zu 3,0 mL 1H,1H,12H,2H-Perfluorooctanol (13,7 mmol) wurden 1,4 mL einer wässrigen Kaliumhydroxidlösung (50 %) gegeben. Die Mischung wurde 30 min bei 80°C erwärmt. Nach Zugabe von 3,3 mL 11-Bromoundec-1-en (1,5 mmol) wurde der Ansatz bei gleicher Temperatur 52 h lang belassen, bis Edukt komplett verbraucht wurde (Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Produkt zu

100 mL Ethylacetat gegeben und zweimal mit 50 mL Wasser und einmal mit 50 mL einer gesättigten Kochsalzlösung extrahiert. Die Ethylacetatlösung wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und gefiltert. Nach Verdampfen des Lösemittels unter Vakuum wurde ein öliges Produkt erhalten. Das Produkt wurde über eine Silikagel-Säule (5 x 300 mm, 0% Ethylacetat/Hexan gefolgt von 10 % Ethylacetat/Hexan über 2 Säulenvolumina) aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Die Ausbeute betrug 4,52 g (64 %) an **(1)** und hat das Aussehen eines farblosen Öls. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.80 (m, 1H), 4.95 (m, 2H), 3.69 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.43 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.39 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.27 (broad m, 10H).

Darstellung von Thioessigsäure S-[1'-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorooctyloxy)-undecyl]ester (2)

In einen 100 mL Rundkolben wurden unter Argonatmosphäre 1,0 g **(1)** (1,9 mmol) und 10 mL trockenes Methanol gegeben. Diese Mischung wurde mit 426 mL Thioessigsäure (6,0 mmol) versetzt, gefolgt von 53 mg an 2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid (0.2 mmol). Der Reaktionsansatz wurde unter ein Folienzelt gestellt und mit Licht einer Quecksilber-Niederdruck-Lampe behandelt. Nach 4 h wurde mittels Dünnschichtchromatographie (5 % Ethylacetat) kontrolliert, ob Edukt ganz verbraucht war. Das Lösemittel wurde unter Vakuum verdampft, bis ein öliger Rest zurückblieb. Das Produkt wurde über eine Silikagel-Säule (5 x 300 mm, 0% Ethylacetat/Hexan gefolgt von 10 % Ethylacetat/Hexan über 2 Säulenvolumina) aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten wurden vereint. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Die Ausbeute an Produkt **(2)** betrug 856 mg (76 %) und besaß das Aussehen eines farblosen Öls. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.69 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.43 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.39 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.55 (m, 2H), 1.33 (m, 2H), 1.25 (broad m, 10H).

Darstellung von 11-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluorooctyloxy)undecan-1-thiol

850 mg **(2)** (1,1 mmol) wurde mit 5 mL 3N methanolischer HCl-Lösung (15 mmol) versetzt. Die Mischung wurde 4 h lang bei 40 °C erwärmt. Nach Entfernen des Lösemittels wurden 782 mg (98 %) des Produkts **(3)**, welches die Erscheinung eines farblosen Öls besitzt, erhalten. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.69 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.43 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.51

(dd, $J=7.3, 7.6$ Hz, 2H), 2.39 (m, 2H), 1.58 (m, 4H), 1.32 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 1.25 (broad m, 12H).

2.8 His-Tag Protein Aufreinigung

Da bei der Aufreinigung mit den modifizierten Oberflächen sehr geringe Volumina verwendet werden ist es unbedingt erforderlich, dass sämtliche Inkubationszeiten in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer stattfindet, da die aufgetragenen Flüssigkeiten ansonsten zu schnell verdunsten.

Für die Aufreinigung des rekombinaten Ubiquitins mit einem Hexahistidin-Tag wurde die Probe in 10 mM HEPES (pH 7,5) gelöst. Die mit bis-NTA Molekülen modifizierte Oberfläche wurde zunächst zweimal mit 50 % Acetonitril von Oberflächenverunreinigungen wie Staukörner gereinigt. Hierauf folgte ein Waschschrift mit MilliQ-Wasser. Auf die trockene Oberfläche wurde 100 mM NiSO₄ für 30 Minuten pipettiert. Nach Entfernen der überschüssigen Nickelionen und Equilibrieren mit 10 mM HEPES wurde 1 µL Probe aufgetragen. Die Inkubationszeit der Probe betrug in einer Schutzkammer bei Raumtemperatur 45 Minuten. Nicht gebundene Analyten wurden mit 30 % ACN / 10 mM HEPES / 5 mM Imidazol in zwei Waschsritten gewaschen. Nach letztmaligem Waschen mit MilliQ-Wasser und Trocknen wurde direkt mit DHBs (30 mg/mL) in 50 % Acetonitril / 0,1 % TFA eluiert und auf demselben Probenhalter am Voyager-DE Pro vermessen.

2.9 Anreicherungstechniken für Phosphopeptide

2.9.1 Aufreinigung von Phosphopeptiden mit Graphit Mikrosäulen

Die Befüllung von Gelloadertips (Eppendorf) mit Graphit als chromatographischem Material erfolgte nach Roepstorff *et al.* Gelloadertips, die man zum Beladen von Gelen benutzt, wurden im unteren Bereich mit einer ebenen Pinzette verengt, um ein Durchlassen von Graphitpartikeln (Sigma Aldrich) zu verhindern. Eine Suspension aus 100 mg in 1 mL Wasser wurde in die zu befüllende Pipettenspitze gegeben. Durch Aufsetzen einer Spritze wurde mit reiner Luft Druck erzeugt, so dass zwar das Wasser durch den Gelloadertip floss, das

chromatographische Material allerdings in der Pipettenspitze als etwa 1 cm lange Säule mit einem Durchmesser von etwa 1 mm verbleibt.

Die gepackten Gelloadertips wurden zunächst mit 50 % Acetonitril gründlich gewaschen. Hierfür wurde 3 Mal mit 20 μL Lösemittel unter Zuhilfenahme einer Spritze für den Druckaufbau die Graphitsäule passiert. Equilibrierung der Säulen erfolgte durch zweimaliges pipettieren von 20 μl 100 mM Essigsäure. Die in 100 mM Essigsäure gelösten Proben wurden in ein kleines 0,6 mL Reaktionsgefäß gegeben. 10 μl der Probe wurde 10 mal sehr langsam (30 Sekunden) über die Säule gegeben, wobei die durchgeflossene Lösung jedesmal wieder in einem Reaktionsgefäß aufgenommen wurde. Um Verunreinigungen wegzuwaschen, wurde die Säule zweimal mit 30 % Acetonitril / 100 mM Essigsäure gewaschen. Die gebundenen Peptide wurden durch dreimaliges Pipettieren mit 3 μl 50 % Acetonitril / DHB 1% Phosphorsäure eluiert und auf einem Edeltahlteller im MALDI-TOF gemessen.

2.9.2 Phosphopeptideaufreinigung mit IMAC-Beads

Die gelieferte IMAC-Beads-Suspension (Phosselect von Sigma Aldrich) wurde kurz auf einem Vortex aufgeschlemmt und 20 μl Suspension mit 3 Teilen MilliQ-Wasser verdünnt. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt. Zweimal wurde mit 500 μL MilliQ-Wasser behandelt, wobei jedesmal die *Beads* zentrifugiert wurden und die Überstände verworfen wurden. Die *Beads* wurden in 20 μL 100 mM Essigsäure aufgenommen. Zu dieser Suspension wurde 10 μL der Probe in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 60 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur belassen.

In ein Gelloadertip, dessen Ende mit einer Pinzette verengt wurde, wurde die gesamte *Bead*-Suspension pipettiert. Die Probe wurde zweimal mit je 30 μL 30 % Acetonitril / 100 mM Essigsäure gewaschen. Durch dreimalige Passage von 3 μl 50 % Acetonitril / DHB (10 mg/mL) 1% Phosphorsäure wurde eluiert und auf einem Edeltahlteller im MALDI-TOF gemessen.

2.9.3 Aufreinigung von Phosphopeptiden mit bis-NTA Oberflächen

Die Oberflächen wurden zweimal mit 50 % Acetonitril von eventuell anhaftenden Partikeln gesäubert, welche die Anreicherung der Phosphopeptide stören könnten. Die 100 mM Gallium(III)Nitrat-Lösung wurden nach Trocknen der Oberfläche 30 Minuten auf der Oberfläche in einer Schutzkammer belassen. Der Metallionenüberschuss wurde durch Waschen mit MilliQ-Wasser entfernt. Nach Equilibrierung mit 100 mM Essigsäure wurde 1 μ L der Probe aufgetragen. Die Inkubationszeit in einer mit Wasserdampf gesättigten Dose betrug 45 Minuten. Es folgten zwei Waschschritte mit 30 % Acetonitril / 100 mM Essigsäure. Die gebunden Analyten wurden direkt mit der MALDI-Matrix (DHB 10 mg/mL / 1% Phosphorsäure) eluiert und auf demselben Probenhalter vermessen.

2.9.3.1 Bestimmung der Bindekapazität der bis-NTA-Oberfläche

Nach Vorbehandlung und Aktivierung der Oberfläche wie oben beschrieben, wurde je 1 μ L einer Lösung die unterschiedliche Mengen (550 fmol, 600 fmol, 650 fmol, 700 fmol, 750 fmol, 800 fmol, 850 fmol) eines synthetischen Phosphopeptids (Monophosphopeptid von β -Caseins, Sigma-Aldrich) enthielten jeweils im Triplett auf fünf unterschiedliche bis-NTA-Probenhalter gegeben (N = 15) und 30 min inkubiert. Danach wurde 0,5 μ L der aufgetragenen Probe auf einen Edelstahlprobenhalter überführt und nach Zugabe von DHB / 1 % Phosphorsäure im MALDI-Gerät vermessen. Der Rest der sich auf der bis-NTA-Oberfläche befand wurde wie oben beschrieben gewaschen, mit MALDI-Matrix eluiert und auf der selbigen Oberfläche vermessen.

Die Bindekapazität wurde ermittelt, indem untersucht wurde, ob in der Probe auf dem Edelstahlträger das Phosphopeptid nachweisbar war. Wenn ein Signal ($S/N > 3$) detektiert wurde, wurde die Bindekapazität der entsprechend niedriger konzentrierten Lösung zugeordnet, da das Phosphopeptidsignal im MS-Gerät beweist, dass nicht die komplette Analytmenge von der bis-NTA-Oberfläche gebunden wurden. Die MALDI-Spektren der Lösungen, die mit der bis-NTA-Oberfläche vermessen wurden, zeigten, dass bis zum Erreichen der Bindekapazität die Signalintensitäten für den Analyten zunahmten und bei höheren Analytmengen nicht mehr zunahmten.

2.9.4 Anreicherung von Phosphopeptiden mittels TiO₂

Mit TiO₂ befüllte Gelloader Tips (Glygen, Columbia, USA) wurden zunächst zweimal mit 20 µL 100 mM HAc behandelt. Nach Binden der Phosphopeptide aus 10 µL Probenlösung wurde zweimal mit 30 % ACN / 100 mM HAc gespült. Die gebundenen Analyten wurden mit 3 µL einer Lösung, die 50 % ACN / DHB (10 mg/mL) 1% Phosphorsäure enthält, direkt auf einen MALDI-Probenteller aus Edelstahl gespottet.

2.9.5 Anreicherung von Phosphopeptiden an Phosphonat-modifizierten Oberflächen

Sämtliche Schritte bei der Aufreinigung mit den selbst produzierten Phosphonat-Oberflächen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Phosphonat-modifizierten Gläser wurden vor dem Beladen mit Metallkationen initial zweimal für 5 Minuten mit 100 mM Essigsäure / 30 % ACN behandelt. Nach einem Waschschrift mit MilliQ-Wasser, wurde eine wässrige 100 mM Zirkonylchlorid-Lösung zum Aktivieren der Oberfläche für 10 Minuten aufgetragen. Zum Entfernen überschüssiger Zirkonium-Ionen diente MilliQ-Wasser. Nach der Equilibrierung für 10 Minuten mit 100 mM Essigsäure / 30 % ACN wurde 1 µL der Probe auf die Oberfläche pipettiert. Die Präparartion kam für 45 Minuten in eine mit Wasserdampf gesättigte Kammer zum Schutz vor Verdunstung. Die noch nicht eingetrocknete Probe wurde zunächst mit Wasser, dann zweimal mit 100 mM Essigsäure / 30 % ACN gewaschen. Die aufpipettierte Lösung aus DHB (10 mg/mL) / 1 % Phosphorsäure hatte neben der Funktion, die Phosphopeptide von den Chelatoren zu eluieren, noch die Funktion der MALDI-Matrix.

2.9.5.1 Bestimmung der Bindekapazität der Phosphonatoberfläche

Die Bindekapazität der Phosphonatoberfläche wurde ähnlich wie bei der bis-NTA-Oberfläche ermittelt mit der Ausnahme, dass die Konzentration an synthetischem Phosphopeptid zwischen 500 fmol und 800 fmol lagen (vgl. Kapitel 2.9.3.1).

2.10 Probengewinnung und Aufarbeitung der MAPK-1

Die Probengewinnung und Aufarbeitung der MAPK-1 wurde in Kooperation mit Herrn Udo Roth der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt.

Humane MAPK1 wurde als His-getagtes Protein rekombinant in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA Superflow nach Angaben des Herstellers (Qiagen) gereinigt. Das eluierte Protein wurde auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt und bei 4° C gelagert. Für den Verdau wurde ein 5 µl Aliquot an Protein abgenommen und Harnstoff in fester Form zugegeben, bis eine Konzentration von 8 M erreicht wurde. Anschließend wurde die Lösung mit DTT (final 10 mM) versetzt und 30 min bei 30° C inkubiert. Zur Alkylierung der Sulfidgruppen wurde der Ansatz dann mit dem gleichen Volumen einer 110 mM Iodoacetamid-Lösung in 50mM Tris/HCl (pH 8.0) für 20 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Für den Verdau wurde der Ansatz 1:5 mit Verdaupuffer (50mM Tris/HCl, pH 8.0) gemischt, mit 50 ng Trypsin (Proteomics grade, Promega) versetzt und über Nacht bei 20 °C verdaut. Am nächsten Tag wurde der Verdau mit TFA gestoppt (final 0,7 %) und mit Hilfe von PepClean Spin columns (Pierce) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Eluat wurde per SpeedVac eingetrocknet, in 12 µl 300 mM Essigsäure aufgenommen und 5 µl pro Probenposition auf die Phosphonatoberfläche aufgetragen.

2.11 2-D Gelelektrophorese

Das Heat Shock Protein B1 (HSP1) wurde aus einem 2-D-Gel gewonnen. Die Durchführung der 2-D-Gelelektrophorese fand wie folgt statt:

1×10^7 HeLa-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % in DMEM-Komplettmedium kultiviert und durch Zugabe von 1 mM Na-Orthovandat und 100 nM Calyculin A (beides Proteinphosphatase-Inhibitoren) für 20 min bei 37° C behandelt. Nach Inkubation wurden die Zellen geerntet und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren. Die Aufreinigung der Phosphoproteine erfolgte mit Hilfe des Phosphoprotein Purification Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Rohlysat, Säulendurchfluß, Wasch- und Eluatfraktionen wurden zur Nachverfolgung der Phosphoproteine per 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und einer Färbung mit ProQ Diamond (Invitrogen), einem Phosphoprotein-spezifischen Farbstoff, unterzogen. Die Eluatfraktionen mit den stärksten Signalen wurden anschließend vereinigt und enthaltende Proteine mit Hilfe der DOC/TCA-Fällung präzipitiert. Das abzentrifugierte Proteinpellet

wurde mit Aceton gewaschen, in einem 2D-kompatibelen Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 10 mM Tris, 50 mM DTT, Proteaseinhibitorcocktail (Roche)) aufgenommen und die gelösten Proteine auf einem 2D-Gel aufgetrennt. Hierzu wurden für die IEF die so vorbereiteten Proteine auf einem IPG-Streifen (18 cm, pH 3-10 non-linear, GE Healthcare) nach der Rehydratisierungsmethode geladen und auf einem IPGphor-Instrument (GE Healthcare) nach ihrem isoelektrischen Punkte getrennt. Vor dem Aufbringen des IPG-Streifens auf ein Polyacrylamidgel (12, 5 % Acrylamid) wurden die Proteine im IPG-Streifen mit einer SDS-Lösung äquilibriert und dabei gleichzeitig reduziert und alkyliert. Die anschließende Elektrophorese wurde bei konstantem Stromfluß von 25 mA und 20 °C pro Gel durchgeführt, bis die mit Bromphenolblau markierte Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat. Anschließend wurde das Gel zur Detektion von Phosphoproteinen mit ProQ Diamond (Invitrogen) angefärbt und mit einem Laserscanner (Ettan Image Reader, GE Healthcare) eingescannt.

2.12 In-Gel Verdau des HSP1

Zur Vorbereitung des Verdau wurden die bereits reduzierten und alkylierten Proteine zuerst mehreren Waschschrinen unterzogen:

1. Inkubation in 250 µl H₂O
2. Inkubation in 250 µl ACN (50 %)
3. Inkubation in 250 µl reinem ACN.

Alle Schritte erfolgten in einem Thermomixer unter Schütteln (850 rpm) für 15 min bei 30° C. Nach Abnahme des ACN wurden die *Spots* kurz an der Luft getrocknet und mit 5 µl Trypsin-Lsg. (15 ng/µl in 50 mM NH₄HCO₃) für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die nicht aufgesogene Flüssigkeit abgenommen und die Spots mit je 5 µl Verdaupuffer (25 mM NH₄HCO₃) überschichtet. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37° C. Am nächsten Morgen wurden die Proben mit 2 µl TFA (1 %) angesäuert und mit 1 µl ACN versetzt. Von diesem Ansatz wurde 1 µl zur Proteinidentifizierung auf Mass Spec Turbo Chips (Qiagen) aufgetragen und der Rest für die Detektion der Phosphopeptide mit Hilfe der Zr-Phosphonatoberfläche verwendet.

3. Ergebnisse:

3.1 Optimierung der MALDI-Matrix für Phosphopeptide

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Kombination von MALDI-Matrix und der zugesetzten Säure auf ihre Tauglichkeit für die MALDI-MS Messung von phosphorylierten Peptiden. Nur mit einer geeigneten Matrix/Säure-Kombination kann eine solide massenspektrometrische Analyse von Phosphopeptiden durchgeführt werden, da im Falle einer Matrix, welche suboptimal für die Desorption und Ionisation von phosphorylierten Peptiden ist, keine Aussage über die tatsächliche Anwesenheit von entsprechenden Analyten zu treffen ist. Eine schlechte Matrix/Säure-Auswahl könnte z.B. aufgrund der Tendenz, Fragmentationen schon während des MALDI-Prozess zu bilden, einen ungewollten Abgang der Phosphatgruppe provozieren. Hierdurch würde die Information verloren gehen, ob es sich bei dem Analyten um eine phosphorylierte Spezies handelt. Zum andern muss die MALDI-Matrix, wie von Krüger *et al.* 2001 gezeigt, in der Lage sein, den Analyten zu inkorporieren. Ist sie dazu nicht, oder nur unzureichend in der Lage, so ist die Sensitivität der Messung sehr gering. Ferner kann man keine Aussage darüber treffen, ob etwa nach einer Aufreinigung Phosphopeptide nicht vorhanden sind, oder einfach nur nicht im MS detektierbar sind, wengleich die Anreicherung der Phosphopeptide erfolgreich war.

Ein Aspekt dieser Arbeit war es deshalb zu untersuchen, welche Matrixsubstanz, die üblicherweise verschiedene Anwendungsgebiete aufweisen, eingesetzt werden kann, um die besten Signale für Phosphopeptide im MALDI-MS zu gewährleisten. Desweiteren sollte erörtert werden, ob die üblicherweise eingesetzte Trifluoressigsäure auch für die Analyse von phosphorylierten Peptiden ihre Berechtigung hat, oder ob eventuell andere Säuren eine höhere Signalantwort im MALDI-TOF ermöglichen.

Im Bereich der Proteomics kommt zum überwiegenden Teil CHCA in Kombination mit 0,1 % TFA als MALDI-Matrix für die Messung von Peptidgemischen zum Einsatz. Diese Standardpräparation erweist sich bei einem PMF als äußerst günstig, da sie mehrere Vorteile bietet. CHCA kristallisiert in kleinen punktförmigen Spots, die gleichmäßig verteilt sind. Da die Analyten weitestgehend homogen in den kleinen Kristallen verteilt sind, ist es nicht nötig, nach sogenannten *sweet spots* zu suchen, so dass diese Matrix häufig für die automatische Messung benutzt wird. Neben dem Vorteil der gleichverteilten Kristallisation ist CHCA als vermeintlich „harte“ Matrix (s. Schulz *et al.* 2006) sehr gut geeignet für die Bildung von

Fragmentationen im PSD bzw. im MS/MS-Modus. Dies begünstigt die Wahrscheinlichkeit einer kompletten Ionenserie für die Identifizierung bzw. Charakterisierung des Vorläuferions. Durch Vergleich der Standardpräparation von CHCA / TFA mit anderen Matrix/Säure-Kombinationen sollte untersucht werden, ob nicht eine andere Präparation für Phosphopeptide geeigneter ist.

Am Anfang der Untersuchung stand zunächst die Frage im Raum, ob Phosphopeptide in ihrer Ionisation durch unphosphorylierte Peptide supprimiert werden.

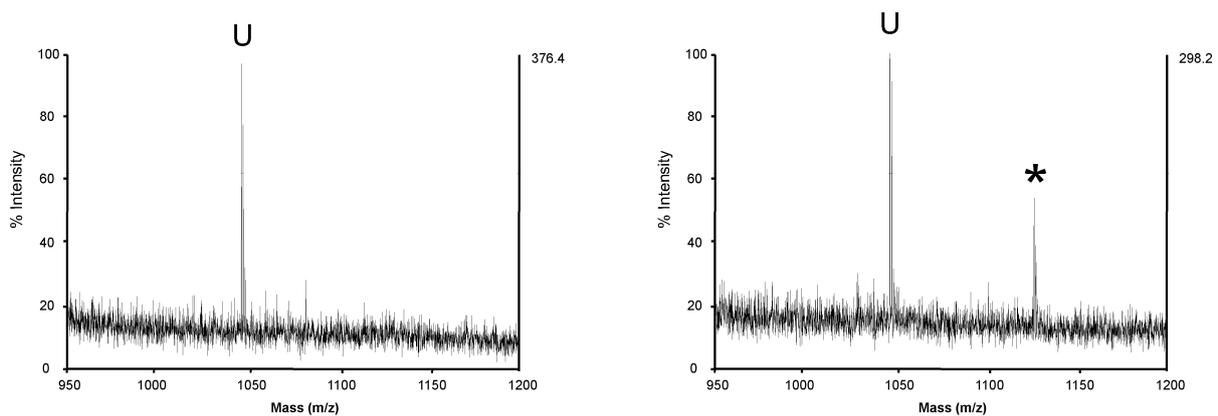


Abb. 3.1: Ionisation von Phosphopeptiden II. MALDI-TOF Spektren einer äquimolaren Mischung (10 fmol/ μ L) aus unphosphoryliertem Angiotensin II (U) und phosphoryliertem Angiotensin II (*). Links mit CHCA / 0,1 % TFA und rechts mit DHB / 1 % Phosphorsäure gemessen.

Abb. 3.1 verdeutlicht, dass sowohl mit CHCA als auch mit DHB das unphosphorylierte Peptid mit einem guten S/N-Verhältnis mittels MALDI-MS im unteren Femtomolbereich detektiert werden kann. Rein empirisch würde man vermuten, dass die Signale für beide Analyten annähernd gleich hoch sind, da diese sich nur in der Masse von 80 Da durch die Phosphatgruppe unterscheiden. Die beiden Beispielspektren zeigen, dass in der Tat unterschiedliche Signalstärken für beide Analyten am Detektor registriert werden.

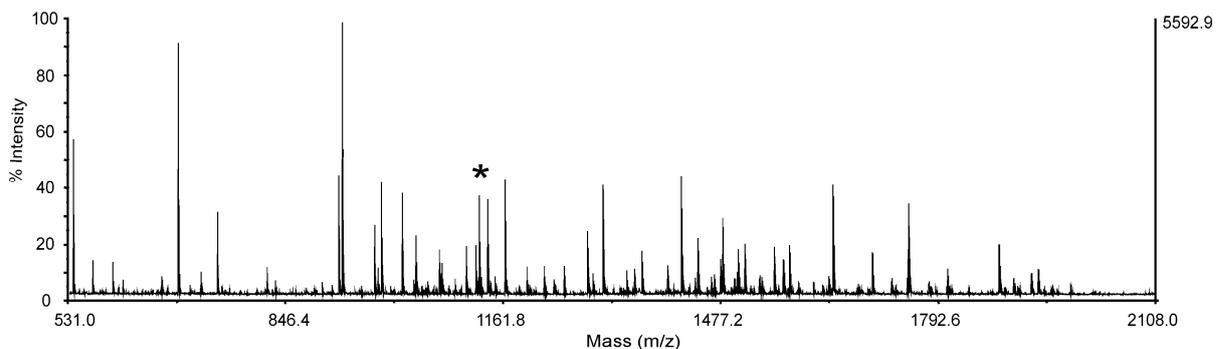


Abb. 3.2: Ionisation von Phosphopeptiden I . MALDI Massenspektrum eines BSA-Verdau, welches ein hinzugesetztes Phosphopeptid in gleicher Konzentration (100 fmol/ μ L) enthält. Als MALDI-Matrix diente DHB / 1% Phosphorsäure. Das Phosphopeptid ist mit einem Stern gekennzeichnet.

In Abb. 3.2 ist sehr deutlich zu erkennen, dass der Hintergrund an unphosphorylierten Peptiden des BSA-Verdau keinen Einfluss auf die Signalintensität des phosphorylierten Peptids hat. Ganz im Gegenteil zählt es sogar zu den drei stärksten Signalen des Spektrums. Die Hypothese, dass anwesende unphosphorylierte Peptide Phosphopeptide in ihrer Ionisation im MALDI-TOF supprimieren, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Dass diese Meinung aber unter einigen Gruppen verbreitet ist, könnte durch andere Ursachen begründet sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aber festgestellt werden, dass weniger die Anwesenheit unphosphorylierter Peptide die geringe Signalintensität von Phosphopeptiden erklärt, als vielmehr die Wahl der falschen Matrix.

Die obigen Beispiele zeigen eindrucksvoll, wie wichtig die Wahl der Matrix bei massenspektrometrischen Analysen von Phosphopeptiden mittels MALDI ist. Sehr früh kam im Rahmen dieser Arbeit die Frage auf, welche Matrix nun am geeignetsten für die Analyse von phosphorylierten Peptiden ist. In diesem Zusammenhang wurden sieben verschiedene Matrices im Hinblick auf Signalunterschiede für Phosphopeptide untersucht. (s. Abschnitt 2.5 Methodenteil zu Matrices). Dabei wurde neben der eigentlichen Matrix auch die Säurekomponente modifiziert, um eventuell auftretende Unterschiede festzustellen.

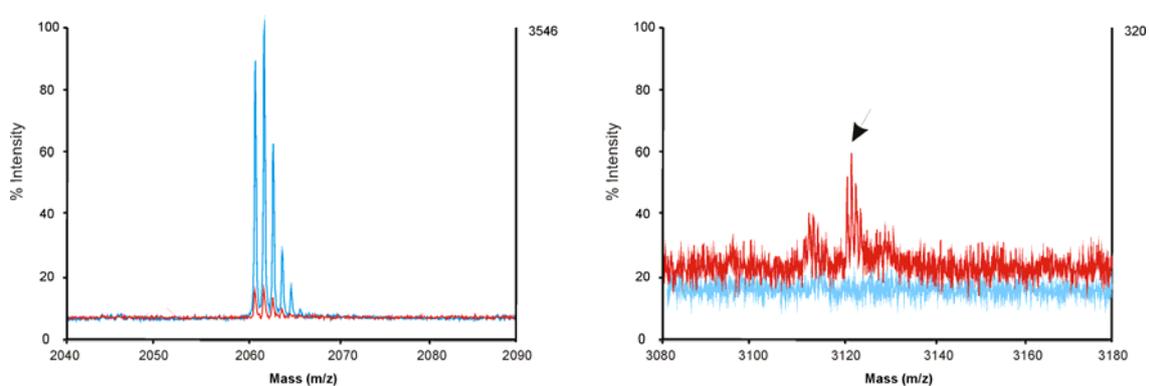


Abb. 3.3: Einfluss der MALDI-Matrix auf die Ionisation von Phosphopeptiden. Obige Spektren zeigen zwei Ausschnitte aus einem β -Caseinverdau. Vergrößert sind die Massenbereiche des einfach phosphorylierten Peptids bei 2061 Da und des vierfachphosphorylierten Peptids bei 3121 Da. In Blau ist die Messung mit CHCA / 0,1 % TFA, in Rot die mit THAP / 0,1 % HFP6 dargestellt.

In Abb. 3.3 wird deutlich, dass beispielsweise das einfachphosphorylierte Peptid des β -Caseins mit CHCA / 0,1 % TFA ein starkes Signal aufweist, während das vierfach phosphorylierte Peptid bei 3121 Da nicht detektierbar ist. Wird THAP mit HPF6 als Säure verwendet, so ist zwar das Signal für das Monophosphopeptid relativ schwach, aber im Gegensatz zur Präparation mit CHCA ist hier das multiphosphorylierte Peptid detektierbar.

	TFA		HPF6		PA	
3-Hydroxypicolinsäure (HPA)	X	X	X	X	X	X
Sinapinsäure (SINA)	X	X	X	X	X	X
5-Methoxysalicylsäure (S)	P	X	P	X	P	X
a-Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA)	P	X	P	X	P	X
Ferulasäure (FERU)	P	X	P	X	P	X
2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP)	X	X	P	PPPP	X	X
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	P					
	PPPP		P	PPPP	P	PPPP

Tabelle 3.1: Detektierbarkeit von Phosphopeptiden mit unterschiedlichen Matrices. Die Tabelle fasst die Detektierbarkeit von Phosphopeptiden aus 300 fmol β -Casein-Verdau mit unterschiedlichen Matrix/Säure-Kombinationen zusammen. P steht für das Monophosphopeptid mit 2061 Da, PPPP steht für das vierfach phosphorylierte Peptid der Masse 3121 Da.

Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der Matrix-Optimierung aus 5 verschiedenen Messungen je Matrix/Säure-Kombination zusammen. Weder mit 3-Hydroxypicolinsäure noch mit Sinapinsäure waren Phosphopeptide im Verdau des β -Caseins detektierbar. HPA findet vornehmlich in der MALDI-Messung von Oligonukleotiden Verwendung. Sinapinsäure hingegen wird meist zur Totalmassenbestimmung von Proteinen benutzt und kristallisiert ähnlich wie CHCA homogen in punktförmigen Gebilden über die gesamte Fläche. CHCA, die Standardmatrix für die Messung von Peptidgemischen im Proteomicsbereich, 5-Methoxysalicylsäure (S), welches in Mischung mit DHB häufig für die Messung von intakten Proteinen benutzt wird, und Ferulasäure konnten nur das einfach phosphorylierte Peptid detektieren, während das größere Phosphopeptid in den Spektren nicht sichtbar war. Von allen getesteten Matrices konnten nur THAP und DHB beide Phosphopeptide detektieren, welche zu den „weicheren“ MALDI-Matrices zählen. Während bei DHB mit allen drei getesteten Säuren eine Detektion möglich war, konnte mit THAP nur in Kombination mit HPF6 als Säure beide Peptide erfasst werden.

Tabelle 3.1 zeigt deutlich, dass mit der Kombination aus DHB und Phosphorsäure die besten S/N-Verhältnisse für Phosphopeptide zu erreichen sind. Bereits Kjellström *et al.* 2004 und Stensballe *et al.* 2004 hatten in ihren Publikationen die Beobachtung gemacht, dass DHB mit 1 % Phosphorsäure eine gute Kombination für die MALDI-Messung von Phosphopeptiden ist.

Es können mehrere Schlüsse aus den hier getesteten Matrix/Säure-Kombinationen gezogen werden. Die Matrices S, CHCA, Ferulasäure sowie DHB zeigen, dass die Wahl der Säure im Vergleich zur Matrix eine untergeordnete Rolle hat. D.h. die Frage, ob Phosphopeptide im MALDI-TOF detektierbar sind, ist primär von der Auswahl der Matrix abhängig. Eine

Abhängigkeit von der „Härte“ der Matrix dürfte sicherlich auch eine Rolle spielen. „Harte“ Matrices begünstigen die Bildung von Fragmentationen.

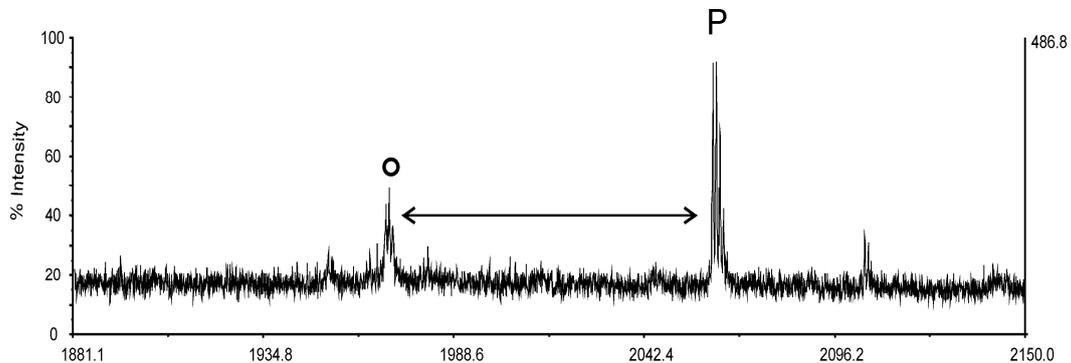


Abb. 3.4: Neutralverlust eines Phosphopeptids. Ausschnitt aus dem Spektrum des β -Casein-Verdaus mit Ferulasäure mit 1 % Phosphorsäure. P = Phosphopeptid, o = Neutralverlust.

Der sog. „neutral loss“ ist in der Regel nicht zu verhindern, da dieser bereits bei der Laserschwelle auftritt, bei der die Desorption und die Ionisation von Analyten erst anfängt. Würde man eine geringere Laserstärke wählen, so würden überhaupt keine Signale zu sehen sein. Abb. 3.4 zeigt beispielhaft einen solchen Neutralabgang mit 98 Da.

Aus den dargestellten Beobachtungen resultierend wurden im Rahmen dieser Arbeit sämtliche MALDI-Messungen für Phosphopeptide mit DHB / 1 % Phosphorsäure durchgeführt.

3.2 Anreicherungstechniken für Phosphopeptide

3.2.1 Aufreinigung von Phosphoprotein-Verdaus mit Graphit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, vorhandene Aufreinigungsmethoden für Phosphopeptide im Hinblick auf ihre Effizienz und Handhabbarkeit zu überprüfen. Eine Methode zum Anreichern von Phosphopeptiden stellten Roepstorff und Kollegen vor (Larsen *et al.*, 2004). Die Forschergruppe befüllte Pipettenspitzen, welche zum Beladen von Gelen (sog. *Gellovertips*) benutzt werden, da sie ein sehr feines, langgezogenes Ende besitzen, mit Graphit. Sie demonstrierten, dass mit dieser Methode Phosphopeptide angereichert und von Kontaminationen befreit werden können, wenn Probenmengen im hohen Femtomolbereich oder höher vorliegen. Um diese Methode beurteilen zu können, wurde sie intensiv im Hinblick auf Sensitivität, Selektivität und Durchführbarkeit untersucht.

Das Befüllen der Spitzen ist auf dem ersten Blick sehr einfach, dennoch können einige Probleme auftreten. Häufiger trat der Fall auf, dass die Öffnung der Spitze zu groß war, so dass sowohl das Lösemittel, als auch das Chromatographiematerial durch das Gellovertip befördert wurden. Aber auch der umgekehrte Fall kann auftreten. Ist die Öffnung der Pipettenspitze zu stark verengt, so reichte der Druck durch die Spritze nicht aus, um das Graphit in die Spitze zu plazieren. Die Erfolgsquote zur Herstellung von Graphitsäulen in Gellovertips lag bei nur etwa 30 %.

Die Sensitivität mit dieser Methode lag im mittleren Picomolbereich. Bei Mengen, die 5 pmol unterschritten, war es nicht möglich, beide Phosphopeptide gleichermaßen im Eluat zu detektieren. Die Sensitivität für das Monophosphopeptid lag im Bereich von etwa 200 fmol.

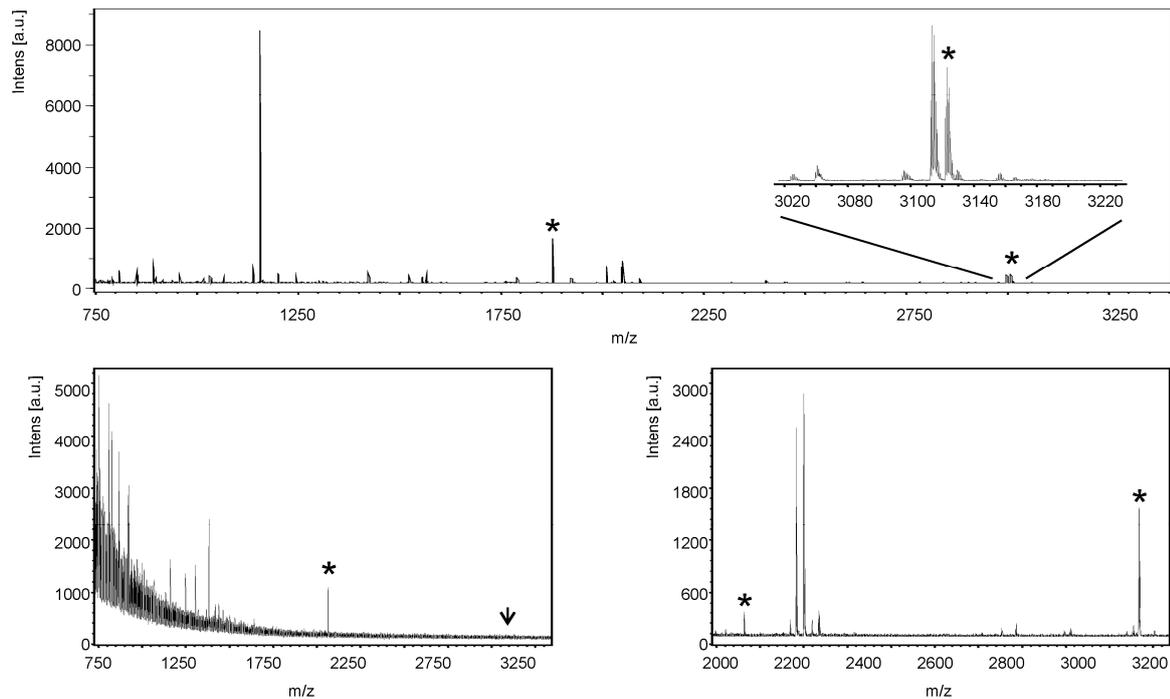


Abb. 3.5: Aufreinigung von Phosphopeptiden mit Graphit. Oberes Spektrum: 500 fmol β -Casein-Verdau gemessen ohne Aufreinigung. Links unten: Elution, rechts unten: Waschfraktion. Phosphopeptide sind mit * gekennzeichnet.

In Abb. 3.5 sind Beispielspektren für die Aufreinigung von 500 fmol β -Casein-Verdau zu sehen. In der Negativkontrolle, also der direkten Vermessung der Probe ohne Aufreinigung, zeigen beide Signale der Phosphopeptide eine deutlich geringere Intensität. Im Eluat ist nach der Anreicherung von beiden Phosphopeptiden lediglich das einfach phosphorylierte im Spektrum registrierbar. Warum das größere Phosphopeptid nicht im Eluat zu erkennen ist, kann verschiedene Gründe haben. Prinzipiell sind drei Möglichkeiten denkbar: 1. Der Analyt bindet überhaupt nicht an das Chromatographiematerial, 2. Analyt bindet zwar, wird aber weggewaschen oder 3. der Analyt bindet, kann aber nicht von der Säule eluiert werden. Abbildung 3.5 zeigt deutlich, dass der Grund für das Verschwinden des großen Phosphopeptids im Waschschriff zu finden ist. Obwohl mit 30 % ACN / 100 mM Essigsäure gewaschen wurde, konnten im Eluat neben dem Monophosphopeptid noch diverse andere, nicht phosphorylierte Peptide im Massenbereich von etwa 800 Da - 1400 Da detektiert werden. Es war nicht möglich, diese unspezifischen Bindungen durch Waschen zu unterbinden und gleichzeitig das vierfach phosphorylierte Peptid zu detektieren. Abb. 3.5 zeigt, dass beide Phosphopeptide mit relativ hohen S/N-Verhältnissen in der Waschlösung detektierbar sind. Dies erklärt zum einen den Verlust des großen Peptids im Eluat und zum anderen den sehr großen Probenbedarf von mehreren Picomol.

Um die unspezifische Bindung eingehend zu untersuchen, wurden fünf unabhängige Aufreinigungen mit einem β -Casein-Verdau durchgeführt. Dabei wurden die fünf höchsten

Signale, die in allen Versuchen im Eluat wiedergefunden wurden, per MS/MS identifiziert. In Abb. 3.6 ist das Ergebnis in einer Übersicht zusammenfassend dargestellt.

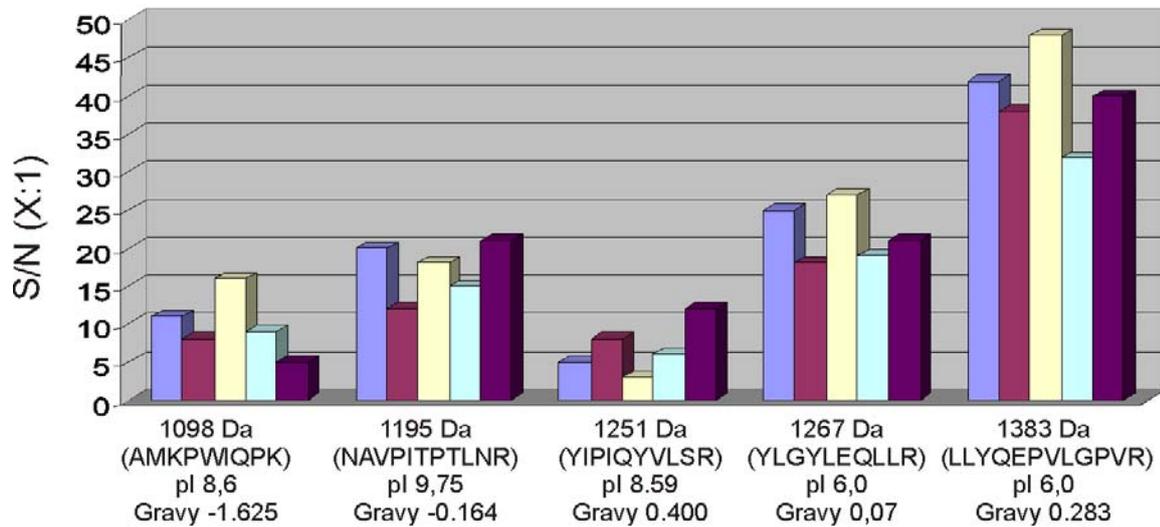


Abb. 3.6: Spezifität von Graphit-Säulen. S/N von unspezifisch gebundenen Peptiden an Graphit in 5 Replikaten.

In der Literatur ist Graphit vornehmlich für die Anreicherung von Phosphopeptiden und/oder hydrophilen Peptiden beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass in der Tat hydrophile, unphosphorylierte Peptide an das Chromatographiematerial bindet. Daneben finden sich aber auch Peptide mit nicht negativen Gravy-Scores. Diese Peptide sind also nicht alle auffallend hydrophil. Dies liegt sicherlich an der hohen Abundanz dieser Peptide in der Probe. D.h. nicht aufgrund ihrer Hydrophilie, sondern im Sinne des Massenwirkungsgesetzes ist die unspezifische Bindung solcher Analyte allein auf ihre hohe Konzentration in der Probe (oder guten MS-Detektierbarkeit) zurückzuführen.

Interessanterweise sind nicht unbedingt saure, unphosphorylierte Peptide für die unspezifische Bindung bei der Aufreinigung von Phosphoproteinverdau mit Graphit verantwortlich.

3.2.2 Anreicherung von Phosphopeptiden mit IMAC

IMAC steht für *Immobilised Metal Ion Affinity Chromatography* und ist die bis heute am häufigsten eingesetzte Technik für die Anreicherung von Phosphopeptiden. Auf *Beads* immobilisierte Chelatoren wie IDA oder NTA werden mit mehrwertigen Metallkationen wie Nickel, Eisen und Gallium beladen. IMAC-*Beads* finden weite Verbreitung im *Life Science* Bereich. Neben der weitverbreiteten Aufreinigung von His-tag-Proteinen ist seit einigen Jahren diese Technik ein oft benutztes Verfahren für die Anreicherung von phosphorylierten Peptiden. Obwohl inzwischen TiO_2 -Säulen und diverse modifizierte Oberflächen für die Phosphopeptid-Analytik mehr und mehr Verwendung finden, bleibt IMAC bis dato die meist genutzte Plattform für phosphorylierte Peptide. Trotz des breiten Einsatzgebietes der IMAC-*Beads* im Phosphoproteomics-Bereich gibt es bis heute keine eingehende, breitangelegte Charakterisierung der Methode. Deshalb wurde diese Technik im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Detail im Hinblick auf Selektivität, Sensitivität und Effizienz für die Aufreinigung von Phosphopeptiden untersucht.

Die Herstellung der selbstgepackten IMAC-Säulen in Gelloadertips erwies sich als weitaus weniger problematisch im Vergleich zu den Graphit-Säulen. Während das Befüllen mit Graphit lediglich eine Erfolgsquote von etwa 30 % hatte, war die Handhabung mit IMAC-*Beads* wesentlich effizienter. Aufgrund des viel größeren Durchmessers der *Beads* kam es so gut wie nie zum Blockieren der Pipettenspitzen.

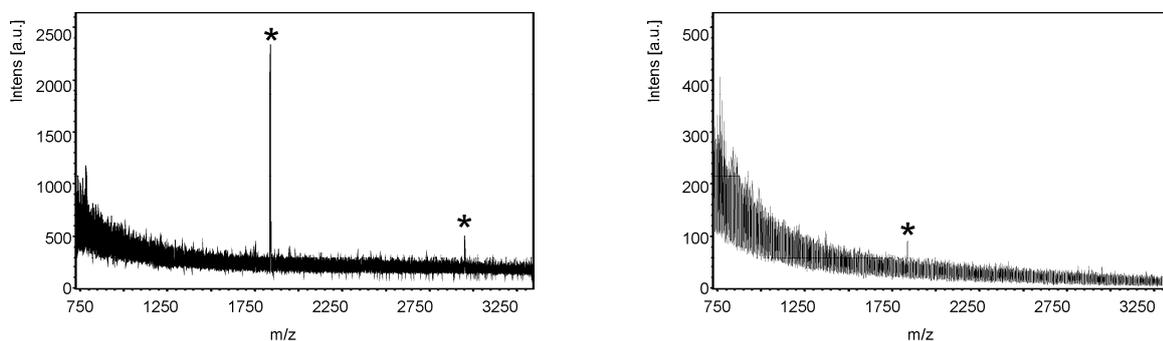


Abb. 3.7: Aufreinigung von Phosphopeptiden mit IMAC. Beispielspektren für 100 fmol (links) und 10 fmol (rechts) Aufreinigung eines β -Casein-Verdau mit IMAC-*Beads*

Für relativ unkomplexe Proben, wie etwa einen β -Casein-Verdau, liegt die Nachweisgrenze der eingesetzten IMAC-*Beads* bei etwa 100 fmol. In Abb. 3.7 sind repräsentative

Beispielspektren dargestellt, die aus den Eluaten erhalten worden sind. Links für die Aufreinigung von 100 fmol, rechts für 10 fmol. Man erkennt deutlich, dass bis zu einer Menge von 100 fmol das einfach phosphorylierte Peptid mit einem guten S/N-Verhältnis detektierbar ist, während für das größere, vierfach phosphorylierte bei 3122 Da das Detektionslimit fast erreicht ist. Steht eine geringere Probenmenge zur Verfügung, so ist die Aufreinigung nicht befriedigend. Das rechte Spektrum in Abb. 3.7 zeigt das Eluat von 10 fmol Phosphoprotein-Verdau. Lediglich für das Monophosphopeptid ist ein Signal mit einem S/N-Verhältnis von 3:1 sichtbar, während das größere Phosphopeptid gar nicht mehr detektierbar ist. Bei der Untersuchung des *Flow-Through* fiel auf (Abb.3.8), dass keine Phosphopeptide messbar waren, welches die Schlussfolgerung zulässt, dass diese an den *Beads* gebunden sind. Erstaunlicherweise aber waren die Signale für die Analyten nur sehr schwach oder gar nicht im Eluat nachweisbar. Bei näherer Betrachtung der Waschlösungen tauchten die Signale für Phosphopeptide auf, d.h. die Bindung der Phosphopeptide an die *Beads* ist zu schwach, um Kontaminanten wegzuwaschen und gleichzeitig Analyte nicht zu entfernen.

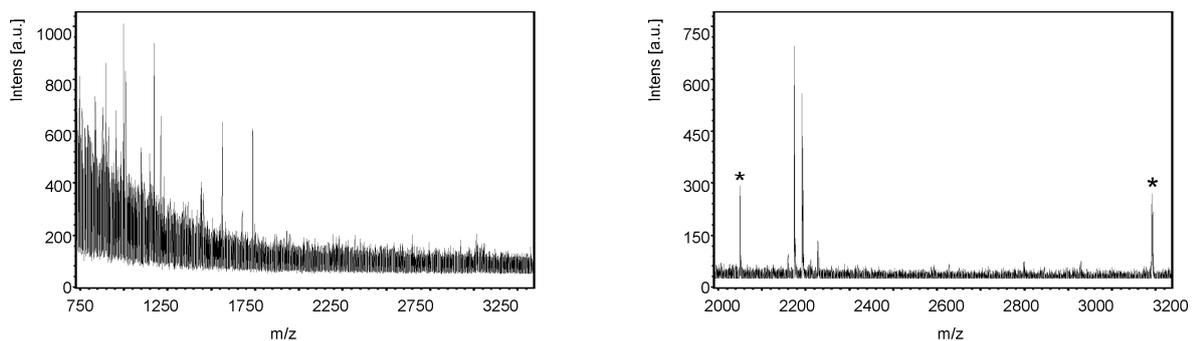


Abb. 3.8: Verlust von Phosphopeptiden mit IMAC. Flowthrough (links) und Waschlösung (rechts) bei der Aufreinigung von 100 fmol β -Casein-Verdau mit IMAC-Beads. Phosphopeptide sind mit * gekennzeichnet.

3.2.2.1 Spezifität von IMAC-Beads

Während man für einen β -Casein Verdau recht gute Ergebnisse mit IMAC-Beads erzielen kann, so fällt das Ergebnis für die Aufreinigung einer komplexeren Probe deutlich anders aus. Beim Ovalbumin ist der Phosphorylierungsgrad wesentlich geringer als beim β -Casein. Erschwerend kommt hinzu, dass der Hintergrund an unphosphorylierten Peptiden beim Ovalbumin aufgrund des höheren Molekulargewichts im Vergleich zum β -Casein wesentlich höher ist.

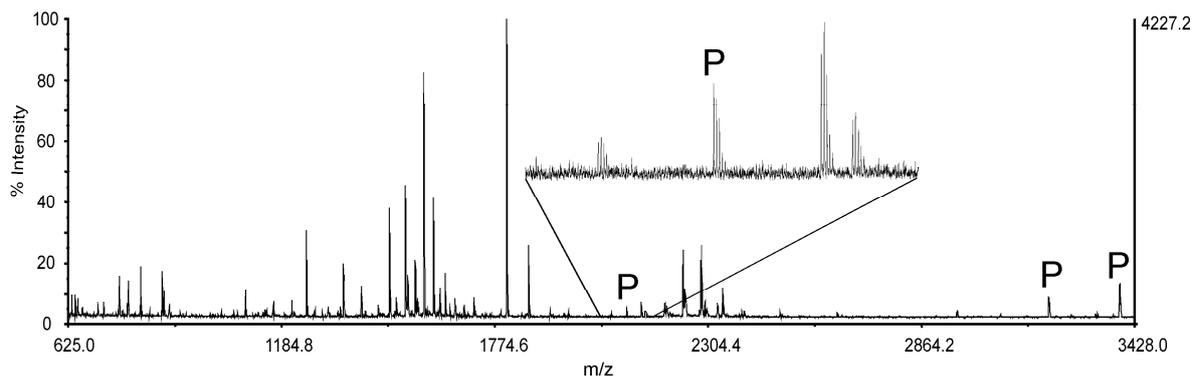


Abb. 3.9: Beispielspektrum für die Aufreinigung von 1 pmol Ovalbuminverdau mit IMAC-Beads. Neben den mit „P“ markierten Phosphopeptiden sind noch viele andere nicht-phosphorylierte Peptide im Eluat sichtbar.

In Abb. 3.9 wird diese Problematik deutlich. Die eingesetzten IMAC-Beads sollten eigentlich nur Phosphopeptide anreichern. Man erkennt aber im Eluat neben den drei mit „P“ markierten Phosphopeptiden noch eine sehr große Anzahl an unmodifizierten Peptiden, welche auch an das IMAC-Material unspezifisch binden. Die unspezifische Bindung stellt eine große Problematik beim Einsatz der IMAC-Technik für Phosphoproteinverdau mit niedrigem Phosphorylierungsgrad dar, wie dies beim Ovalbumin der Fall ist.

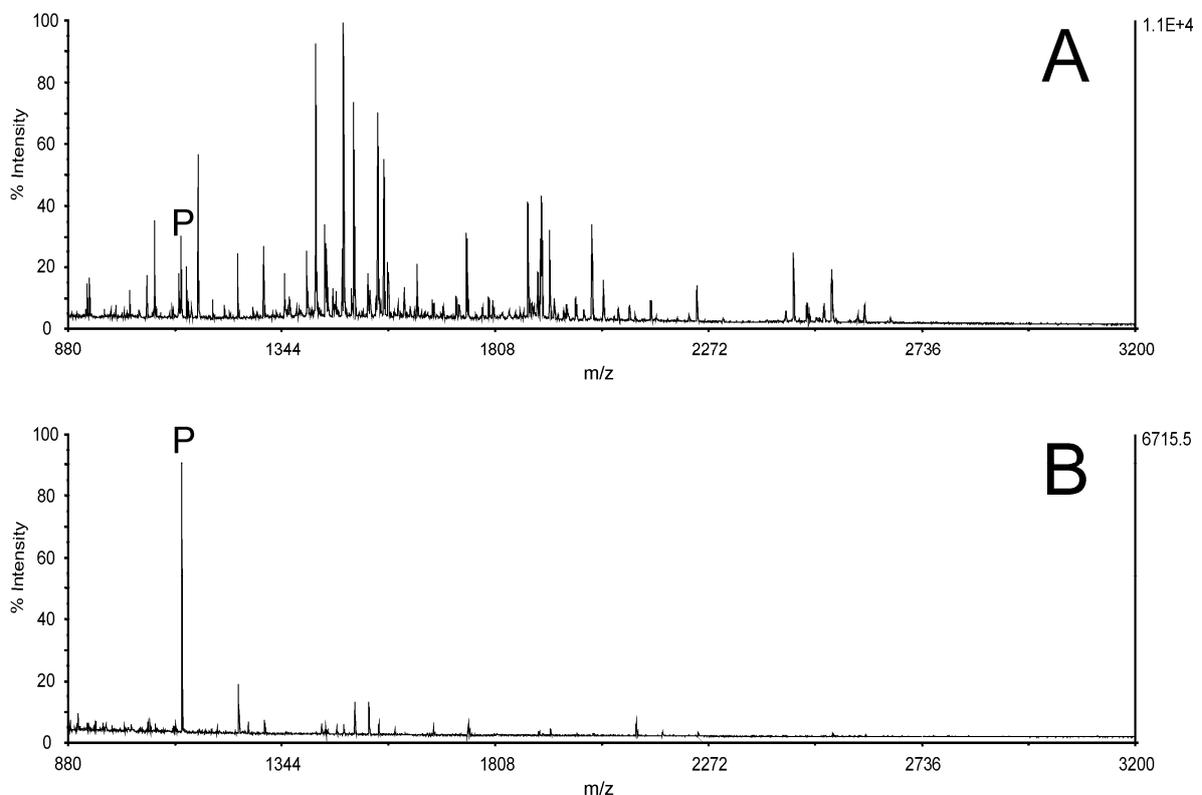


Abb. 3.10: Aufreinigung von 100 fmol phosphoryliertem Angiotensin II in 100 fmol BSA-Verdau mit IMAC. Negativkontrolle ohne Aufreinigung (A) und Eluat (B).

Bei der Aufreinigung eines einzelnen phosphorylierten Peptids in einem equimolaren Hintergrund an unmodifizierten Peptiden sind bereits erste unspezifische Bindungen detektierbar (Abb. 3.10). Zwar werden die meisten BSA Peptide eliminiert, dennoch binden bereits unphosphorylierte Peptide an die IMAC-Beads. Das Phosphopeptid wird nahezu quantitativ angereichert, was aus den identischen Signalintensitäten des Analyten vor und nach der Aufreinigung geschlossen werden kann.

Bei einem zehnfachen Überschuss an Hintergrund (Abb. 3.11) weist zwar das Phosphopeptid die höchste Signalintensität auf, allerdings sind im Eluat deutlich unphosphorylierte Peptide mit hohen S/N-Werten detektierbar. Dies zeigt deutlich, dass es bereits bei einem Verhältnis von 1:10 von Phosphopeptid zu Hintergrund erhebliche Probleme mit der unspezifischen Bindung von unmodifizierten Peptiden gibt. Für Titandioxid ist berichtet, dass DHB im Ladepuffer die unspezifische Bindung vermindern kann (Larsen *et al.*, 2005). Leider wird in der Publikation lediglich angedeutet, dass diese Prozedur bei IMAC nicht funktioniert, ohne diesen Aspekt näher zu beleuchten.

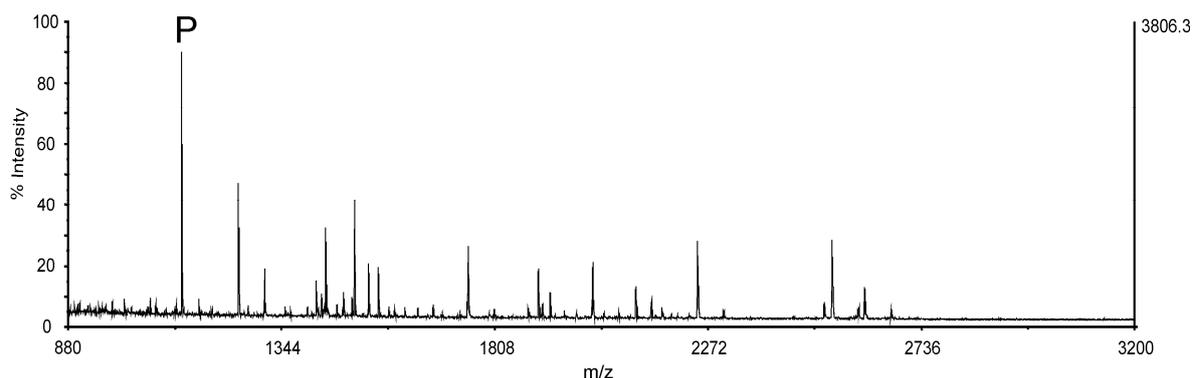


Abb. 3.11: Eluat der Aufreinigung von 100 fmol Phosphopeptid in 1 pmol BSA-Verdau mit IMAC (1:10). Das Phosphopeptid ist mit „P“ gekennzeichnet.

Tabelle 3.2 gibt die Aminosäuresequenzen der gebundenen, unphosphorylierten Peptide an. Man erkennt, dass mit einer Ausnahme sämtliche Peptide sauren Charakter haben. Sie weisen fast durchgehend negative Gravy-Scores aus, d.h. die Peptide sind hydrophil. Diese Beobachtung deckt sich mit den Berichten aus der Literatur. Wird die gleiche Probe, aber diesmal mit DHB in der Probenlösung, aufgereinigt, so ist kaum eine Reduktion der unspezifischen Bindung zu beobachten.

MH+	Aminosäuresequenz	PI	Gravy	ohne DHB	mit DHB
1163,64	R.LVNELTEFAK.T	4,53	0,130	✓	
1193,62	R.DTHKSEIAHR.F	6,92	-1,700		✓
1249,62	R.FKDLGEEHFK.G	5,45	-1,250	✓	✓
1305,71	K.HLVDEPQNLIK.Q	5,32	-0,582		✓
1419,69	K.SLHTLFGDELCK.V	5,30	0,058	✓	
1439,82	R.RHPEYAVSVLLR.L	8,75	-0,133	✓	✓
1478,55	R.ETYGDMADCCCK.Q	3,92	-0,967	✓	
1502,61	K.EYEATLEECCA.K.D	3,58	-0,327	✓	
1532,79	K.LKECCDKPLLEK.S	6,17	-0,617	✓	✓
1554,66	K.DDPHACYSTVFDK.L	4,41	-0,823	✓	
1639,97	R.KVPQVSTPTLVEVSR.S	8,75	-0,067		✓
1747,71	K.YNGVFQECCQAEDK.G	4,14	-0,914	✓	
1749,68	K.ECCHGDLLECADDR.A	4,10	-0,621	✓	
1901,87	R.NECFLSHKDDSPDLPK.L	4,66	-1,275	✓	✓
1927,81	K.CCAADDKEACFAVEGPK.L	4,32	-0,124	✓	
2019,97	K.LKPDPNTLCDEFKADEK.K	4,44	-1,288	✓	✓
2045,03	R.RHPYFYAPELLYYANK.Y	8,39	-0,812		✓
2113,89	K.VHKECCHGDLLECADDR.A	4,80	-0,682	✓	✓
2148,06	K.LKPDPNTLCDEFKADEKK.F	4,86	-1,433	✓	✓
2247,96	K.ECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,23	-0,458	✓	✓
2541,17	K.QEPERNECFLSHKDDSPDLPK.L	4,58	-1,762	✓	✓
2612,16	K.VHKECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,86	-0,527	✓	✓

Tab. 3.2: Unspezifische Bindung an IMAC (1:10).

Als Untersuchungsobjekt dienten 100 fmol Phosphopeptid und 1 pmol BSA-Verdau als Hintergrund.

3.2.3 Analyse von Phosphopeptiden mit bis-NTA-Oberflächen

Die Ausbildung von SAMs ist an die Grundbedingung einer homogenen, sauberen Goldschicht geknüpft. Die direkte Bedampfung von Objektträgern aus Glas mit Gold, wie es beispielsweise zur Herstellung der Leitfähigkeit von ESI-Nadeln geschieht, ist gänzlich ungeeignet. Die aufgedampfte Goldschicht haftet auf Glassubstraten nur sehr schlecht. Die Adhäsion von Goldpartikeln auf Glas ist zu schwach, um eine homogene und ausreichend dicke Schicht auszubilden, die eine unspezifische Bindung an den Glasuntergrund verhindert. Die unzureichende Haftung von Gold direkt auf Glas kann umgangen werden durch Aufdampfen von Chrom als Zwischenschicht. Im Gegensatz zu Gold besitzt Chrom eine ausserordentlich gute Adhäsion auf Glas. Diese Chromschicht ist hinreichend robust und kann auch nicht mechanisch durch Abkratzen entfernt werden. Auf dem etwa 2,5 nm dicken Chromfilm bleibt das Gold wesentlich besser haften als auf Glas. Das aufgedampfte Gold mit einer Höhe von etwa 150 nm bildet eine homogene, lichtundurchlässige Schicht, welche

mechanisch robust und kratzfest ist. Da beim späteren Arbeiten die Oberflächen Lösemitteln und Säuren ausgesetzt sind, muss sichergestellt werden, dass diese durch solche chemischen Reize nicht angegriffen werden.

Mit der Zwischenschicht aus Chrom und dem sich darauf befindlichen Gold ist eine robuste Basis für die Herstellung von modifizierten Oberflächen geschaffen. Beim Experimentieren mit den Goldoberflächen stellte sich heraus, dass diese einen sehr hydrophilen Charakter haben. Als Konsequenz für die praktischen Arbeiten bedeutet dies, dass mit organischen Lösemitteln sehr vorsichtig umgegangen werden muss. Reines Acetonitril etwa zerläuft unkontrolliert über die gesamte Fläche. Aufgetragene Proben sollten deshalb eine Acetonitrilkonzentration von 20 % nicht überschreiten, da das Zerlaufen der Flüssigkeit zu Probenkontaminationen führen kann. Die große Fläche, die Proben mit höheren Konzentrationen an organischem Lösemittel einnehmen, verursacht eine gewisse Verdünnung der Probe, da pro Flächeneinheit weniger Analyt vorhanden ist.

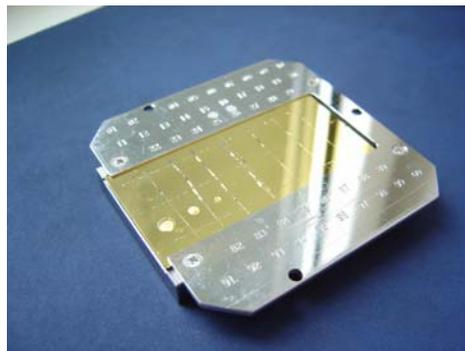


Abb. 3.12: MALDI-Probenteller mit modifizierter bis-NTA-Oberfläche

3.2.3.1 Etablierung der bis-NTA-Oberflächen mittels Aufreinigung von His-tag-Proteinen

In Anlehnung an Vorarbeiten von Tinazli *et al.*, 2005 wurden Gold-Oberflächen hergestellt, wobei eine Mischung aus Bis-NTA-Thiolen und Matrixthiolen eingesetzt wurde. Das Bis-NTA besitzt durch seine multivalente Kopfgruppe chelatisierende Eigenschaften und wird in der Immobilisierung von rekombinanten Proteinen für SPR-(*Surface Plasmon Resonance*) und AFM (*Atomic Force Microscopy*)-Experimente eingesetzt. Um die Effizienz der Methode zu untersuchen, wurde eine Reihe von Experimenten mit His-tag-Proteinen durchgeführt. Ziel sollte es sein, selektiv *getaggte* Proteine an die Oberfläche zu binden und per MALDI-TOF die Totalmasse des Proteins zu bestimmen. Im Hinblick auf die spätere Nutzung der

Oberfläche für die Anreicherung von Phosphopeptiden sollten Parameter wie Sensitivität und Selektivität untersucht werden.

Die erste Frage, die sich zunächst stellte war, wie hoch die unspezifische Bindung an die Oberfläche durch Adhäsion von Proteinen an die SAM, das Gold oder das sich darunter befindliche Glas ist.

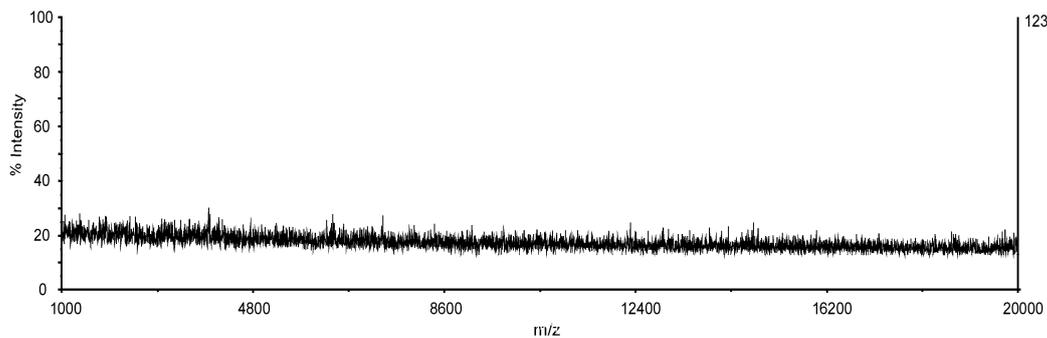


Abb. 3.13: Unspezifische Bindung an die bis-NTA-Oberfläche. Keine Signale für Analyten eines 4 Komponenten-Peptid/Protein-Gemisches (10^{-5} M) sind detektierbar, da die enthaltenen Biomoleküle nicht mit einem His-tag versehen sind.

Die Abb. 3.13 zeigt die überaus geringe bzw. nicht detektierbare unspezifische Bindung an die Bis-NTA-Oberfläche. In dem vorliegenden Versuch wurde eine Vierkomponentenmischung aus Angiotensin I, Melittin, Insulin und Cytochrom C in einer hohen Gesamtkonzentration (10^{-5} M) aufgetragen. Die Oberfläche wurde mit Nickelionen aktiviert, die Probe aufgetragen und anschließend stringent gewaschen (s. 2.8). Für die MALDI-Messung diente DHBs / 0,1 % TFA als Matrix. Als Schlussfolgerung lässt sich ableiten, dass Proteine ohne einen Hexahistidinrest weder an die Nickelionen noch an die SAMs bzw. die Goldoberfläche binden.

Als Testprotein wurde humanes Ubiquitin gewählt, welches am N-Terminus einen Hexahistidinrest trägt und in *E. coli* überexprimiert wurde. Die Aminosäuresequenz des Proteins lautet:

MGSS**HHHHHH**HSSGLVPRGSHMQIFVKLTGKITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPP
DQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGG.

Das Protein hat eine Masse von etwa 10,7 kDa, welches sich sehr sensitiv im Linearmodus eines MALDI-TOF-Instrumentes messen lässt.

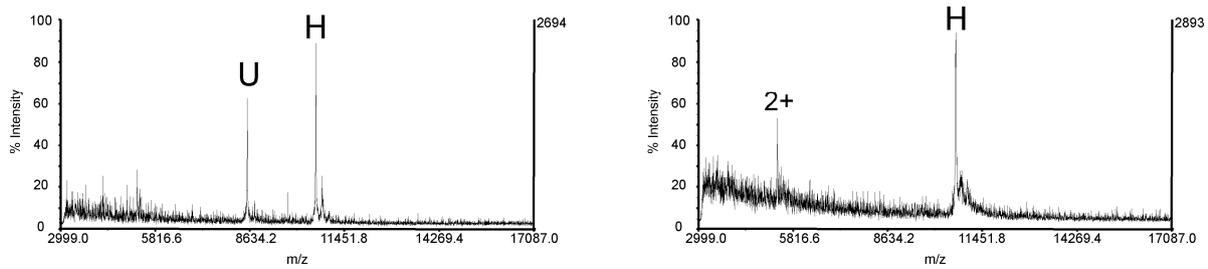


Abb. 3.14: Anreicherung von His-tag-Proteinen mit der bis-NTA-Oberfläche. Aufreinigung einer äquimolaren Mischung (10^{-7} M) aus unmodifiziertem Ubiquitin (U) und His-tag-Protein (H). Links: Kontrolle ohne Aufreinigung. Rechts: nach der Aufreinigung mit der Oberfläche.

Aus einer äquimolaren Mischung eines unmodifizierten Proteins und eines His-tag-Proteins konnte selektiv das N-terminal modifizierte Protein aufgereinigt werden. Im Kontrollspektrum in Abb. 3.14 sind die Signale des unmodifizierten Proteins und des His-tag-Proteins in etwa gleich stark. Nach der Aufreinigung auf der Bis-NTA-Oberfläche ist nur noch das modifizierte Ubiquitin mit einem sehr guten S/N-Verhältnis zu detektieren. Im Spektrum findet man neben dem einfach geladenen, auch noch das zweifach geladene Ion.

Da die untersuchte Probe noch nicht sehr komplex war, wurde ein 50facher Überschuss an unmodifiziertem Protein zu His-tag-Protein als Untersuchungsobjekt gewählt (10 pmol unmodifiziertes Protein und 200 fmol His-tag-Protein). In der Negativkontrolle ist das dominierende Signal dem unmodifizierten Protein zuzuordnen. Dabei ist neben dem einfach geladenen, auch das zweifachgeladene Ion zu erkennen. Jedoch ist im Spektrum das His-tag-Protein nur mit einem geringen S/N-Verhältnis von 6:1 detektierbar (s. vergrößerten Ausschnitt in Abb. 3.15). Nachdem das Protein mit Hexahistidinrest an die immobilisierten Nickelionen gebunden hat, und das sich im fünfzigfachen Überschuss befindliche, unmodifizierte Protein durch Waschen von der Oberfläche entfernt wurde, ist nur noch das His-tag-Protein als einfach und doppelt geladenes Ion im MALDI-TOF bei der der Messung im Linearmodus detektierbar. Dieses Resultat zeigt eindrucksvoll, dass das mit Nickelionen beladene Bis-NTA eine sehr hohe Affinität zu His-tag-Proteinen hat. Die Bindung ist so stark, dass durch stringentes Waschen Kontaminanten in fünfzigfachem Überschuss entfernt werden können, während der Analyt nahezu quantitativ von der Oberfläche eluiert werden kann.

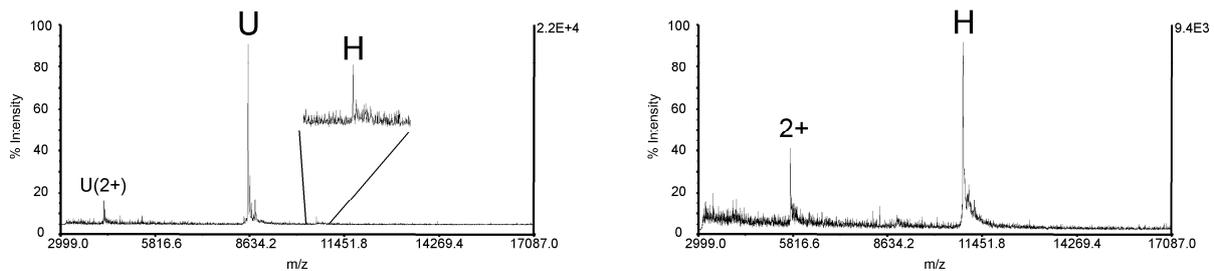


Abb. 3.15: Aufreinigung von His-tag-Proteinen aus komplexen Proben. Aufreinigung einer 50:1 Mischung von Ubiquitin (U) mit His-tag-Protein (H). Links: Kontrolle. Rechts: Spektrum nach der Aufreinigung

Das Anbringen eines Hexahistidinrestes an ein Protein über rekombinante Proteinexpression wird meist in *E. coli* durchgeführt. Der His-tag hat den Vorteil, dass er dem Protein nur eine geringe Masse hinzuaddiert, während die Tertiärstruktur des Proteins in der Regel nicht beeinflusst wird. Um das Protein zu isolieren wird häufig eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels IMAC-Technologie durchgeführt. Meist sind an den Oberflächen der *Beads* Chelatoren wie IDA oder NTA immobilisiert, die mit Nickel- oder seltener mit Zinkionen beladen sind. Die Aufreinigung mit dieser auf *Beads* basierenden Methode ist meist unbefriedigend, da sie durch eine äusserst hohe unspezifische Bindung gekennzeichnet ist. Im weitaus häufigsten Fall wird mit Imidazol eluiert, welches kompetitiv das Protein mit dem His-tag verdrängt.

Von sehr großem Interesse ist die Möglichkeit, die Aufreinigung und MS-Analyse von rekombinanten Proteinen direkt auf einem einzigen modifizierten MALDI-Probenteller. In relativ kurzer Zeit könnte das Protein aufgereinigt von den restlichen zellulären Bestandteilen des Zelllysates vorliegen, und direkt die Totalmasse des Analyten per MALDI-TOF ermittelt werden. So könnte man eine effiziente Methode für die schnelle Qualitätskontrolle von rekombinanten Proteinen mit einem His-tag nutzen. Um eine solch komplexe Problemstellung analytisch zu lösen, wurde der mit Bis-NTA modifizierte Probenteller eingesetzt, um sehr geringe Mengen eines His-tag Proteins aus einem *E. coli* Lysat zu isolieren und per MS zu charakterisieren.

Für die Aufnahme des MALDI-TOF Spektrums der Kontrolle in Abb. 3.16 wurde zunächst wie in den vorher beschriebenen Experimenten mit DHBs als Matrix präpariert. Im Gegensatz zu den bisherigen Proben ist das Zelllysate eine wesentlich komplexere analytische Herausforderung, da es deutlich mehr Verunreinigungen enthält. Neben diversen Proteinen enthält das Lysat noch eine ganze Reihe verschiedenster Substanzen wie Puffer und Salze. Deshalb konnte mit DHBs überhaupt keine Kristallisation der Matrix-Analyt-Mischung in der klassischen *dried-droplet* Präparation festgestellt werden. Erst durch Wechsel der Matrix zur Sinapinsäure konnte ein befriedigendes Spektrum generiert werden. Zwar kristallisierte die

Sinapinsäure im Gegensatz zum DHBs, allerdings hatten die Kristalle ein abweichendes Aussehen zu Präparationen mit sauberen Proben. Die Kristalle hatten eine ungleichmäßige Gestalt und besaßen keine eindeutige Grenzschicht. Erst durch Waschen der Präparation mit kalter Ameisensäure erhielt man feine, punktförmige Kristalle. Von diesen Kristallen konnten Proteine und Zellbestandteile im MALDI-TOF desorbiert und ionisiert werden. Man erkennt in Abb. 3.16 eine Vielzahl von unterschiedlichsten Signalen im gesamten dargestellten Massenbereich. Interessanterweise kann im Kontrollspektrum das in einer Konzentration von 150 fmol/μL vorliegende His-tag-Protein nicht detektiert werden, da es durch zahlreiche andere Kontaminaten im selben m/z-Bereich überlagert wird. Durch spezifisches Binden des rekombinaten Proteins und Entfernen von Protein- und Zellverunreinigungen des Zellysates konnte nach Elution mit DHBs das His-tag-Protein selektiv im MALDI-TOF detektiert werden. Neben dem Signal für den einfach geladenen Analyten erkennt man noch das zweifachgeladene Ion. Darüberhinaus sind aber keine anderen Signale mehr mit signifikant hohen S/N-Verhältnissen zu finden.

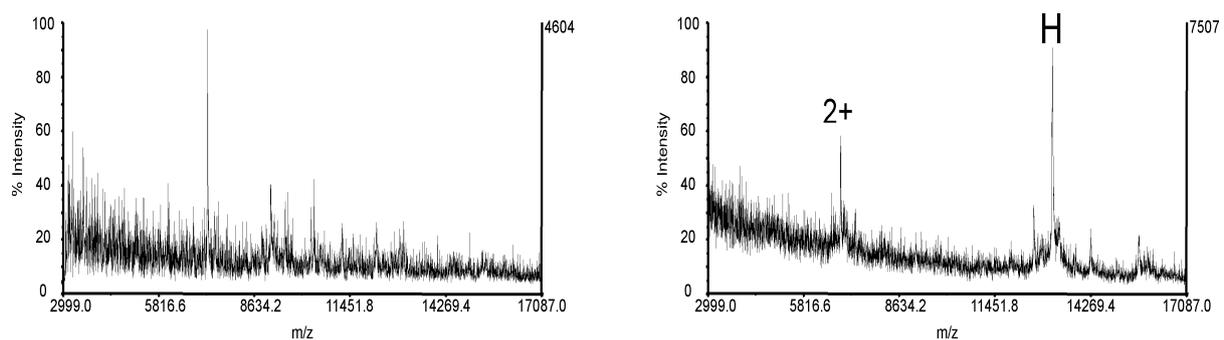


Abb. 3.16: *Aufreinigung von 150 fmol His-tag-Protein aus einem E. coli Zellysat. Links: Kontrollspektrum mit Sinapinsäure als Matrix. Rechts: MALDI-Spektrum nach Aufreinigung auf Bis-NTA-Oberfläche.*

Mit der Anwendung des mit Bis-NTA modifizierten Probenellers für die Aufreinigung von His-tag-Proteinen konnte ein effizientes Protokoll etabliert werden, welches auf der Anreicherung und direkten massenspektrometrischen Vermessung des gebundenen Analyten mit einem chemisch modifizierten MALDI-Probeneller beruht. Auch im Hinblick auf die Auflösung konnte mit dem modifizierten Probeneller kein Unterschied zu einem normalen Edelstahl-Probeneller beobachtet werden.

Gerade am Beispiel der Aufreinigung aus einem Zellysat lässt sich die sehr gute Aufreinigungseffizienz dieser Technik demonstrieren. Normalerweise hätte man bei solch einer komplexen Probe mehrere Chromatographieschritte vor einer Anreicherung der Phosphopeptide (etwa mit IMAC) z.B. in Form einer zweidimensionalen LC vorlagern müssen. Mit der hier dargestellten Methode konnte man die Aufreinigung auf eine einzige

Methode reduzieren. Die Bis-NTA Oberfläche sollte nun als technische Plattform eingesetzt werden, um Phosphopeptide selektiv anzureichern und per MS zu charakterisieren.

3.2.3.2 Bis-NTA-Oberflächen für die Aufreinigung von Phosphopeptiden

Die Nutzung des mit Bis-NTA modifizierten MALDI-Probentellers erwies sich für die Messung von Proteinen mit His-Tag als äußerst effizient. Die Nutzung dieser Oberfläche für die Anreicherung und Messung von Phosphopeptiden wurde bis dato noch von keiner Gruppe eingehend untersucht. Das Protokoll aus der Aufreinigung von His-tag-Proteinen konnte nicht 1:1 auf die Analyse von Phosphopeptiden übertragen werden, da beide Analytspezies sich deutlich unterscheiden. Die Messung der His-tag-Proteine geschah auf Proteinebene, während die Analyse von phosphorylierten Proteinen auf Peptidebene stattfindet. Der Sprung von der Proteinebene zur Peptidebene bietet sich an, da eine Charakterisierung aufgrund der benötigten Massengenauigkeit und der Möglichkeit der Fragmentierungsanalyse für Peptide mit den heute eingesetzten Geräten weitestgehend etabliert sind. Der Einsatz der Bis-NTA-Oberfläche für phosphorylierte Peptide erfordert eine grundlegende Veränderung des Aufreinigungsprotokolls, da nun Analyten nicht als Proteine, sondern als Peptide vorliegen. Da es sich bei Phosphopeptiden aber um sehr spezielle Peptide handelt, mussten eine Reihe von Parametern und Bedingungen des Aufreinigungsprotokolls angepasst und ermittelt werden.

Da die Aufreinigung von Phosphopeptiden aus einem einzigen Mikroliter geschieht, und dieses Probenvolumen auf dem modifizierten Probenteller nur eine Fläche von wenigen Quadratmillimeter einnimmt, wurde die Bindekapazität, welches ein wichtiges Kriterium für die Leistungsfähigkeit einer Oberfläche ist, bestimmt. Die Bindekapazität für Phosphopeptide sollte möglichst hoch sein, um zu gewährleisten, dass alle Analyten, die auf den Probenteller gegeben werden auch gebunden werden können, da ansonsten Probenverluste entstehen können.

Für die Bestimmung der Bindekapazität der Bis-NTA-Oberfläche wurden fünf verschiedene Probenteller anhand ihrer Bindung von steigenden Konzentrationen eines reinen Phosphopeptids untersucht. Die Lösungen enthielten ein Phosphopeptid in den Konzentrationen von 550 fmol/ μL bis 1 pmol/ μL (in 50 fmol Schritten). Jeweils 1 μL an Probe wurde in insgesamt drei Wiederholungen für 30 Minuten auf die mit Ga(III)-Ionen beladene Oberfläche zur Inkubation gegeben. Von der aufgetragenen Probe wurde nach der Inkubationszeit etwa 0,5 μL entnommen, auf einen unmodifizierten Probenteller aus Edelstahl

überführt und vermessen. Die auf der modifizierten Oberfläche befindliche Probe wurde gewaschen, der gebundene Analyt mit DHB / 1 % Phosphorsäure eluiert und direkt vermessen.

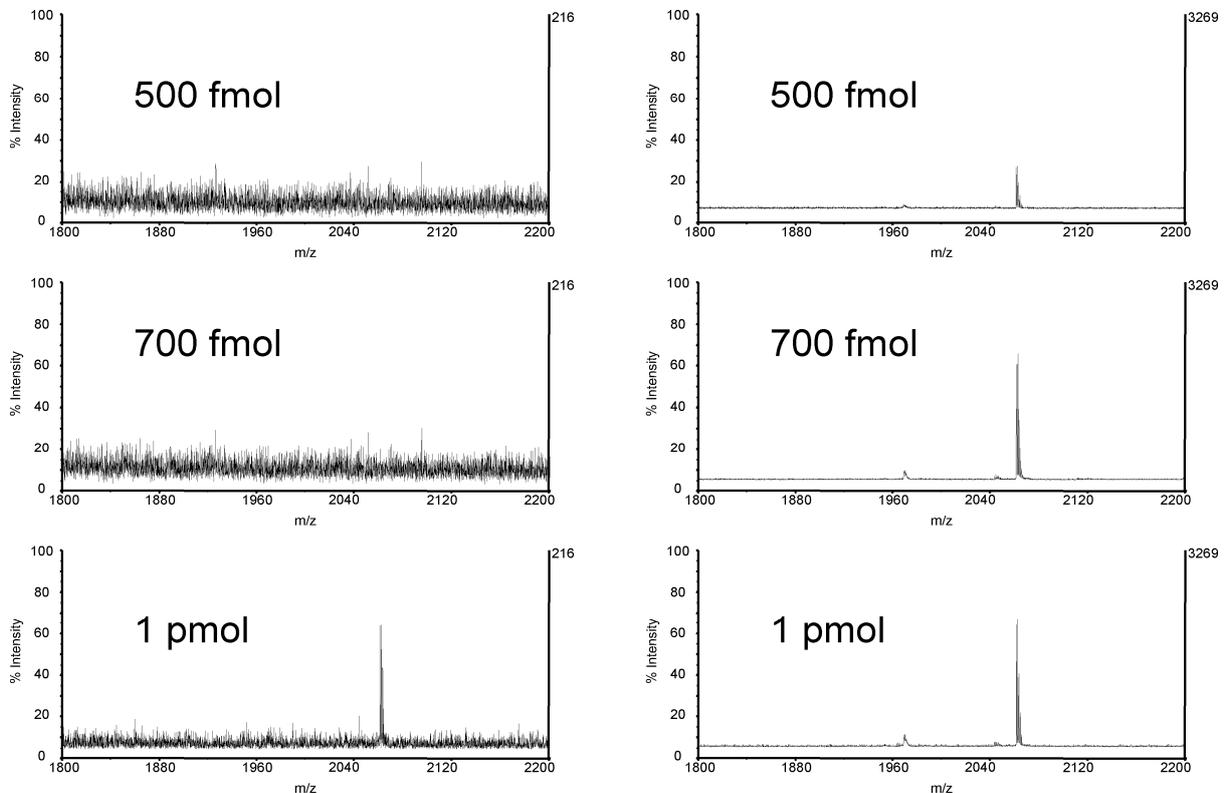


Abb. 3.17: Ermittlung der Bindekapazität der bis-NTA-Oberfläche für Phosphopeptide. Linke Spalte: Spektren der Lösungen aus den Probenüberständen, die auf einen Edelstahl-Probenteller überführt wurden. Rechte Spalte: Spektren von den gebundenen Phosphopeptiden auf dem modifizierten Probenteller.

Da den Oberflächen steigende Mengen an Phosphopeptiden angeboten werden, nimmt die Signalintensität für gebundene Analyten im Eluat kontinuierlich zu (s. rechte Spalte in Abb. 3.17). Wird die Bindekapazität erreicht, so nimmt die Signalstärke im Eluat nicht mehr zu. Parallel hierzu kann bis zum Erreichen der maximalen Bindekapazität aus dem Teil des Überstandes der Probe, der auf einen Edelstahlprobenteller überführt wurde, kein Signal erhalten werden. Erst mit Überschreiten der Bindekapazität wird der nicht gebundene Anteil aus dem Überstand der Probe detektiert (s. linke Spalte in Abb. 3.17).

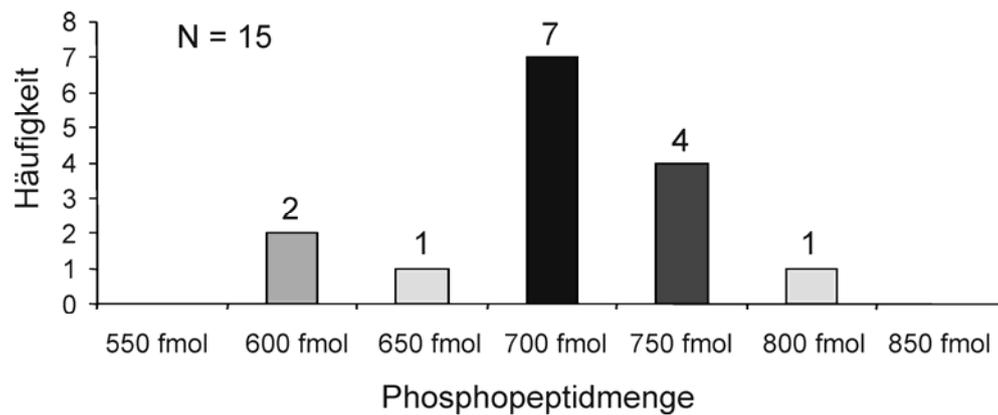


Abb. 3.18: Darstellung der absoluten Bindekapazität der Bis-NTA-Oberfläche

Aus Abb. 3.18 kann die mittlere Bindekapazität mit 700 fmol bis 750 fmol entnommen werden. Zur Durchführung zur Bestimmung der Bindekapazität siehe Kapitel 2.9.3.

Für eine Fläche von etwa zwei Quadratmillimetern ist dieser Wert ausgesprochen hoch. Für Proteomics-Anwendungen ist diese Kapazität ideal, da in der Regel proteolytische Verdau von Proteinen aus Gelen oder in Lösung generierte Peptidkonzentrationen in diesem Bereich liegen. Mit der dargebotenen Bindekapazität können Phosphopeptidmengen gebunden werden, die neben der Möglichkeit der Peptidmassenbestimmung auch eine Sequenzanalyse für die Bestimmung der exakten Phosphorylierungsstelle mittels MALDI-MS/MS oder nach Elution des Analyten mit ESI-MS/MS zulassen.

Gegenübergestellt zu der bis dato am häufigsten benutzten Technik zur Anreicherung von Phosphopeptiden, nämlich der IMAC-Technik, ist die Analyse der Proteinphosphorylierung mit dem mit Bis-NTA modifizierten MALDI-Probenhalter im Hinblick auf Sensitivität vergleichbar.

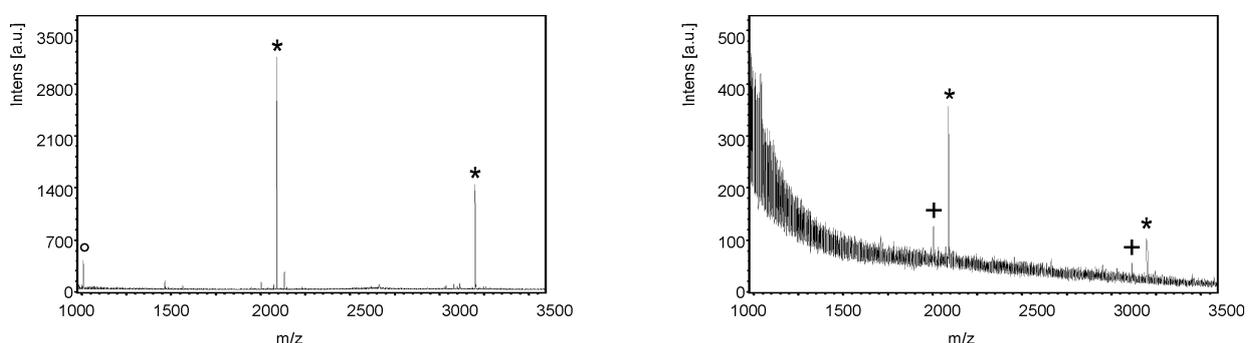


Abb. 3.19: Aufreinigung von Phosphopeptiden mit der bis-NTA-Oberfläche. Rechts: Eluat von 100 fmol β -Casein-Verdau, links: Eluat von 10 fmol Verdau Phosphopeptide sind mit * markiert. + = Neutralverlust, ° = zweifachgeladenes Signal für das Monophosphopeptid.

Bei der Aufreinigung von 100 fmol β -Casein-Verdau mit der Bis-NTA-Oberfläche sind beide Phosphopeptide mit sehr guten S/N-Verhältnissen im Spektrum zu erkennen (Abb. 3.19). Selbst die Analyse von lediglich 10 fmol Phosphoproteinverdau ergab gut detektierbare

Signale für beide Phosphopeptide des β -Caseins. Dabei ist das vierfach phosphorylierte Peptid, welches beim Einsatz von IMAC-Beads nicht detektierbar war, hier mit einem S/N-Verhältnis von 20:1 erkennbar. Für reale Proben, bei denen Peptide in der Tat im niedrigen Femtomolbereich vorliegen, ist der mit Bis-NTA modifizierte Probensteller eine vielversprechende Technik, um Phosphopeptide anzureichern, während bei solchen Mengen IMAC-Beads bereits an ihre Detektionsgrenze stoßen.

Da im Arbeitskreis noch keine Erfahrungen zur Bis-NTA-Oberfläche vorlagen, war zunächst unklar, inwieweit der modifizierte Probensteller im täglichen Gebrauch zuverlässige und reproduzierbare Daten liefert. Deshalb wurden in fünf verschiedenen Ansätzen hergestellte Probensteller fünfmal zur Aufreinigung von 700 fmol eines β -Casein-Verdaus herangezogen und die ermittelten Signalintensitäten ausgewertet.

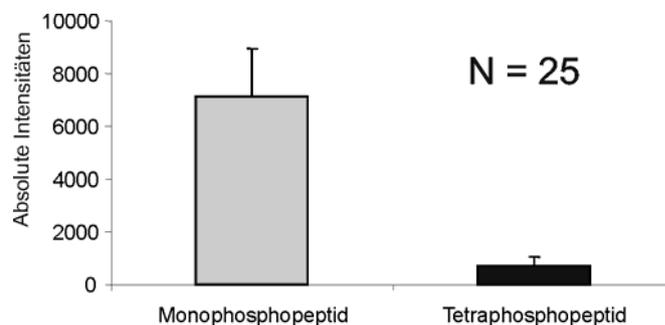


Abb. 3.20: Reproduzierbarkeit der bis-NTA-Oberfläche. Gezeigt sind die ermittelten Signalintensitäten für die Anreicherung von je 700 fmol β -Casein-Verdau.

Die Reproduzierbarkeit der Aufreinigung mit dem modifizierten Probensteller ist sehr gut. Es wurden weder große Schwankungen auf demselben Probensteller beobachtet, noch differierten die Signale der Phosphopeptide zwischen den unterschiedlichen MALDI-Tellern. Die in Abb. 3.20 ersichtlichen Fehlerbalken sind im Rahmen von MALDI-Messungen übliche Schwankungen und sind nicht auf den modifizierten Probensteller zurückzuführen.

3.2.4 Anreicherung von Phosphopeptiden mit TiO₂-Säulen

Titandioxid als Chromatographiematerial für die selektive Anreicherung von phosphorylierten Peptiden aus Peptidgemischen ist in den letzten Jahren mehr und mehr eingesetzt und untersucht worden (Sano *et al.*, 2004; Larsen *et al.* 2005; Liang *et al.*, 2006; Thingholm *et al.*, 2009). Dabei wird es vornehmlich in HPLC-Vorsäulen oder wenn keine chromatographische Trennung erfolgt, in Pipettenspitzen gefüllt, um Phosphopeptide anzureichern. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf die Anreicherung von Phosphopeptiden im Offline-Modus, so dass HPLC-Vorsäulen außer Betracht lagen. Eine systematische Untersuchung zur Selektivität und Sensitivität ist mit gefüllten Pipettenspitzen einfacher und führt zu eindeutigeren Ergebnissen. Dabei sollte geklärt werden, inwieweit die dem TiO₂ zugesprochene höhere Selektivität im Vergleich zu IMAC-*Beads* tatsächlich gegeben ist und auch für komplexe Proben gilt.

Es wurden mit TiO₂ befüllte Gelloadertips (von Glygen), welche kommerziell erhältlich sind, für die Aufreinigung von Phosphopeptiden eingesetzt. Diese Fertigspitzen bieten den großen Vorteil, dass sie die zeitintensive Bepackung der Gelloadertips unnötig machen. Die Durchführung der Bepackung von Gelloadertips, wie in mehreren Publikationen beschrieben (Larsen *et al.*, 2005, Thingholm *et al.*, 2006), ist in zweierlei Hinsicht problematisch. Entweder verstopft die Spitze komplett, und es kann wegen des hohen Rückdrucks keine Flüssigkeit mehr aufgetragen, oder die eingefüllten Materialien werden durch entsprechenden Druck aus der Spitze befördert, was zum Verlust der Probe führt. Aus diesen Gründen wurden die kommerziellen, fertig befüllten Spitzen für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Titandioxid eingesetzt.

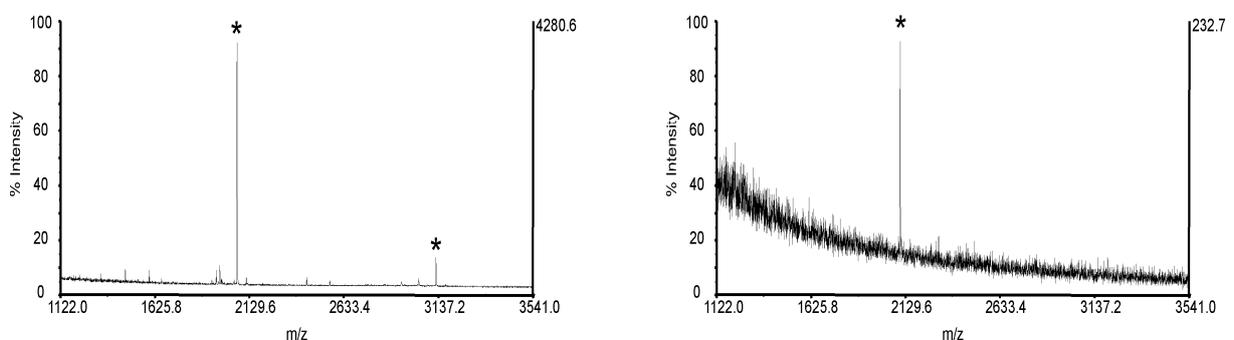


Abb. 3.21: Aufreinigung von Phosphopeptiden mit TiO₂. Beispielspektren für die Aufreinigung von β -Casein. Links 100 fmol, rechts 10 fmol.

Die Sensitivität der TiO₂-Säulen reicht für einen β -Casein-Verdau bis 100 fmol (Abb. 3.21). Liegt die Probenmenge darunter, so ist die Gefahr, dass das vierfachphosphorylierte Peptid nicht mehr detektierbar ist, gegeben. Im Spektrum des 100 fmol Verdau sind neben den beiden bekannten β -Caseins Phosphopeptiden noch eine Reihe anderer Analyte mit niedrigen S/N-Verhältnissen zu erkennen. Diese stammen durchwegs von Phosphopeptiden, die sich im Verdau befanden. Entweder resultierten sie vom Verdau des β -Caseins oder von α -Casein, welches als Verunreinigung in der Probe schon vorlag (siehe dazu in Kapitel 3.2.5.6). Im Vergleich zu IMAC-*Beads* sind TiO₂-Säulen sicherlich sensitiver. Ob sie aber auch spezifischer für Phosphopeptide sind, lässt sich nicht anhand eines β -Casein-Verdau erkennen, da die Probe nicht komplex genug ist. Der Hintergrund an unphosphorylierten Peptiden müsste erhöht werden, um diese Frage beantworten zu können. Dieser Sachverhalt wird eingehend im nun folgenden Kapitel erörtert (siehe auch Kapitel 3.2.5.6).

3.2.4.1 Spezifität von Titandioxid

Die Anforderungen, die an eine Anreicherungstechnik für Phosphopeptide gestellt werden, sind aus Gründen, die im Kapitel 1.1 dargestellt worden sind, recht hoch. Deshalb reicht es nicht aus, nur Modelle von Phosphoproteinen zu untersuchen, da wegen des relativ hohen Phosphorylierungsgrades keine repräsentative Probe darstellen. Um aussagekräftige und quantitative Aussagen bezüglich der Spezifität von Titandioxid machen zu können, wurde künstlich ein Testsystem erzeugt, bei dem man den Überschuss an unphosphoryliertem Hintergrund zu vorhandenem Phosphopeptid genau bestimmen kann.

Der Analyt enthielt ein Phosphopeptid mit einem 25-fachen Überschuss an unphosphoryliertem Hintergrund. Diese Verhältnisse sind in realen Phosphoproteomics-Fragestellungen sehr realistisch. Mit Hilfe von Titandioxid-Tips sollte diese Probe nun aufgereinigt werden.

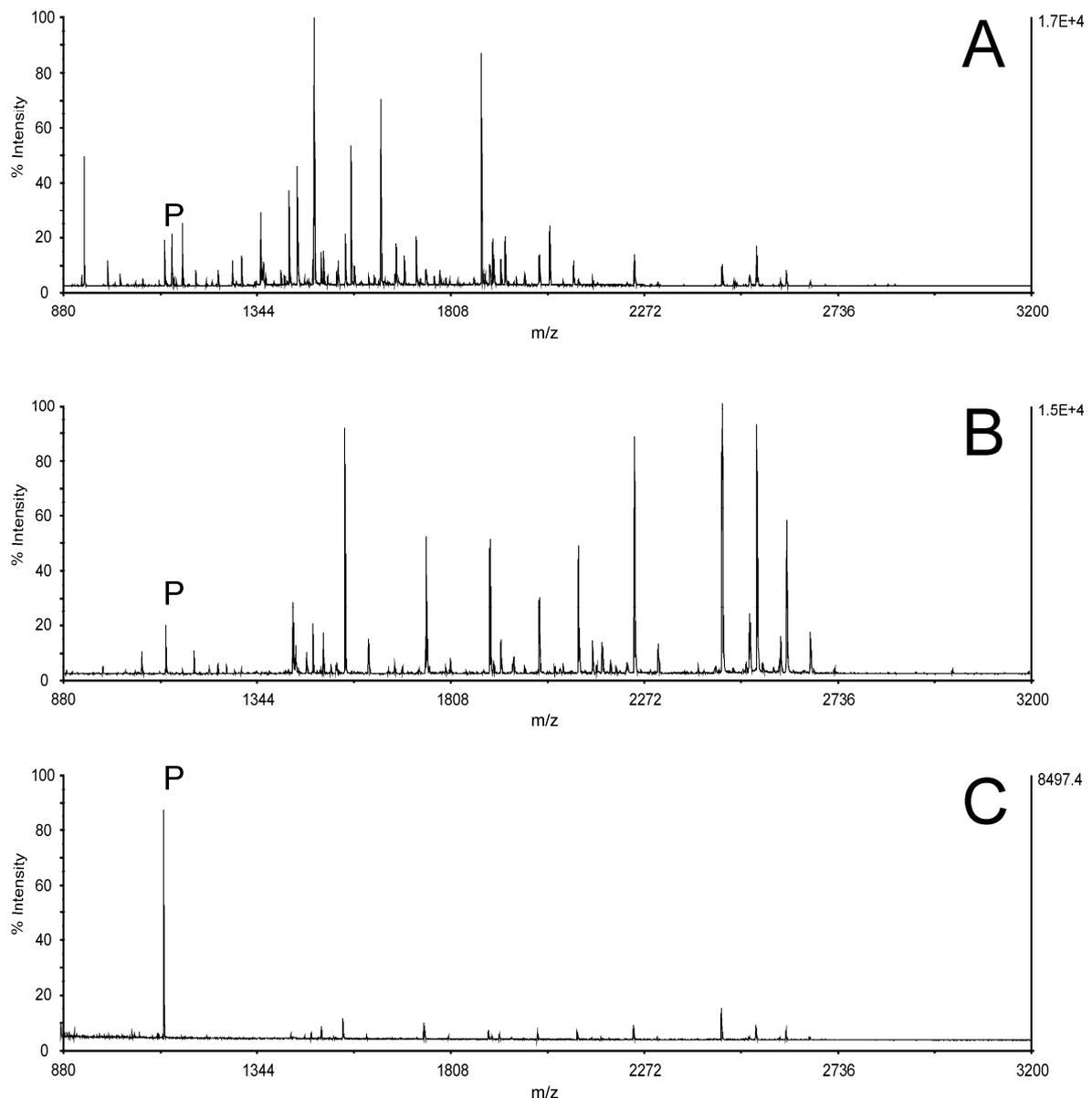


Abb. 3.22: Spezifität von TiO_2 für die Aufreinigung 100 fmol Phosphopeptid mit 2,5 pmol BSA-Verdau als Hintergrund (1:25). Negativkontrolle (A), Aufreinigung ohne DHB beim Laden der Probe (B) und mit 100 mg/mL DHB beim Laden der Probe.

Abb. 3.22 zeigt, dass in der Literatur berichtete fehlende unspezifische Bindung von unphosphorylierten Peptiden an Titandioxid zumindest für sehr komplexe Proben nicht gültig ist. Für Proben geringer Komplexität, bei der der Hintergrund an unmodifizierten Peptiden gering und der Phosphorylierungsgrad hoch ist, mag diese These dennoch ihre Richtigkeit haben. Liegt aber eine reale Probe vor, bei der der Phosphorylierungsgrad gering und der Hintergrund hoch ist, wird wie in Abb 3.22 B illustriert die unspezifische Bindung auch hier zu einem großen Problem. D.h. das Titandioxid per se besitzt keine geringe unspezifische Bindung zu unphosphorylierten, meist sauren Peptiden. Erst durch Modifizierung des Aufreinigungsprotokolls nimmt die unspezifische Bindung signifikant ab. Larsen und

Kollegen (Larsen *et al.*, 2005) beobachteten, dass durch Zugabe von DHB beim Laden der Probe die unspezifische Bindung dramatisch abnimmt. Tabelle 3.3 verdeutlicht, dass durch Beladen der Titandioxidsäulen mit DHB in der Probenlösung die Anzahl der unphosphorylierten Peptide um mehr als die Hälfte von 15 auf 7 Peptide mit sehr geringeren S/N-Verhältnissen abnimmt. Die Tabelle zeigt ausserdem, dass nahezu durchgehend saure Peptide mit einem niedrigen isoelektrischen Punkt an das Titandioxid binden und durchgehend hydrophilen Charakter besitzen.

MH+	Aminosäuresequenz	PI	Gravy	ohne DHB	mit DHB
1502,62	K.EYEATLEECCA.K.D	3,58	-0,33	✓	
1532,79	K.LKECCDKPLLEK.S	6,17	-0,62	✓	
1554,65	K.DDPHACYSTVFDK.L	4,41	-0,82	✓	✓
1673,78	K.QEPERNECFLSHK.D	5,50	-1,72	✓	
1747,71	K.YNGVFQECCQAEDK.G	4,14	-0,91	✓	
1749,67	K.ECCHGDLLECADDR.A	4,10	-0,62	✓	✓
1901,87	R.NECFLSHKDDSPDLPK.L	4,66	-1,28	✓	✓
1927,80	K.CCAADDKEACFAVEGPK.L	4,32	-0,12	✓	
2019,97	K.LKPDNTLCDEFKADEK.K	4,44	-1,29	✓	
2113,89	K.VHKECCHGDLLECADDR.A	4,80	-0,68	✓	
2148,06	K.LKPDNTLCDEFKADEKK.F	4,86	-1,43	✓	
2247,95	K.ECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,23	-0,46	✓	✓
2458,18	K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK.N	3,96	-0,49	✓	✓
2541,17	K.QEPERNECFLSHKDDSPDLPK.L	4,58	-1,76	✓	✓
2612,17	K.VHKECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,86	-0,53	✓	✓

Tabelle 3.3: Unspezifische Bindung an Titandioxid (1:25). Ausgewiesen sind alle detektierbaren Signale von unphosphorylierten Peptiden des BSA-Verdau. Als Probe diente 100 fmol Phosphopeptid mit einem 25-fachen Hintergrund aus BSA (2,5 pmol).

3.2.5 Anreicherung von Phosphopeptiden mit Phosphonat-Oberflächen

3.2.5.1 Synthese und Charakterisierung von Phosphonat-modifizierten Oberflächen

Phosphonatoberflächen werden seit einiger Zeit für Hybridisierungsreaktionen von DNA eingesetzt. Ihr Einsatz zur Anreicherung von Phosphopeptiden kam erst kürzlich auf (Zhou *et al.*, 2006, Feng *et al.*, 2007, Wei *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf der Basis von SAMs eine Modifizierung von Goldoberflächen mit Phosphonaten etabliert, welche eine hohe Affinität zu phosphorylierten Peptiden zeigte.

Die im Methodenteil erläuterte Synthese war recht elegant, da die Modifizierung der Aminofunktion des Aminoalkanthiols direkt auf der goldbedampften Oberfläche erfolgen konnte. Ausgangspunkt für die Synthese war die Bildung der SAM mit 11-Amino-undecanthal durch Inkubation auf Gold. Die weitere Synthese erfolgte durch Behandlung des primärenamins mit POCl_3 und abschließender Hydrolyse. Die Herstellung der Phosphonatoberfläche konnte in weniger als drei Arbeitstagen erfolgen, wobei mit 48 Stunden die Bildung der SAM im ersten Schritt am längsten dauerte. Vorteil der Synthese über SAMs war, dass keinerlei aufwendige Syntheseapparatur notwendig war. Zudem mussten keine komplizierten und zeitaufwendigen Aufreinigungsprozeduren wie etwa Säulenchromatographie oder HPLC eingesetzt werden. Durch alleiniges Wegspülen von Edukten und Kontaminanten wurde eine sehr homogene und funktionstüchtige Phosphonatoberfläche geschaffen.

Um die Reproduzierbarkeit der Synthese zu testen, wurden fünf Phosphonat-modifizierte Probenplatten aus unterschiedlichen Syntheseansätzen anhand der Aufreinigung eines β -Casein-Verdau untersucht. Hierfür wurde auf jeden Probenplatte fünfmal der Phosphoproteinverdau zur Aufreinigung gegeben.

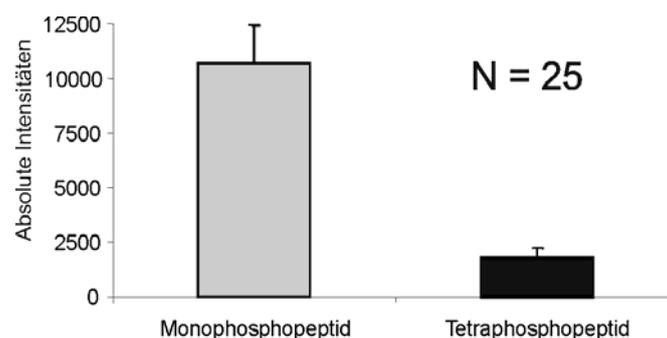


Abb. 3.23: Reproduzierbarkeit der Phosphonatsynthese anhand der Aufreinigung von je 700 fmol β -Casein-Verdau

Abb. 3.23 zeigt die ausserordentlich gute Reproduzierbarkeit der Phosphonat-Oberfläche. Beide Phosphopeptide des Proteinverdaus können mit sehr guten S/N-Verhältnissen im MALDI-MS detektiert werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Phosphonatoberfläche wurde zunächst die Frage nach der Bindekapazität pro aufgetragenem Spot untersucht. Wie bei der bis-NTA-Oberfläche wurden auf die Phosphonatoberfläche steigende Mengen an reinem Phosphopeptid aufgetragen (s. Kap. 3.2.3.2). Durch Vergleich der Spektren von „flow-through“ und Eluat konnte die Menge an gebundenem absolutem Phosphopeptid experimentell ermittelt werden. Die ermittelte mittlere Bindekapazität beträgt, wie aus Abb. 3.24 entnommen werden kann, 650 fmol. Zur Durchführung der Bestimmung der Bindekapazität siehe Kapitel 2.9.3.1 und 2.9.5.1.

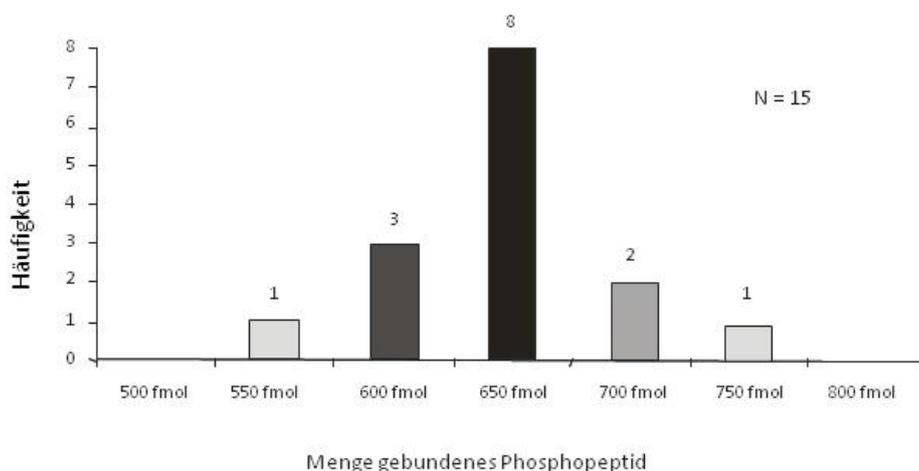


Abb. 3.24: Experimentelle Bestimmung der Bindekapazität pro Spot-Position auf der Phosphonat-Oberfläche mit Lösungen, die steigende Konzentrationen eines Phosphopeptids enthalten.

Die so ermittelte Bindekapazität sollte nochmal durch eine andere Methode überprüft werden. Bei diesem Ansatz wurde die Menge an gebundenem Zr^{4+} -Ionen mittels ICP-MS bestimmt. Die folgende theoretische Berechnung der Bindekapazität erfolgte unter der Annahme, dass die Fläche pro Well bzw. Spot, welche funktionalisiert ist, etwa 4 mm^2 beträgt. Unter der Voraussetzung, dass Alkanthiole auf Gold einen Abstand von 5 \AA zueinander haben (s. Kap. 1.8.3), befinden sich somit etwa 16 pmol Thiolat-Moleküle auf 4 mm^2 , wenn man zusätzlich noch davon ausgeht, dass die Phosphonatgruppe keinen Einfluss auf die Räumliche Anordnung der immobilisierten Thiolate hat.

Dieser Wert deckt sich mit den Ergebnissen, die durch Bestimmung der gebundenen Menge an Zr^{4+} pro Well ermittelt wurde. Für diesen Versuch wurden auf 8 Positionen des

phosphonat-modifizierten Proben Tellers je 10 μL 100 mM ZrOCl_2 Hexahydrat aufgetragen. Nach Entfernen der ungebundenen Zr^{4+} durch intensives Waschen, wurden die Zr^{4+} -Ionen von den 8 Positionen mit 0,2 M EDTA-Lösung eluiert und mit Wasser auf 500 μL verdünnt. Mit Hilfe der ICP-MS wurde für diese Lösung eine Zr^{4+} -Konzentration von 0,11 g/L ermittelt, d.h. auf dem Well auf dem modifizierten Target wurden 6,8 ng Zr^{4+} -Ionen gebunden. Pro Spot werden somit umgerechnet 75 pmol Zr^{4+} -Ionen gebunden.

Sowohl die errechnete wie auch die experimentell ermittelte Bindekapazität stehen in gutem Einklang mit den Werten, die durch Titration der Oberfläche mit steigenden Konzentrationen von Lösungen, welche ein Phosphopeptid enthielten, erhalten wurden. Dort wurde eine mittlere Bindekapazität von 650 fmol pro Spot ermittelt, welches unter echten Aufreinigungsbedingungen bestimmt wurde. Bedenkt man, dass das angebotene Phosphopeptid räumlich sicherlich mehr Fläche bzw. Volumen einnimmt als die dicht aneinander gepackten Thiol-Moleküle, so korrelieren sämtliche errechneten und experimentell ermittelten Werte zur Bindekapazität sehr gut. Eine 1:1 Korrelation von gebundenen Phosphopeptidmengen zu errechneten Bindestellen bzw. Zr^{4+} -Ionen ist aus sterisch-räumlichen Gründen nicht zu erwarten. Insofern ist die Menge an Phosphopeptid, die pro Spot gebunden werden kann, deutlich unter der zweistelligen Picomolmenge. Am Anfang der Betrachtung der Bindekapazität wurde die ermittelte Menge an gebundenen Phosphopeptiden anhand der Titration mit 650 fmol als recht hoch eingeschätzt. Vor dem Hintergrund der rechnerisch und per ICP-MS überprüften Beladungskapazität ist die Phosphopeptid-Bindekapazität im höheren Femtomol-Bereich sehr realistisch.

Somit ist die Grundvoraussetzung der ausreichend hohen Bindekapazität mittels verschiedener Bestimmungsmethoden überprüft worden. Die hohe Bindekapazität ermöglicht das Binden von relativ hohen Phosphopeptidmengen. Normalerweise ist der Phosphorylierungsgrad eines Proteins sehr gering. Wenn aber das Protein sehr viele Phosphorylierungsstellen besitzt, ermöglicht die Bindekapazität, dass sämtliche Peptide gebunden werden.

3.2.5.2 Analyse von Phosphopeptiden mit Phosphonat-Oberflächen

Da Phosphonate in der Regel mit Zirkonium(IV)-Ionen beladen werden, wurde untersucht, ob nicht andere Metallkationen die Leistungsdaten der Aufreinigung von Phosphoprotein-Verdaus verbessern können. Deshalb wurde die Oberfläche mit verschiedenen Metallkationen inkubiert. Interessanterweise ergaben alle getesteten Metallionen signifikant unterschiedliche Spektren für die Aufreinigung der identischen Probe.

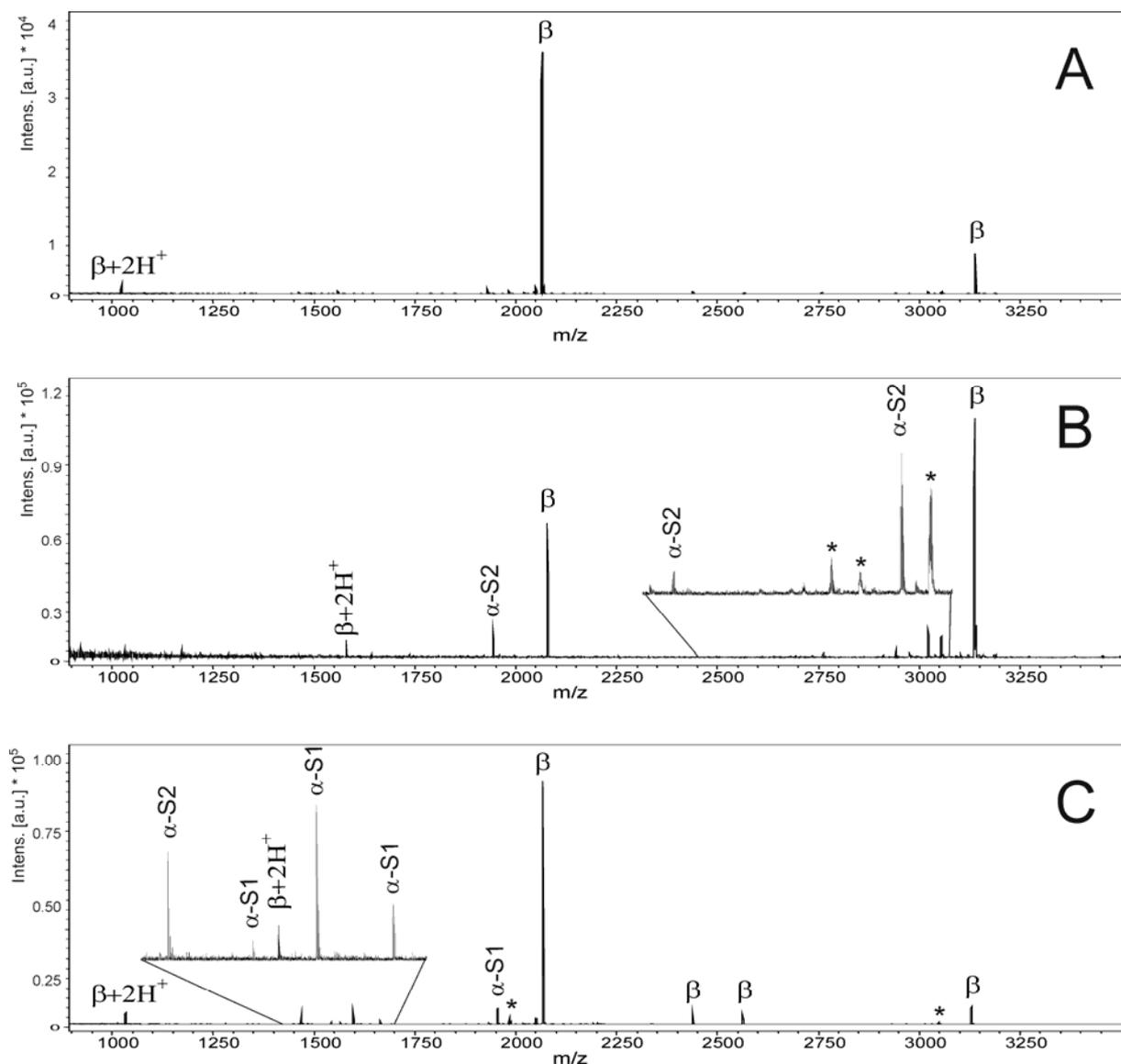


Abb. 3.25: Einfluss von unterschiedlichen Metallkationen auf die Anreicherung von Phosphopeptiden mit der Phosphonatoberfläche. MALDI-TOF Spektren der Aufreinigung von 700 fmol β -Casein mit der Phosphonatoberfläche. Beladung der Oberfläche erfolgte mit Eisen (A), mit Gallium (B) und Zirkonium (C). Phosphopeptide des β -Caseins sind mit β , von α -S1-Casein mit α -S1, α -S2-Casein mit α -S2 gekennzeichnet. Der Neutralverlust der Phosphatgruppe ist mit * markiert.

Wird dreiwertiges Eisen als Metallkation zur Beladung der Phosphonatoberfläche verwendet, so findet man beide Phosphopeptide des β -Caseins (Abb. 3.25 A) mit hohen S/N-Werten wieder. Zusätzlich ist noch das Signal für das zweifachgeladene Ion des Monophosphopeptids erkennbar. Darüber hinaus findet man keine anderen, detektierbaren Peptide.

Beim Einsatz von dreiwertigem Gallium (Abb. 3.25 B) findet man ein verändertes Aufreinigungsverhalten der Oberfläche. Der größte Peak im Spektrum ist erstaunlicherweise dem vierfach phosphorylierten, größeren Phosphopeptid des β -Caseins zuzuordnen, während das kleinere Phosphopeptid bei 2062 Da eine deutlich geringere Signalintensität aufweist. Im Gegensatz zum Eisen erhält man mit Gallium aber neben den beiden prominenten Phosphopeptiden aus β -Casein auch noch Phosphopeptide, die von der 10 %-igen Verunreinigung mit den α -Caseinen S1 und S2 stammen. Mittels MALDI-MS/MS konnten diese Peptide zweifelsfrei dem α -S1-Casein und α -S2-Casein zugeordnet werden.

Der Einsatz von vierwertigem Zirkonium ist den anderen getesteten Metallionen überlegen, da hier wesentlich mehr Phosphopeptide angereichert und eluiert werden können. Neben den beiden schon erwähnten Phosphopeptiden von β -Casein findet sich noch eine ganze Reihe verschiedener Phosphopeptide der α -Caseine. Erstaunlicherweise sind darüber hinaus neben den zwei vorher genannten phosphorylierten Peptiden zwei zusätzliche Phosphopeptide des β -Caseins detektierbar. Tabelle 3.4 gibt die Aminosäuresequenzen der gefundenen Phosphopeptide wieder.

MH ⁺	Aminosäuresequenz	Protein	Fe ³⁺	Ga ³⁺	Zr ⁴⁺
1466,61	TVDMEpSTEVFTK	α-S1-Casein	x	x	✓
1539,60	EQLpSTpSEENSKK	α-S1-Casein	x	x	✓
1594,71	TVDMEpSTEVFTKK	α-S1-Casein	x	x	✓
1660,80	VPQLEIVPNpSAEER	α-S2-Casein	x	x	✓
1927,64	DIGpSEpSTEDQAMEDIK	α-S2-Casein	x	✓	x
1951,95	YKVPQLEIVPNpSAEER	α-S2-Casein	x	x	✓
2061,83	FQpSEEQQQTEDELQDK	β-Casein	✓	✓	✓
2432,05	IEKFQpSEEQQQTEDELQDK	β-Casein	x	x	✓
2747,00	KNTMEHVpSpSpSpEEpSIISQETY K	α-S2-Casein	x	✓	x
2556,09	FQpSEEQQQTEDELQDKIHFP	β-Casein	x	x	✓
3008,03	NANEEEYSIGpSpSpSEEpSAEVATEEVK	α-S2-Casein	x	✓	x
3122,27	RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR	β-Casein	✓	✓	✓

Tabelle 3.4: Detektierte Phosphopeptid-Signale in Abhängigkeit von der Beladung der Phosphonat-Oberfläche mit unterschiedlichen Metallkationen.

3.2.5.3 Fokussierende Phosphonatoberflächen

In Kooperation mit der Firma Qiagen GmbH (Hilden) wurde die entwickelte Phosphonatoberfläche optimiert. Da bei den selbst hergestellten Oberflächen der hydrophile Charakter überwog, waren aufgetragene Proben sehr großflächig, d.h. pro Flächeneinheit findet man recht wenig Analyt. Darüber hinaus sind Proben mit einem hohen organischen Lösemittelanteil nicht anwendbar, da diese auf der Oberfläche unkontrolliert zerlaufen und es leicht zu Probenkontaminationen kommen kann.

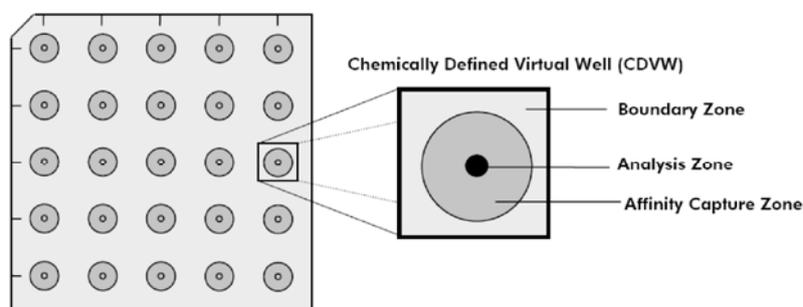


Abb. 3.26: Schematischer Aufbau eines 5 x 5 Mass Spec Focus Type 3 Chip. In der Mitte der Wells befindet sich die sogenannte Analysenzone. In diesem Bereich findet die spätere MALDI-Messung statt, da die Matrix nur in dieser hydrophilen Zone auskristallisiert. Die Analysenzone ist umgeben von einer Zone mittlerer Hydrophobizität. In diesem äußeren Kreis findet die Bindung des Analyten statt. Hier sind auch die immobilisierten Phosphonatgruppen zu finden. Ausserhalb dieser sogenannten Affinity Capture Zone findet man eine vollkommen hydrophobe Umgebung. (Mass Spec Focus Chip Handbook, Qiagen GmbH, Hilden)

Die in Kooperation hergestellten Phosphonat-Probenteller bieten den großen Vorteil, dass sie hydrophile Inseln mit dort lokalisierten Phosphonatgruppen in einer ansonsten weitestgehend hydrophoben Umgebung besitzen. Somit können auch große Volumina (bis zu 20 μl) aufgetragen werden, während die Bindungsfläche immer noch sehr gering ist. Die hydrophilen Inseln verankern sozusagen den aufgetragenen Tropfen. Neben der Möglichkeit der Auftragung von größeren Volumina ist durch die genaue lokale Positionierung der Probe eine Verbesserung im Gegensatz zu den selbst hergestellten Oberflächen zu erreichen.

Die Effizienz der Aufkonzentrierung der Probe durch sehr kleinflächig auskristallisierte Matrix Areale wurde durch Auftragung von verschiedenen Volumina der identischen Probe ermittelt. Bei der Messung mit Edelstahl-Probentellern werden in der Regel DHB-Konzentrationen von 10-20 mg/mL verwendet. Diese Konzentrationen sind jedoch für die Anwendung mit Fokussiertechnik viel zu hoch und führen nach dem Trocknen zu kompakten und großen Kristallen, die zu einer schlechten Massenauflösung im TOF-Massenspektrometer führen. Neben der Anpassung der Matrixkonzentration musste die Säurekonzentration von 1 % auf 0,1 % für die Phosphorsäure gesenkt werden, da die Präparation ansonsten nicht trocknete.

Für die hydrophilere DHB als Matrix erwies sich der chemische Aufbau der Wells als ideal. Die Matrix kristallisiert aufgrund ihrer recht hohen Hydrophilie nur im Innern der Wells, also in den hydrophilen Inseln. Somit sind die Spotgrößen mit DHB auf den Fokussierchips im Vergleich zur Präparation auf einem üblichen Edelstahl-Probenteller signifikant kleiner.

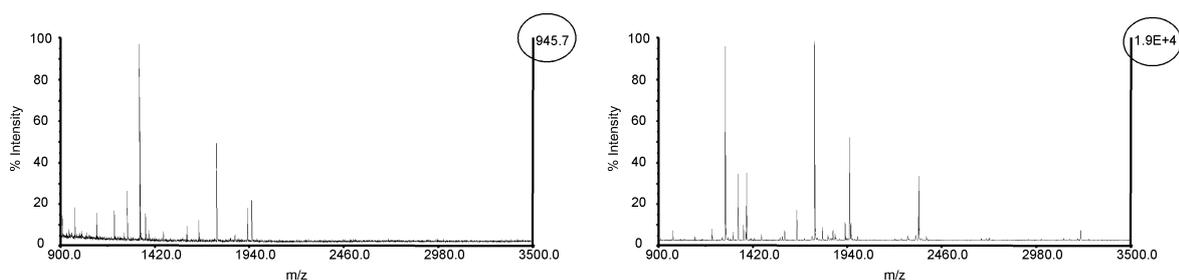


Abb. 3.27: Effizienz der Aufkonzentrierung mit einem Mass Spec Focus Chip ohne Phosphonatmodifikation. Das linke Spektrum wurde erhalten durch Auftragen von 1 μL , das rechte Spektrum durch Auftragen von 10 μL eines Proteinverdau (Ovalbumin) der Konzentration 10 fmol/ μL .

Abb. 3.27 verdeutlicht eindrucksvoll, dass auf der gleichen Fläche bei Auftragung von 10 μL an Probe nach der Kristallisierung eine Verzwanzigfachung der Signalintensität im Gegensatz zur Auftragung von 1 μL eines Proteinverdau stattfindet. Für die Messung wurde ein Probenteller mit Fokussiertechnik aber ohne Phosphonatgruppen verwendet. Der Spektrenvergleich in Abb. 3.27 zeigt, dass sich die Probe in der Tat zusammen zieht und sich

in der kristallisierten Matrix mehr Analyt befindet, wenn höhere Volumina aufgetragen werden. In Abb. 3.28 ist die Größe von 1 μL frisch aufgetragener Matrixlösung der eingetrockneten Präparation gegenüber gestellt.

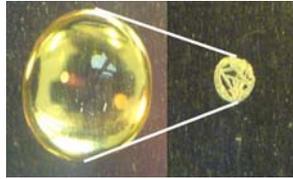


Abb. 3.28: Fokussierung von DHB. Die Abbildung zeigt die Menge von 1 μl einer Matrixlösung vor und nach der Kristallisation. Als Matrix wurde 1 mg/mL DHB verwendet.

Beim Vergleich der Fokussierchips mit CHCA als Matrix stellte sich heraus, dass der chemische Aufbau der *Wells* mit der hydrophilen Insel, der halbhydrophilen Zwischenschicht und der hydrophoben Aussenschicht für CHCA nicht ideal ist. Aufgrund der höheren Hydrophobizität von CHCA kam es bei der Präparation häufig nicht zum erwünschten Fokussiereffekt, sondern die Matrix kristallisierte häufig ausserhalb der hydrophilen Inseln in den hydrophoben Arealen (Abb. 3.29). Damit war die erreichte Spotgröße nach Eintrocknen der Probe mit CHCA nicht befriedigend.

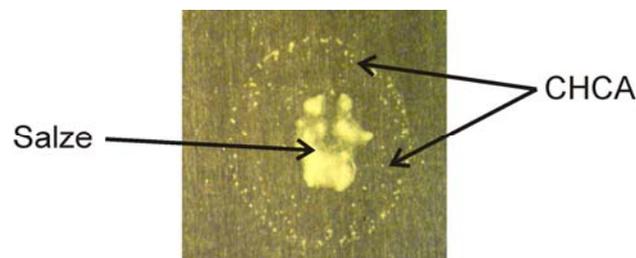


Abb.3.29: Fokussierung von CHCA auf einer Oberfläche mit Fokussiertechnik. Auskristallisierte CHCA-Matrix auf einem Fokussierchip. Die Salze befinden sich in der für die MALDI-Messung bestimmten Analysenzone.

Durch diese Fokussiertechnik des Probenellers ist ein Sensitivitätsgewinn um den Faktor 10 gegenüber den Probenellern ohne hydrophobe Umgebung zu erreichen. Es ist deshalb mit diesem modifizierten MALDI-Probeneller möglich im relevanten niedrigen Femtomolbereich zu arbeiten. Die Sensitivität des Phosphonat-Probenellers reicht bis zu 1 fmol aufgetragenem Phosphoproteinverdau (Abb. 3.30 B). Bei 10 fmol appliziertem Verdau von β -Casein sind neben den beiden prominenten Phosphopeptiden noch zwei weitere phosphorylierte Peptide des β -Caseins, sowie vier weitere Phosphopeptide der α -Caseine mit sehr guten S/N-Verhältnissen im Spektrum detektierbar. Wird die Menge auf 1 fmol (Abb. 3.30 B) gesenkt,

so werden neben einem Phosphopeptid des α -S2-Caseins das Monophosphopeptid und das vierfach phosphorylierte Peptid des β -Caseins detektiert.

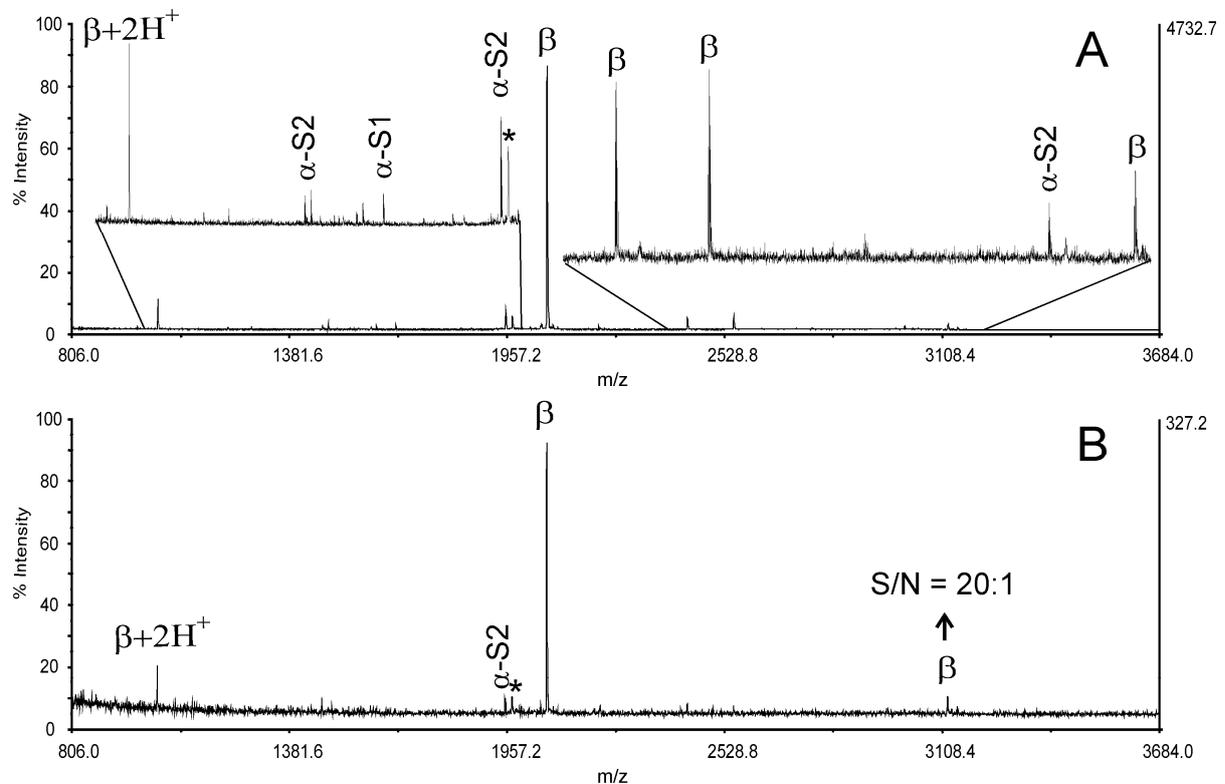


Abb.3.30: Repräsentative Spektren der Aufreinigung von geringen Probenmengen mit Phosphonat-Oberfläche. A zeigt die Aufreinigung von 10 fmol und B für 1 fmol absolut aufgetragene Probe an β -Casein.

3.2.5.4 Kompatibilität der Phosphonatoberfläche mit ESI

Der große Vorteil der Anwendbarkeit von großen Volumina pro Spot konnte ausgenutzt werden, um gebundene Phosphopeptide von der Oberfläche mit 150 mM Ammoniumhydroxid-Lösung von der Phosphonatoberfläche zu eluieren. Ammoniumhydroxid in dieser Konzentration erlaubt es das Eluat auch mit ESI direkt zu analysieren, wenn es vor dem Befüllen der ESI-Kapillare mit 2 % Ameisensäure / 50 % Methanol 1:1 verdünnt wird. Die alkalische Elution ist nahezu quantitativ. Hierbei präzipitiert das Zirkonium und kann in der Folge keine Phosphopeptide mehr binden, welche somit frei in Lösung vorliegen.

Beim Einsatz von Bis-NTA war die Elution bereits mit 1 % Ameisensäure möglich. Diese Prozedur war jedoch nicht auf die Phosphonatoberfläche übertragbar. Es war nahezu unmöglich, Phosphopeptide im sauren Milieu von der Phosphonatoberfläche quantitativ zu eluieren, da die Bindung selbst im stark sauren Milieu zu kräftig ist. Die alkalische Elution bietet folglich die Möglichkeit, mit ESI zusätzliche Informationen zu erzielen. Insofern lässt

sich die Phosphonatoberfläche auch als eine Aufreinigungsmethode für Phosphopeptide einsetzen, wenn kein MALDI- sondern nur ein ESI-Gerät vorhanden ist.

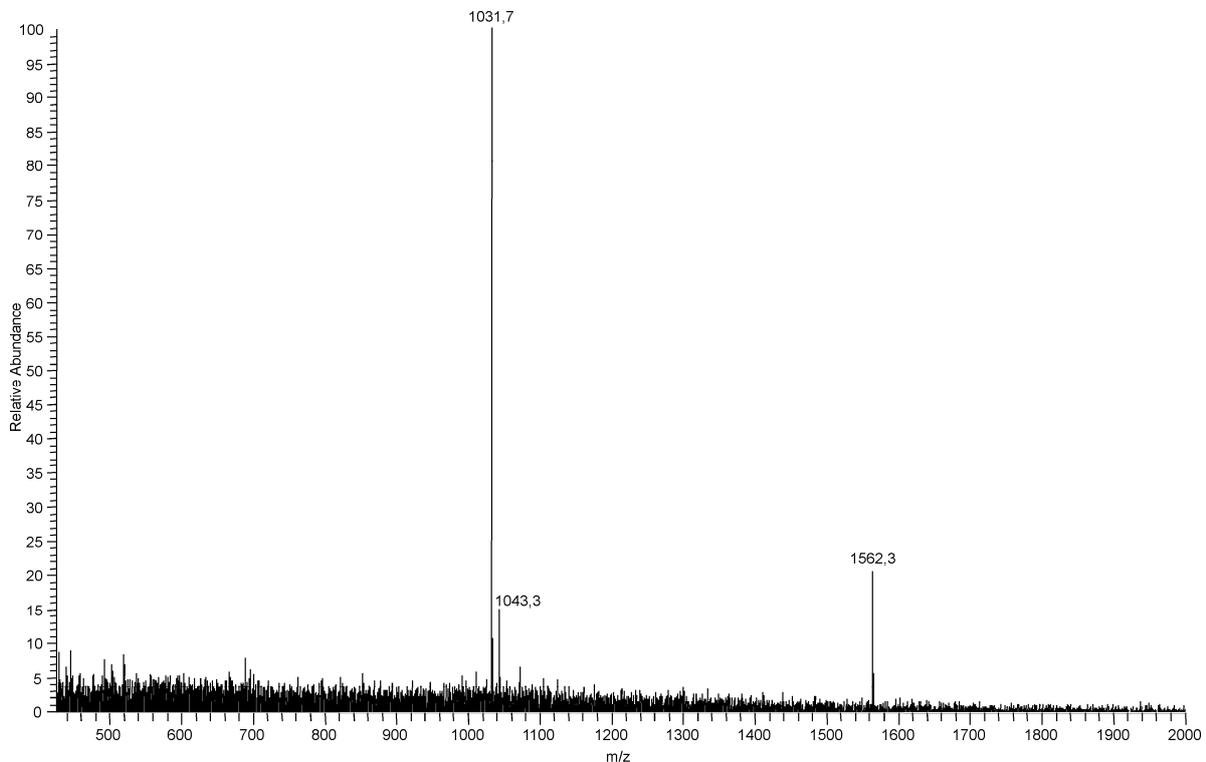


Abb. 3.31 Elution von Phosphopeptiden von der Phosphonat-Oberfläche. Erhaltenes ESI-MS Spektrum nach Elution der gebundenen Phosphopeptide bei der Aufreinigung von 500 fmol β -Casein mit der Phosphonatoberfläche. Beide Phosphopeptide (1031,7 m/z und 1562,3 m/z) sind als zweifach geladene Ionen detektierbar.

Abbildung 3.3.1 zeigt ein repräsentatives ESI-MS-Spektrum eines β -Casein- Verdau, der zunächst auf der Phosphonatoberfläche aufgereinigt und anschließend von der Oberfläche eluiert wurde. Man erkennt sehr deutlich die beiden Phosphopeptide als starke Signale mit sehr guten S/N-Verhältnissen. Neben diesen beiden Signalen sind keine weiteren zu erkennen. Das ESI-Spektrum deckt sich mit typischen MALDI-MS-Spektren, die nach Aufreinigung an der Phosphonatoberfläche erzielt worden sind, was demonstriert, dass die Phosphonatoberfläche selektiv phosphorylierte Peptide anreichert. Mit dem präsentierten Protokoll konnten die an der Oberfläche anhaftenden Analyten quantitativ eluiert werden, um einer ESI-Messung zugeführt zu werden. Handelt es sich bei dem eingesetzten ESI-Massenspektrometer um ein MS/MS-fähiges System ergibt sich natürlich auch die Möglichkeit mit MS/MS-Experimenten Aufschluss über die vorliegende Aminosäuresequenz der Probe zu gewinnen. Abbildungen 3.32 und 3.33 zeigen ESI-MS/MS-Spektren der beiden Phosphopeptide, die im MS (Abb. 3.31) als deutliche Signal sichtbar sind.

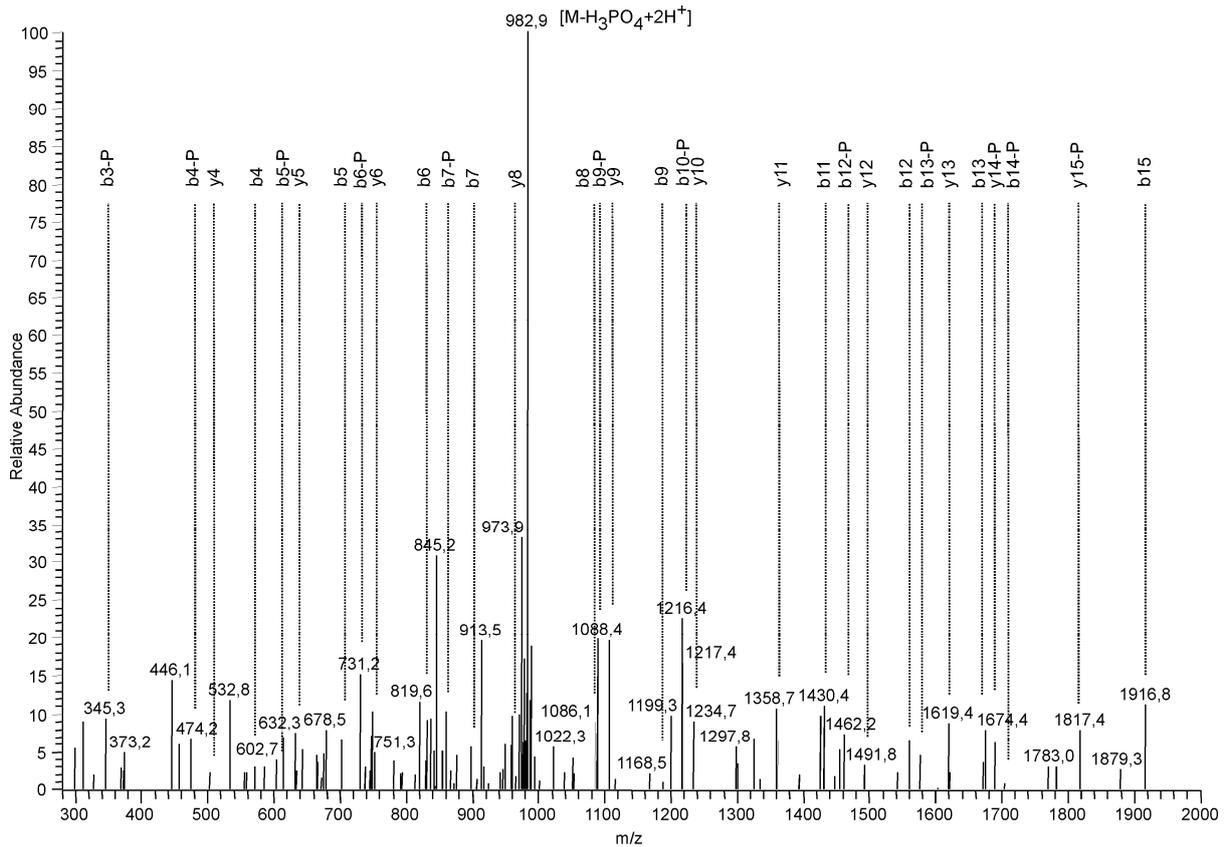


Abb.3.32 ESI-MS/MS-Spektrum eines eluierten Phosphopeptids. Gezeigt ist ein repräsentatives ESI MS/MS des Precursors 1031,7 m/z des Phosphopeptids mit der Aminosäuresequenz FQpSEEQQQTEDELQDK, welches nach der Aufreinigung von 500 fmol β -Casein-Verdau von der Phosphonatoberfläche eluiert wurde. Die γ - und b -Ionenserien mit den entsprechenden Phosphatverlusten ermöglichen die exakte Zuordnung der Phosphorylierungsstelle.

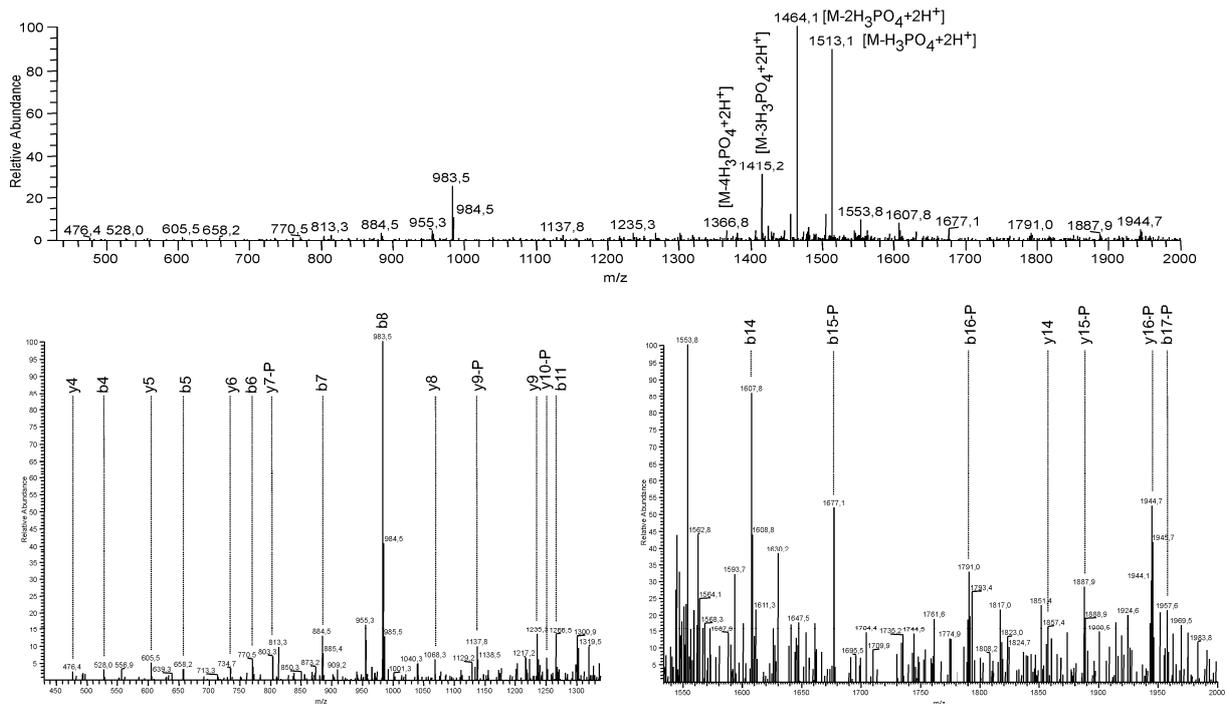


Abb. 3.33: Elution eines vierfach phosphorylierten Peptids. Obere Abbildung zeigt ein ESI MS/MS des Precursors 1562 m/z mit der Aminosäuresequenz RELEELNVPGEIVeSLpSpSpSEESITR. Die Beiden Spektren darunter zeigen vergrößerte Ausschnitte des gleichen Spektrums.

3.2.5.5 Spezifität der Phosphonat-Oberfläche

Bezüglich der Spezifität konnte gezeigt werden, dass bei gleichbleibender Komplexität der Probe die Phosphonatoberfläche wesentlich selektiver als das Titandioxid ist. Bei einem Verhältnis von 1:25 von Phosphopeptid zu unphosphoryliertem Hintergrund BSA-Verdau ist zwar die Anzahl der gebundenen, unmodifizierten Peptide beim Einsatz der Phosphonatoberfläche im Vergleich zum Titandioxid lediglich von 15 auf 11 (ohne DHB in der Ladelösung) gesunken (Abb. 3.34 und Tab. 3.5). Ein Blick in das Spektrum (Abb. 3.34 B) zeigt aber, dass die Signale sehr geringe S/N-Verhältnisse aufweisen und gerade noch detektiert werden können. Durch Zusatz von DHB zur Probenlösung kann die unspezifische Bindung auf ein einziges unphosphoryliertes Peptid gesenkt werden. Daraus geht hervor, dass die Phosphonatoberfläche eine deutlich höhere Selektivität zu Phosphopeptiden zeigt als Titandioxid. Somit kann in vielen Fällen ohne DHB beim Beladen gearbeitet werden. Wird bei hochkomplexen Proben DHB in die Probenlösung integriert, so sind die erzielbaren Ergebnisse im Vergleich zum Einsatz von Titandioxid signifikant verbessert.

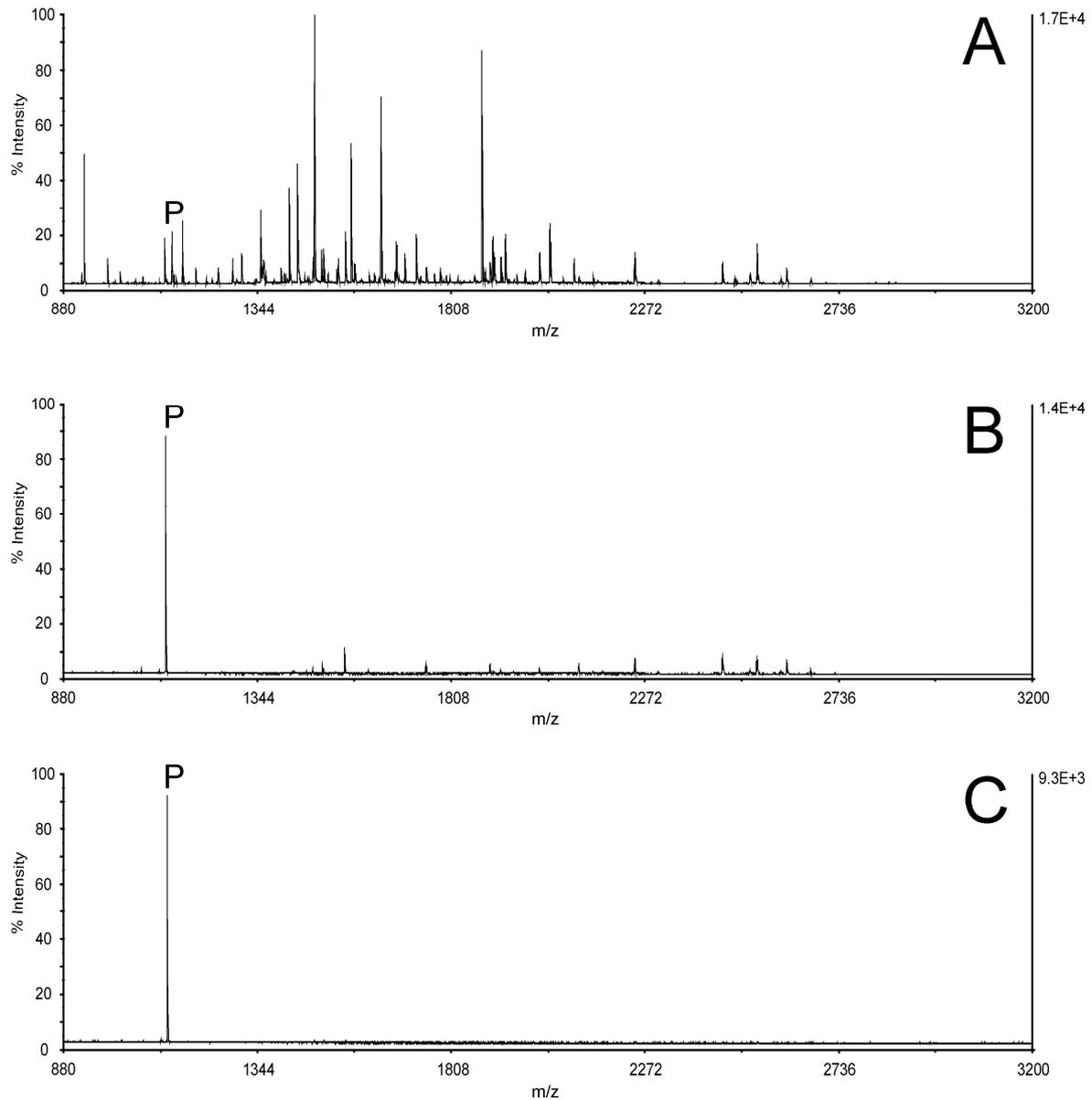


Abb. 3.34: Spezifität der Phosphonatoberfläche für die Aufreinigung 100 fmol Phosphopeptid mit 2,5 pmol BSA-Verdau als Hintergrund (1:25). Negativkontrolle (A), Aufreinigung ohne DHB beim Laden der Probe (B) und mit 100 mg/mL DHB beim Laden der Probe.

MH+	Aminosäuresequenz	PI	Gravy	ohne DHB	mit DHB
1502,62	K.EYEATLEECCA.K.D	3,58	-0,33	✓	
1554,65	K.DDPHACYSTVFDK.L	4,41	-0,82	✓	✓
1749,67	K.ECCHGDLLECADDR.A	4,10	-0,62	✓	
1901,87	R.NECFLSHKDDSPDLPK.L	4,66	-1,28	✓	
1927,80	K.CCAADDKEACFAVEGPK.L	4,32	-0,12	✓	
2019,97	K.LKPDNTLCDEFKADEK.K	4,44	-1,29	✓	
2113,89	K.VHKECCHGDLLECADDR.A	4,80	-0,68	✓	
2247,95	K.ECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,23	-0,46	✓	
2458,18	K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK.N	3,96	-0,49	✓	
2541,17	K.QEPERNECFLSHKDDSPDLPK.L	4,58	-1,76	✓	
2612,17	K.VHKECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,86	-0,53	✓	

Tabelle 3.5: Unspezifische Bindung an die Phosphonatoberfläche (1:25). Gelistet sind alle detektierbaren Signale von unphosphorylierten Peptiden des BSA-Verdau. Als Probe diente 100 fmol Phosphopeptid mit einem 25-fachen Hintergrund aus BSA (2,5 pmol).

Erste Probleme mit unspezifischer Bindung treten erst mit einem Hintergrund auf, welcher um mehr als das fünfzigfache das Phosphopeptid übersteigt. Bei solchen molaren Verhältnissen sind unspezifische Bindungen beobachtbar, auch wenn diese im Verhältnis zum phosphorylierten Analyten wesentlich geringere S/N-Verhältnisse zeigen. Im Vergleich zu einem Verhältnis von 1:25 ist die Anzahl der gebundenen Peptide bei einem molaren Verhältnis von 1:50 unverändert (Abb. 3.35 und Tab. 3.6), während die Signalintensitäten der unphosphorylierten Peptide erkennbar gestiegen sind. Mit Zugabe von DHB in die Probe ist eine Reduktion der unspezifischen Bindung in Anzahl und Signalintensität deutlich erkennbar. Hier zeigt sich, dass die Phosphonatoberfläche für hochkomplexe Proben bestens geeignet ist und der Titandioxid-Technik überlegen ist.

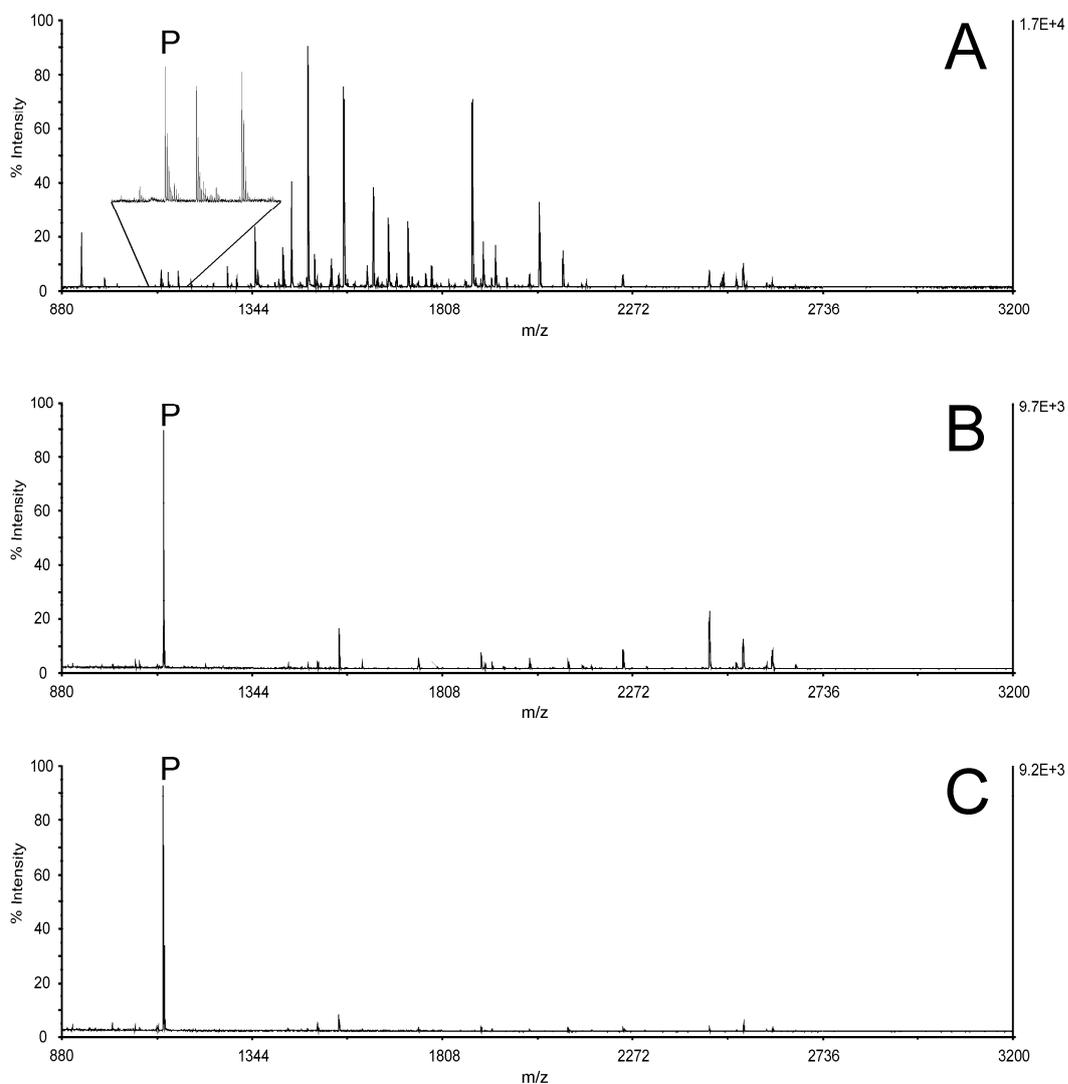


Abb. 3.35: Spezifität der Phosphonatoberfläche für die Aufreinigung 100 fmol Phosphopeptid mit 5 pmol BSA-Verdau als Hintergrund (1:50). Negativkontrolle (A), Aufreinigung ohne DHB beim Laden der Probe (B) und mit 100 mg/mL DHB beim Laden der Probe.

MH+	Aminosäuresequenz	PI	Gravy	ohne DHB	mit DHB
1502,62	K.EYEATLEECCA.K.D	3,58	-0,33	✓	✓
1554,65	K.DDPHACYSTVFDK.L	4,41	-0,82	✓	✓
1749,67	K.ECCHGDLLECADDR.A	4,10	-0,62	✓	✓
1901,87	R.NECFLSHKDDSPDLPK.L	4,66	-1,28	✓	✓
1927,80	K.CCAADDKEACFAVEGPK.L	4,32	-0,12	✓	
2019,97	K.LKPDPNTLCDEFKADEK.K	4,44	-1,29	✓	
2113,89	K.VHKECCHGDLLECADDR.A	4,80	-0,68	✓	
2247,95	K.ECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,23	-0,46	✓	✓
2458,18	K.DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK.N	3,96	-0,49	✓	
2541,17	K.QEPERNECFLSHKDDSPDLPK.L	4,58	-1,76	✓	✓
2612,17	K.VHKECCHGDLLECADDRADLAK.Y	4,86	-0,53	✓	

Tabelle 3.6: Unspezifische Bindung an die Phosphonatoberfläche (1:50). Aufgelistet sind alle detektierbaren Signale von unphosphorylierten Peptiden des BSA-Verdaus. Als Probe diente 100 fmol Phosphopeptid mit einem 50-fachen Hintergrund aus BSA (5 pmol).

3.2.6 Gegenüberstellung von IMAC, TiO₂ und Phosphonatoberfläche

Bei der Entwicklung der Phosphonatoberfläche stand immer die Frage im Mittelpunkt, ob diese im Hinblick auf Selektivität und Sensitivität den IMAC-Beads und dem Titandioxid überlegen ist. Durch den Sprung von der mit Chromatographiematerial befüllten Pipettenspitze zu einem MALDI-Probenteller, welcher durch eine Phosphonatoberfläche modifiziert ist, ergaben sich viele Vorteile. Schlussendlich sollten diese Vorteile eine höhere Aufreinigungseffizienz bieten. Sie sollten eine hoch selektive Anreicherung im unteren Femtomolbereich selbst bei hohem unphosphorylierten Hintergrund ermöglichen.

Die bis dato am häufigsten eingesetzte Methode (IMAC) zeigte von den drei untersuchten Techniken schon bei der gewählten Menge von 100 fmol deutliche Defizite. Bei der Aufreinigung von α -Casein werden nur sechs Phosphopeptide detektiert (Abb. 3.36 A). Im Spektrum für die Aufreinigung von β -Casein (Abb. 3.36 B) wird lediglich das Monophosphopeptid detektiert, während das vierfach phosphorylierte Peptid und die in 10%-iger Verunreinigung enthaltenen Phosphopeptide, die vom α -Casein stammen, nicht im Spektrum sichtbar sind. Im Falle des Ovalbumins wird das Problem der unspezifischen Bindung von unphosphorylierten Peptiden sehr deutlich (Abb. 3.36 C). Während im MALDI-Spektrum viele Signale erkennbar sind, ist lediglich eines davon einem Phosphopeptid zuzuordnen, und das bei sehr schwacher Signalintensität. Durch Besetzung der Bindestellen mit unphosphorylierten Peptiden sind diese nicht mehr durch die in der Probe befindlichen

Phosphopeptide verdrängbar, da die benötigte höhere Affinität gegenüber der unspezifischen Bindung nicht ausreicht.

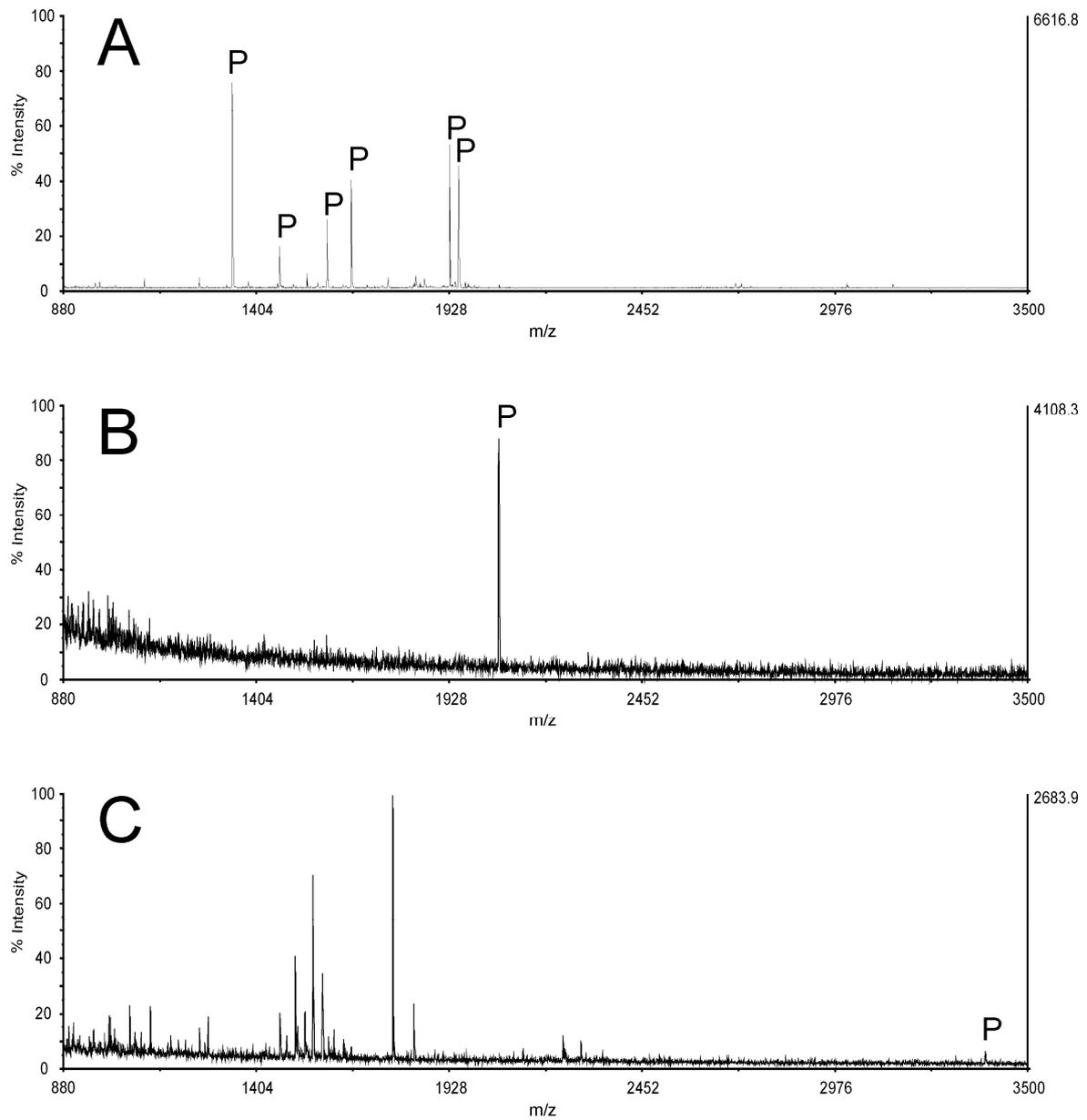


Abb. 3.36: Aufreinigung von je 100 fmol Modellprotein mit IMAC. (A) α -Casein, (B) β -Casein und (C) Ovalbumin.

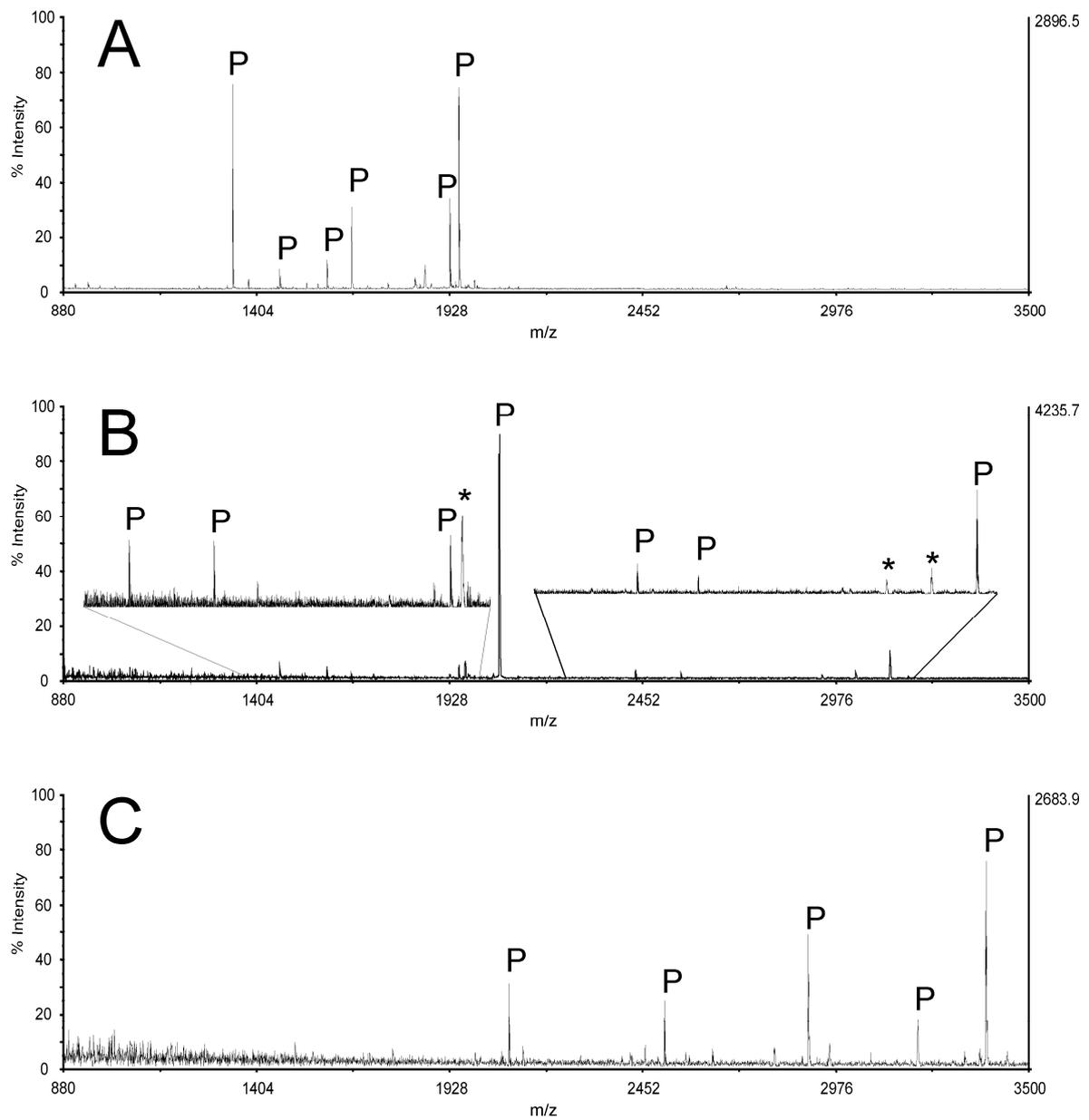


Abb. 3.37: Aufreinigung von je 100 fmol Modellprotein mit TiO_2 . (A) α -Casein, (B) β -Casein und (C) Ovalbumin.

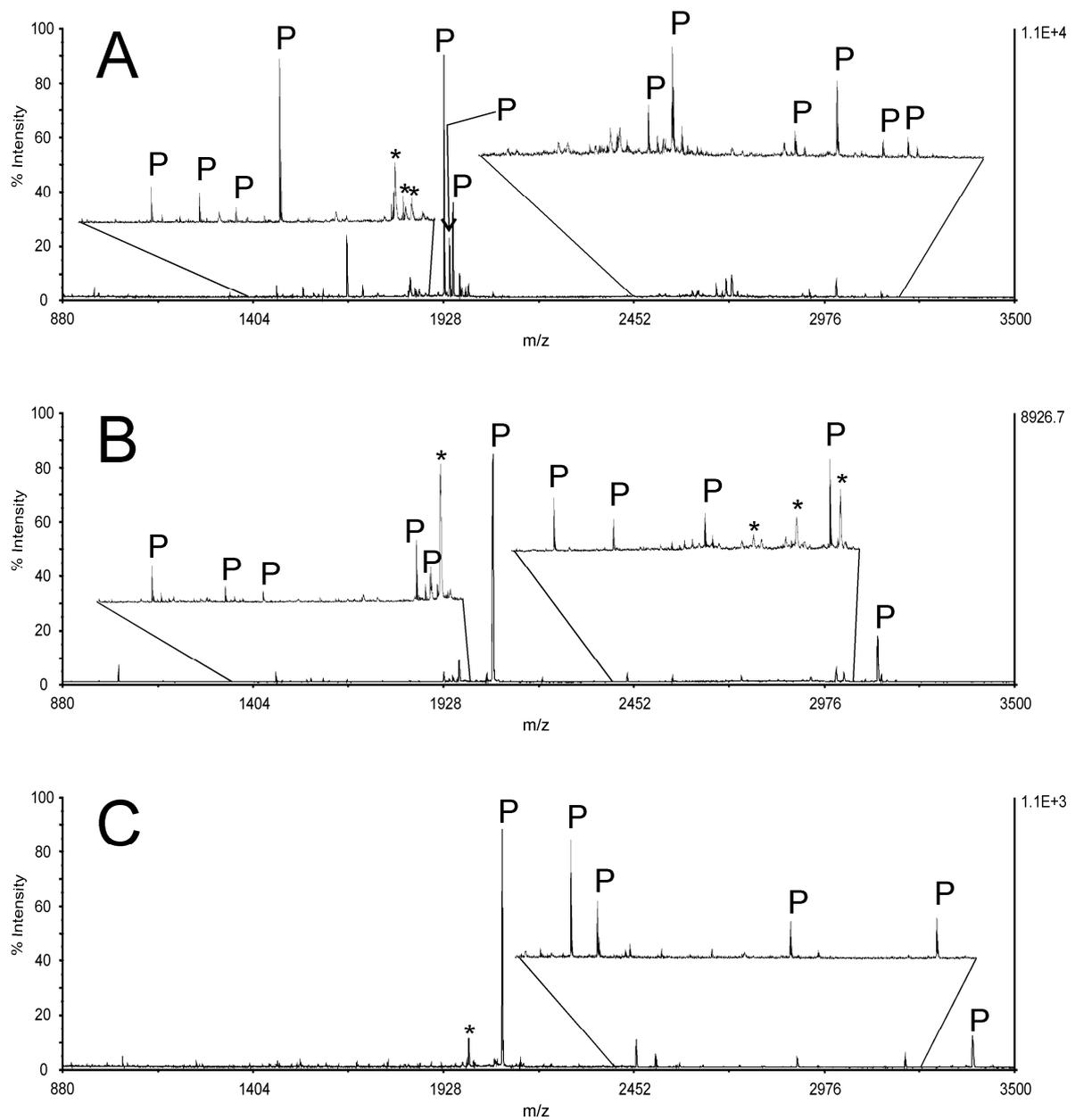


Abb. 3.38: Aufreinigung von je 100 fmol Modellprotein mit der Phosphonatoberfläche. (A) α -Casein, (B) β -Casein und (C) Ovalbumin.

MH+	Aminosäuresequenz	IMAC	Titandioxid	Phosphonat
1466,6	TVDMEpSTEVFTK	267	272	51
1539,6	EQLpSTpSEENSKK	91	29	43
1594,7	TVDMEpSTEVFTKK	443	421	21
1660,8	VPQLEIVPNpSAEER	730	781	228
1927,7	DIGpSEpSTEDQAMEDIK	928	835	962
1943,2	TKLpTEEEKNRLNFLK			237
1951,9	YKVPQLEIVPNpSAEER	752	1126	334
2678,0	VNELpSKDIGpSEpSTEDQAMEDIK			33
2721,0	QMEAEpSlpSpSpSEEIVPNpSVEQK			40
2935,2	EKVNELpSKDIGpSEpSTEDQAM EDIK			20
3008,0	NANEEEEYSIGpSpSpSEESAETATEEVK			44
3088,0	NANEEEEYSIGpSpSpSEEpSAEVATEEVK			12
3132,2	KNTMEHVpSpSpSEEpSIISQETYKQEK			13

Tabelle 3.7: Detektierte Phosphopeptide in der α -Casein-Probe (100 fmol mit ihren entsprechenden S/N-Ratios).

MH+	Aminosäuresequenz	IMAC	Titandioxid	Phosphonat
1466,6	TVDMEpSTEVFTK		16	9
1539,6	EQLpSTpSEENSKK			14
1594,7	TVDMEpSTEVFTKK		16	11
1927,7	DIGpSEpSTEDQAMEDIK			21
1951,9	YKVPQLEIVPNpSAEER		14	15
2062,8	FQpSEEQQQTEDELQDK	30	256	502
2432,1	IEKFQpSEEQQQTEDELQDK		6	8
2556,5	KIEKFQpSEEQQQTEDELQDK		6	13
2747,1	NTMEHVpSpSpSEEpSIISQETYKQ			9
3008,0	NANEEEEYSIGpSpSpSEESAETATEEVK			8
3122,3	RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR		23	60

Tabelle 3.8: Detektierte Phosphopeptide in der β -Casein-Probe (100 fmol) mit ihren entsprechenden S/N-Ratios).

MH+	Aminosäuresequenz	IMAC	Titandioxid	Phosphonat
2088,9	EVVGpSAEAGVDAASVSEEFR		20	173
2454,1	LPGFGDpSIEAQCGTSVNVHSSLR			12
2511,1	LPGFGDpSIEAQCGTSVNVHSSLR		19	13
2901,4	FDKLPGFGDpSIEAQCGTSVNVHSSLR		22	61
3198,5	VVRFDKLPGFGDpSIEAQCGTSVNVHSSLR		8	107
3383,7	KVVRFDKLPGFGDpSIEAQCGTSVNVHSSLR	5	36	185

Tabelle 3.9: Detektierte Phosphopeptide in der Ovalbumin-Probe (100 fmol mit ihren entsprechenden S/N-Ratios).

Mit Einführung von TiO_2 als Chromatographiematerial für die Anreicherung verband sich die Hoffnung der geringeren unspezifischen Bindung einhergehend mit dem Zugewinn an Sensitivität. In der vorliegenden Arbeit konnten beides bestätigt werden. Sowohl im Hinblick auf die Sensitivität als auch Selektivität zeigt TiO_2 verbesserte Leistungsdaten. Während im Spektrum des α -Caseins kaum Unterschiede zur Aufreinigung mit IMAC-Beads erkennbar sind, so zeigt sich die höhere Sensitivität deutlich bei der Anreicherung von Phosphopeptiden bei β -Casein als Probe. Da dieses zu 10 % produktionstechnisch mit α -Casein verunreinigt ist, enthält es noch zusätzliche Phosphopeptide neben denen des β -Caseins. Während mit IMAC-Beads lediglich ein Phosphopeptid des β -Caseins detektierbar war, sind bei der Aufreinigung mit TiO_2 neben dem vierfach phosphorylierten Peptid des β -Caseins mit 3121,3 Da auch noch zwei weitere Peptide mit 2431,1 Da und 2555,5 Da erkennbar, welche aus der unvollständigen Spaltung mit Trypsin entstanden sind (Tabelle 3.8). An der Aufreinigung der β -Caseinprobe erkennt man die höhere Sensitivität des Titandioxids gegenüber IMAC. Das Problem des Auftretens unspezifischer Bindung an IMAC ist durch den Einsatz von TiO_2 wesentlich verringert. Veranschaulichen lässt sich dies am Spektrum des Ovalbumins. Mit IMAC war lediglich ein Phosphopeptid des Ovalbumins im Spektrum erkennbar (Abb. 3.36 C), während viele hohe Peaks von unphosphorylierten Peptiden des Proteins stammen. Durch Aufreinigung des Proteins mit TiO_2 als Affinitätsmedium sind fünf Phosphopeptide (für Massen der Phosphopeptide s. Tabelle 3.9) detektierbar. In dem entsprechenden Spektrum sind keine unphosphorylierten Peptide sichtbar, was für die verbesserte Selektivität von Titandioxid gegenüber IMAC spricht. Hier zeigt sich der Fortschritt gegenüber IMAC am eindrucksvollsten, da alle vorhandenen Signale von einem Phosphopeptid stammen. Es sind keine zusätzlichen Signale vorhanden, die die Analyse erschweren bzw. verlängern, da diese nicht per MS/MS näher untersucht werden müssen. Im direkten Vergleich zu IMAC lassen sich mehrere Schlussfolgerungen ziehen: TiO_2 weist eine höhere Sensitivität auf, welches die Gefahr des Verlustes von Analyten minimiert und gleichzeitig durch höhere Selektivität weniger unspezifische Bindung zeigt, wodurch die unnötige Untersuchung von unphosphorylierten Peptiden in Fragmentierungsexperimenten unterbunden wird.

In Abb. 3.38 sind die MALDI-Spektren der drei Modellproteine α -Casein, β -Casein und Ovalbumin zu sehen. Die Spektren wurden erhalten, nachdem die Analyten direkt auf der Phosphonat-Oberfläche angereichert wurden. Die festgehaltenen Phosphopeptide wurden auf selbiger Oberfläche direkt im MALDI-Gerät vermessen. Alle drei Spektren der Modellproteine zeigen eine signifikante Verbesserung verglichen mit IMAC und TiO_2 (Abb.

3.38). Bei allen drei Proben konnten Phosphopeptide sowohl in Zahl als auch Signalintensität gesteigert erfasst werden. Während für 100 fmol α -Casein mit IMAC und Titandioxid sechs Phosphopeptide qualitativ ermittelt werden konnten, nahm ihre Zahl bei Aufreinigung mit der Phosphonatoberfläche signifikant auf dreizehn zu (Tabelle 3.7). Diese zusätzlichen Phosphopeptide liegen allesamt im höheren Massenbereich von 1942 Da bis 3131 Da. Dies ist eine interessante Beobachtung, da gerade im höheren Massenbereich (>2000 Da) die Detektion von Peptiden im Reflektormodus instrumententechnisch eine Herausforderung darstellt. Im Falle der β -Caseinprobe konnte die Ausbeute an phosphorylierten Peptiden gegenüber Titandioxid von sieben auf elf deutlich gesteigert werden (Tab. 3.8). Für fast alle erfassten Analyten wurden verbesserte S/N-Verhältnisse erreicht, womit eine bessere Ausgangslage für anschließende MS/MS-Experimente besteht und somit die Wahrscheinlichkeit steigt, mehr Sequenzinformation zu generieren.

Im Hinblick auf unspezifische Bindung von unphosphorylierten Peptiden zeigt sich im Vergleich zu IMAC-*Beads* nahezu keine unspezifische Bindung bei der Aufreinigung von Ovalbumin (Tab. 3.9). Bei der Analyse dieses Phosphoproteins konnte im Vergleich zum Titandioxid bei ebenfalls nicht detektierbarer unspezifischer Bindung ein zusätzliches Phosphopeptid detektiert werden. Bei den verbliebenen Analyten konnte fast durchgehend eine Steigerung in den S/N-Verhältnissen erzielt werden. Hierin zeigt sich die Möglichkeit der Phosphonatoberfläche durch hohe Sensitivität und gute Spezifität Phosphopeptide in geringeren molaren Mengen anzureichern, bei denen die etablierten Techniken IMAC und Titandioxid an ihre Leistungsgrenzen stoßen.

Berichte über erfolgreiche Untersuchungen von Phosphopeptidproben im niedrigen Femtomolbereich sind sehr selten. Sehr häufig werden hohe Analytmengen eingesetzt oder die Analytkonzentration ist nicht genau angegeben bzw. nicht bekannt. Anhand von Beispielspektren für die Aufreinigung von 10 fmol Ovalbumin wird die Leistungsfähigkeit der Anreicherungstechnik der drei näher untersuchten Methoden deutlich. An den repräsentativen Spektren zur Aufreinigung von 10 fmol Ovalbumin wird ersichtlich, dass IMAC, Titandioxid und Phosphonatoberfläche grundlegend unterschiedliche Ergebnisse bei der Aufreinigung solcher geringer Mengen liefern (Abb. 3.39). Mit IMAC-*Beads* sind im Eluat keinerlei Signale sichtbar. Ein Grund hierfür könnte in der Struktur der *Beads* liegen, da diese porös sind, und somit ist die Wahrscheinlichkeit nicht gering, dass Peptide hierin verloren gehen und sich der Analyse entziehen. Der Einsatz von Titandioxid in Pipettenspitzen führt hier schon zu wesentlich besseren Ergebnissen. Mit dieser Technik lassen sich drei

Phosphopeptide im Eluat nachweisen, wobei ihre Signalstärken gerade über dem Rauschen liegen. Die Anreicherung von 10 fmol Ovalbumin mit der Phosphonatoberfläche erzielte die gleichen Phosphopeptide wie bei der Durchführung mit Titandioxid, allerdings sind die Signalintensitäten bzw. S/N-Verhältnisse wesentlich höher (Abb. 3.39 C). Ein Aspekt, der hier sicherlich von Bedeutung ist, ist die Fokussierung der Probe auf den Phosphonatmodifizierte Oberflächen, welche per se zu einer höheren Sensitivität führt, da es automatisch zu einer Aufkonzentrierung kommt. Ausserdem ist im Falle der Phosphonatoberfläche der Verlust von Analyt weitestgehend minimiert, da es keine örtliche Trennung von Aufreinigung und MALDI-Messung gibt. Beim Einsatz von IMAC und TiO_2 , welche in Pipettenspitzen immobilisiert sind, muss ein Transfer des Analyten auf einen separaten Probenhalter erfolgen. Bei diesem Schritt kann es durchaus zu Verlust von geringen Probenmengen kommen. Wird im niedrigen Femtomolbereich gearbeitet, kann dies zum Verlust des kompletten Analyten führen.

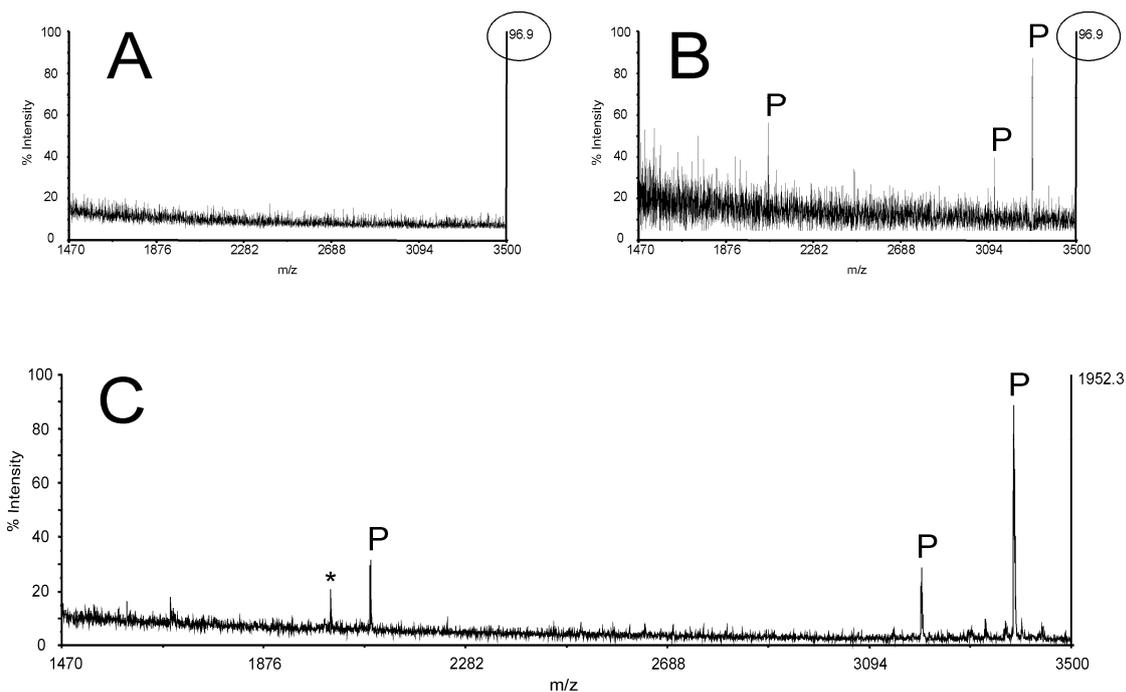


Abb. 3.39: Aufreinigung von 10 fmol Ovalbumin mit der Phosphonatoberfläche. „P“ = Phosphopeptid, „*“ = Neutralverlust.

3.3. Einsatz der Phosphonat-Oberfläche für die Analyse von realen Proben

3.3.1 Untersuchung der Mitogen Activated Protein Kinase 1 (MAPK1)

In den vorangegangenen Abschnitten konnte die Überlegenheit der mit Zirkoniumionen beladenen Phosphonat-Oberfläche gegenüber den etablierten IMAC- und Titandioxid-Methoden im Hinblick auf Sensitivität und Selektivität anhand von Modellproteinen (α -Casein, β -Casein und Ovalbumin) demonstriert werden. Modellproteine sind hervorragend geeignet, wichtige analytische Aspekte wie Empfindlichkeit und Spezifität einer Aufreinigungstechnik zu erörtern, da sie in hohem Reinheitsgrad und damit genau messbarer Menge erhältlich und einsetzbar sind. Somit lassen sich zuverlässige Aussagen zu vorliegenden Phosphoprotein/Phosphopeptid-Mengen in einem spezifischen Experiment bzw. Ansatz machen, welches einen reproduzierbaren und nachvollziehbaren Vergleich unterschiedlicher Aufreinigungsmethoden ermöglicht. Zwar können mit Modellproteinen weitestgehend Szenarien einer „echten“ Probe simuliert werden, jedoch enthält Letzere häufig Faktoren, die nicht simulieren lassen: unbekannte Zusammensetzung der Probe (häufig Gemisch mehrerer Proteine), Verunreinigung mit Salzen und Detergenzien, unterschiedlicher Phosphorylierungsgrad der entsprechenden Spezies etc. Um auch diese nicht-simulierbaren Verhältnisse zu untersuchen, wurden zwei „echte“ Proben mit der Phosphonatoberfläche untersucht. Diese Proben sind dadurch gekennzeichnet, dass sie mit gängigen Phosphoproteom-Proben sowohl im Hinblick auf limitierte Proteinmenge als auch Reinheitsgrad vergleichbar sind.

Als ein Vertreter einer Tyrosin-Phosphorylierung diene die humane MAPK1 (Mitogen activated Kinase 1). Dieses Protein gehört zur großen Gruppe der Proteinkinasen und beeinflusst somit in der Zelle u.a. die Genexpression, die Zelldifferenzierung und die Apoptose (Pearson *et al.*, 2001). Wie in der Einleitung bereits erörtert stellen Phosphorylierungen an Tyrosinen eine besondere analytische Herausforderung dar (s. Kap. 1.1). Die MAPK1 wurde in Lösung mit Trypsin als Protease verdaut und anschließend auf der mit Zirkonium beladenen Phosphonatoberfläche aufgereinigt und per MALDI-MS vermessen. Ohne eine Aufreinigung, besteht bei der vorliegenden Probe nicht die geringste Chance, phosphorylierte Peptide im MS-Modus zu detektieren. Es sind ausschließlich unphosphorylierte Peptide im Spektrum sichtbar. Insgesamt sind die Signalintensitäten der detektierbaren Analyten recht hoch. Phosphopeptiden zuordnenbare Peaks sind jedoch auch bei eingehender Inspektion der Spektren nicht nachweisbar. Da die absolute Menge an

Phosphopeptiden auf dem Proben­teller nicht über der Detektionsgrenze des MALDI-Instruments liegt, ist die Notwendigkeit gegeben, einen vorgeschalteten Aufreinigungsschritt der Probe einzufügen. Im vorliegenden Fall wurde deshalb entschieden, mit der Phosphonatoberfläche unphosphorylierte Peptide zu entfernen bzw. phosphorylierte Peptide anzureichern. Diese Prozedur sollte dafür sorgen, dass ausreichend hohen Mengen an Phosphopeptiden sich auf dem MALDI-Proben­teller befinden, die eine MS-Messung möglich macht.

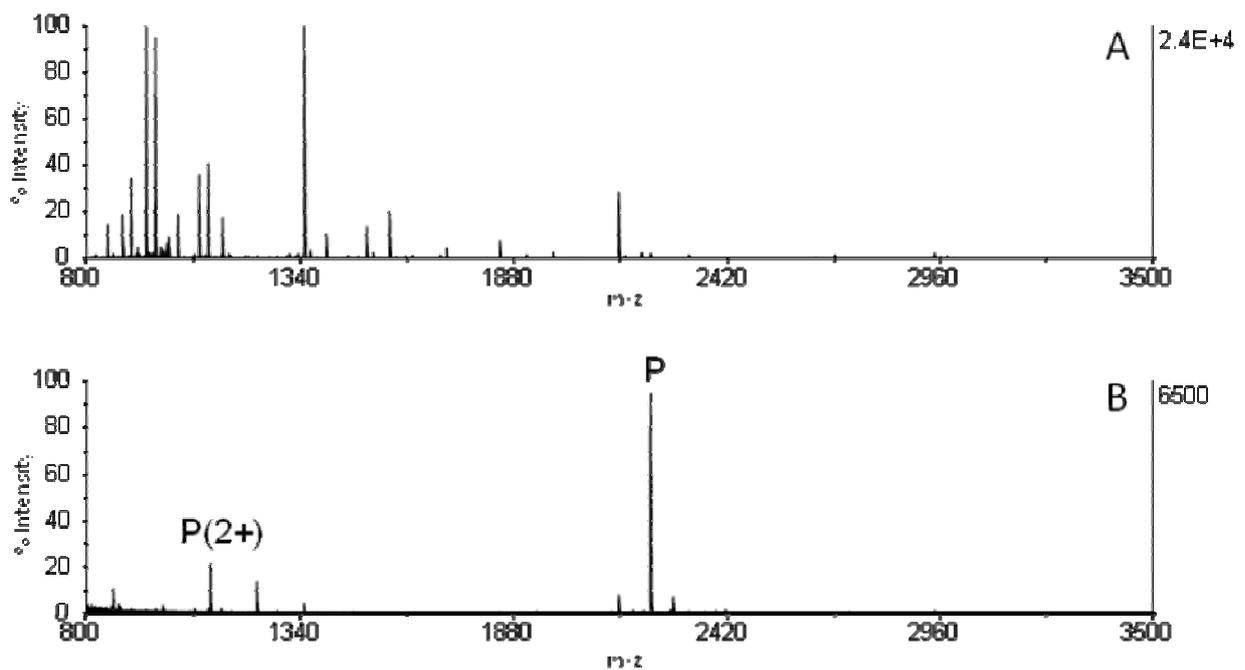


Abb. 3.40: *Aufreinigung eines in-Lösungs-Verdau der MAPK1. A: Kontrolle, B: MALDI-Spektrum nach der Aufreinigung auf der Phosphonatoberfläche.*

Der Vergleich des MAPK1-Verdau einmal unprozessiert (Abb. 3.40 A) und einmal nach Aufreinigung auf der Phosphonatoberfläche (Abb. 3.40 B) zeigt, dass sich die Spektren aus den beiden Herangehensweisen substantiell unterscheiden. Insgesamt nimmt die Anzahl detektierbarer Peptide nach der Aufreinigung ab, welches eine signifikante Abreicherung von nicht phosphorylierten Peptiden aus der Analysenlösung darstellt. Der mit Abstand höchste Peak bei 2223 m/z ist einem Phosphopeptid der MAPK1 zuzuordnen. Dieses Phosphopeptid ist noch einmal als zweifach geladene Spezies bei 1112 m/z detektierbar. Das exemplarisch abgebildete Spektrum der aufgereinigten Probe stellt einen Kompromiss zwischen nötiger Eliminierung von unphosphorylierten Peptiden und analytisch geforderter Anreicherung der Phosphopeptide dar. Die Grundbeschaffenheit der Probe ermöglichte nicht das komplette Entfernen der nicht phosphorylierten Peptide. Neben den zwei Signalen für das

Phosphopeptide sind nur noch sehr wenige Signale von unphosphorylierten Peptiden mit geringen Intensitäten registrierbar. Dem ambitionierten Analytiker erscheint zunächst als suboptimal, dass nicht sämtliche unphosphorylierten Peptide entfernt wurden, jedoch sollte nicht vergessen werden, dass dies keinesfalls das primäre Ziel einer Phosphopeptid-Aufreinigungsmethode ist. Die oberste Intention der Anreicherungsplattform ist es, die Detektion der Phosphopeptide überhaupt erst zu ermöglichen. Ohne eine Aufreinigung mit der Phosphonatoberfläche wäre das Phosphopeptid überhaupt nicht massenspektrometrisch detektierbar gewesen. So ermöglicht der vorgeschaltete Anreicherungsschritt darüber hinaus die genaue Charakterisierung des Phosphopeptids und die exakte Bestimmung der Phosphorylierungsstelle mittels MALDI-MS/MS.

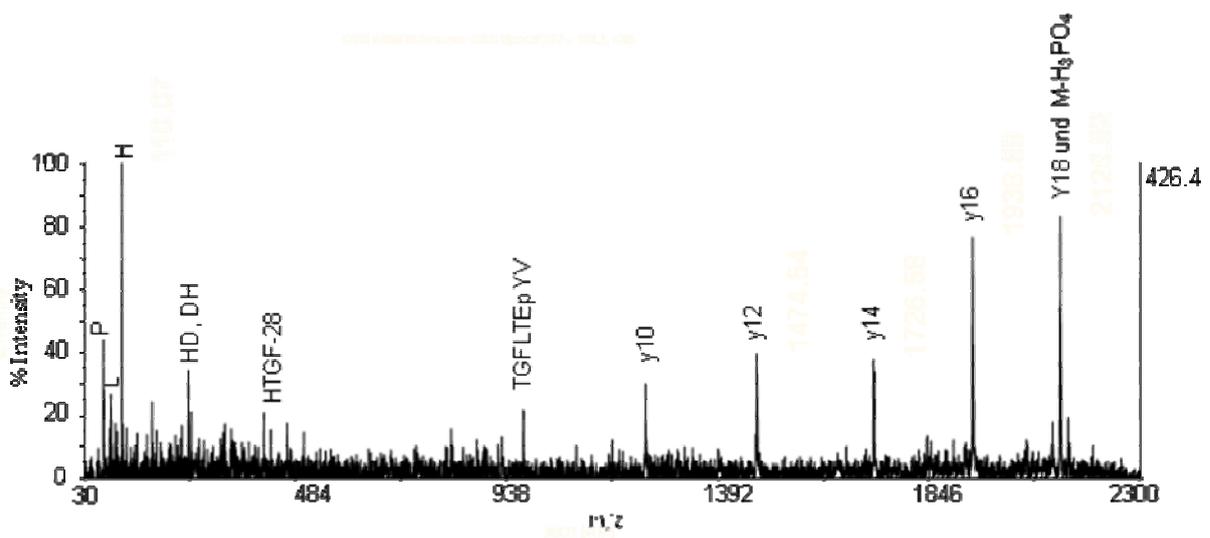


Abb. 3.41: MALDI-MS/MS Spektrum des Phosphopeptids VADPDHDHTGFLTEpYVATR mit 2223 Da.

Abb. 3.41 zeigt ein exemplarisches MALDI-MS/MS Spektrum für den *Precursor* mit 2223 Da, das nur durch Aufreinigung des tryptischen Verdau der MAPK1 generiert werden konnte. Ohne Aufreinigung konnte dieses phosphorylierte Peptid nicht detektiert werden (s. Abb. 3.40 A). Die Fragmentierung des Phosphopeptids der MAPK1 zeigt deutliche Signale, die bestimmten Immoniumionen, und y-Ionen zuordnenbar sind. Aus der Kombination dieser Informationen können zwei der möglichen vier Phosphorylierungsstellen ausgeschlossen werden. Der einfache Neutralverlust einer Phosphatgruppe verrät, dass im betrachteten Fall keine Mehrfachphosphorylierung sondern nur eine Einfachphosphorylierung vorliegt. Das y-10-Ion schließt die Modifizierung des 1. N-terminalen Threonins aus (VADPDHDHTGFLTEYVATR). Dies wird zusätzlich durch das Fragment HTGF-28Da

unterstrichen. Das Ionenfragment TGFLTEpYV beweist, dass das endständige Threonin (VADPDHDHTGFLTEYVATR) nicht phosphoryliert sein kann. Auf Grundlage des aufgenommenen MS/MS-Spektrum ist nicht zweifelsfrei determinierbar, welches der beiden verbleibenden, möglichen Aminosäuren Threonin und Tyrosin (VADPDHDHTGFLTEYVATR) phosphoryliert ist. Die geringe Signalintensität des Neutralverlusts im Vergleich zu den anderen Fragmenten (Abb. 3.41) deutet darauf hin, dass eher das Tyrosin phosphoryliert ist, da bekannt ist, dass die Tyrosin-Phosphat-Bindung stabiler gegen eine massenspektrometrische Fragmentierung ist als die Threonin-Phosphat-Bindung.

Um diesen Hinweis auf eine Tyrosin-Phosphorylierung zu untermauern, kann man sich aber der Hilfestellung von Programmen bedienen, die die Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung anhand von Phosphorylierungsmustern relativ zuverlässig berechnen können (Blom *et al.*, 2004). NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) ist z.B. solch ein Programm. Das Programm teilt den möglichen modifizierten Aminosäuren bestimmte Scores zu, die durch Analyse der direkten Umgebung der betroffenen Aminosäure ermittelt werden (z.B. Vorhandensein von sauren oder basischen Aminosäuren oder bestimmter Sequenzmotive die eine Phosphorylierung begünstigen). Für die Untersuchung des vorliegenden Phosphopeptids mit der Aminosäuresequenz VADPDHDHTGFLTEYVATR wurde diese Sequenz in die Suchmaske des Programms eingegeben. Nach einer kurzen Zeit gibt das Programm das Ergebnis in Form von Scores für die 4 theoretisch möglichen Aminosäuren aus. Wie bereits oben erwähnt, können zwei der 4 Aminosäuren als mögliche Phosphorylierungsstellen bereits auf Grundlage der Fragmentierung im MS/MS-Modus ausgeschlossen werden. Abb. 3.42 gibt einen *Screenshot* vom Ergebnis der Vorhersage mit NetPhos. Das Programm gibt der Tyrosin-Phosphorylierung den höchsten Score von 0,620. Die Scores für die Threonine (0,034-0,121) liegen deutlich unter dem *Threshold*, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass diese phosphoryliert sind, sehr niedrig ist.

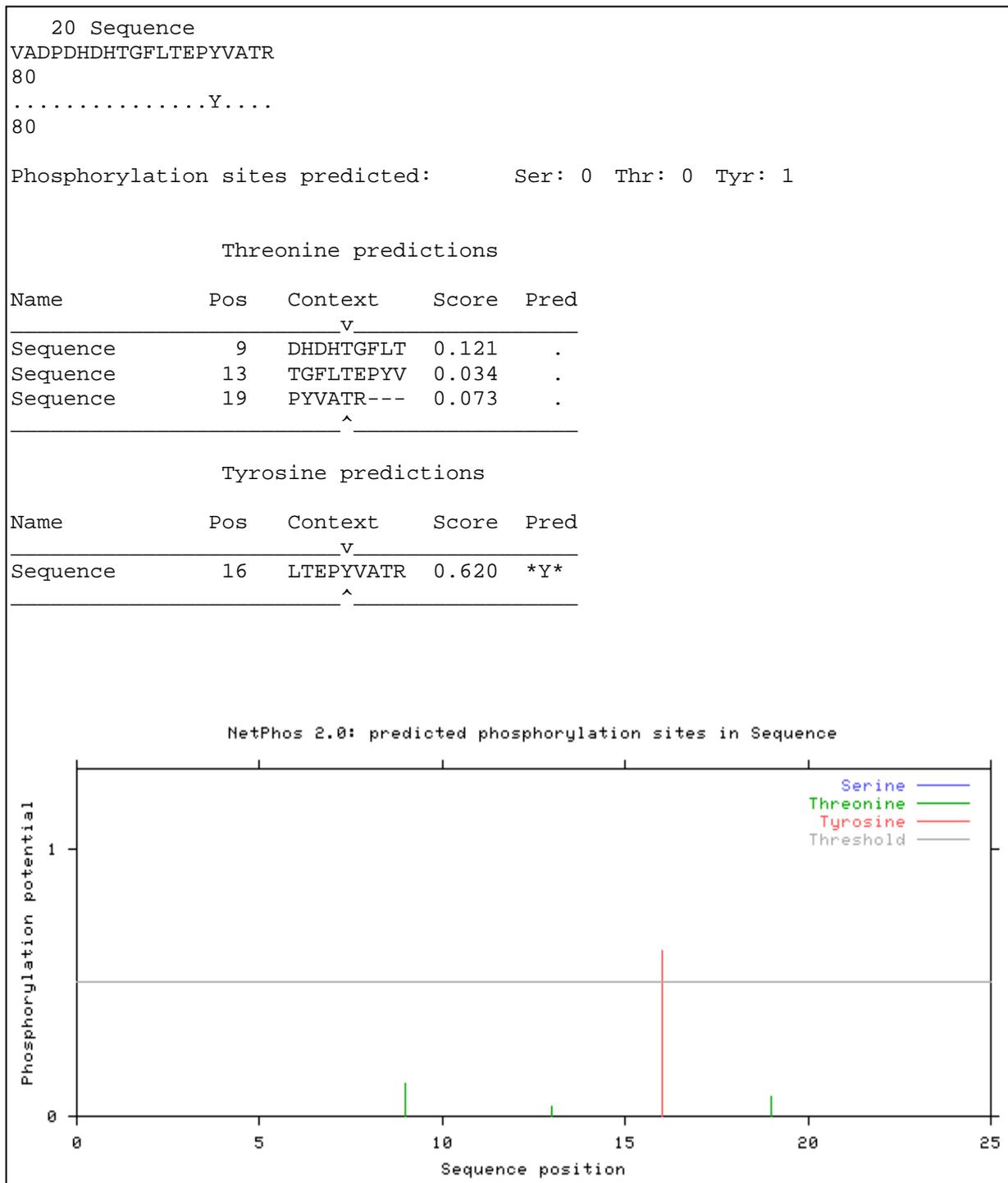


Abb. 3.42: Screenshot für die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten der Phosphorylierungstellen für das Phosphopeptid mit der Aminosäuresequenz VADPDHDHTGFLTEPYVATR. Die chemisch möglichen Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen. Aus der Berechnung des Programms wird die Phosphorylierung des Thyrosins als am wahrscheinlichsten erachtet.

3.3.2 Aufreinigung des Heatshock Protein B1

Zur Demonstration der Anwendbarkeit der Phosphonatoberfläche auf geringe Probenmengen aus einem In-Gel-Verdau sollen exemplarisch die Ergebnisse des HSP-B1 (Heatshock Protein B1) gezeigt werden. Hier wurden ausgehend von Hela-Zellen zunächst mit Hilfe des *Phosphoprotein Purification Kits* (Qiagen) Fraktionen gesammelt. Jene Aliquots, die nach Anfärbung mit dem Phosphoprotein-spezifischen Farbstoff ProQ Diamond die intensivste Färbung zeigten, wurden vereinigt und enthaltene Proteine über eine 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde mit ProQ Diamond Farbstoff zur Darstellung der Phosphoproteine angefärbt. Der entsprechende Gelspot des HSP B1 wurde ausgestanzt und einem Verdau mit Trypsin unterzogen.

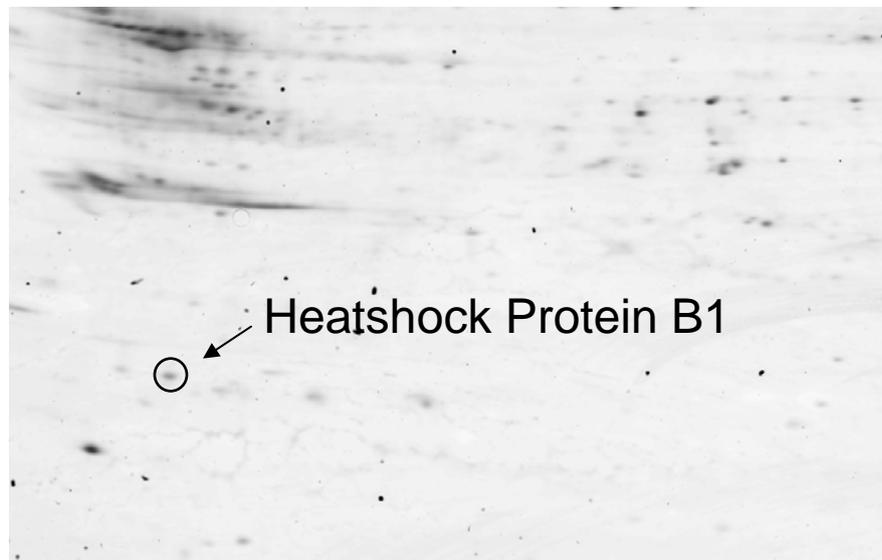


Abb.3.43: Ausschnitt aus einem 2- Gel, welches mit dem Phosphoprotein-spezifischen Farbstoff ProQ Diamond angefärbt wurde. Die Position des HSP B1-Spots ist in der Grafik eingekreist.

Anhand des HSP B1 kann man sehr gut sehen, dass die Phosphonatoberfläche für sehr niedrig vorliegende Phosphoproteinmengen aus 2D-Gelen hervorragend geeignet ist. Bis das Protein schließlich zur Aufreinigung auf die Phosphonatoberfläche aufgetragen wurde, sind eine Vielzahl von Gewinnungs-, Aufarbeitungs-, Aufreinigungs- und Anfärbeschritten vollzogen worden. Auch wenn die anfänglich vorliegenden Hela-Zellen mit einem Proteinphosphatase-Cocktail behandelt worden sind, ist nach allen vollzogenen Probenaufbereitungsprozeduren nicht davon auszugehen, dass unter den gegebenen Bedingungen eine teilweise Dephosphorylierung des Proteins verhindert werden kann. Das heisst, dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Phosphoproteinmenge, die am Anfang der Untersuchung in den Zellen vorlag, quantitativ über das 2D-Gel auf getrennt wurden und entsprechend

generierte Phosphopeptide nach Verdau mit Trypsin und Extraktion aus dem Gel zur Aufreinigung mittels Phosphonatoberfläche zur Verfügung standen.

Das Spektrum des ohne Aufreinigung der Phosphopeptide extrahierten Peptidgemisches (Abb. 3.44 A) hat absolut gesehen recht hohe Signalintensität im MALDI-TOF Gerät (~ 35000). Doch sind diese ausschließlich nicht-phosphorylierten Peptiden zuzuordnen. Ohne Aufreinigung mittels Phosphonatoberfläche ist kein einziges Phosphopeptid detektierbar, selbst nicht mit geringen S/N-Verhältnissen.

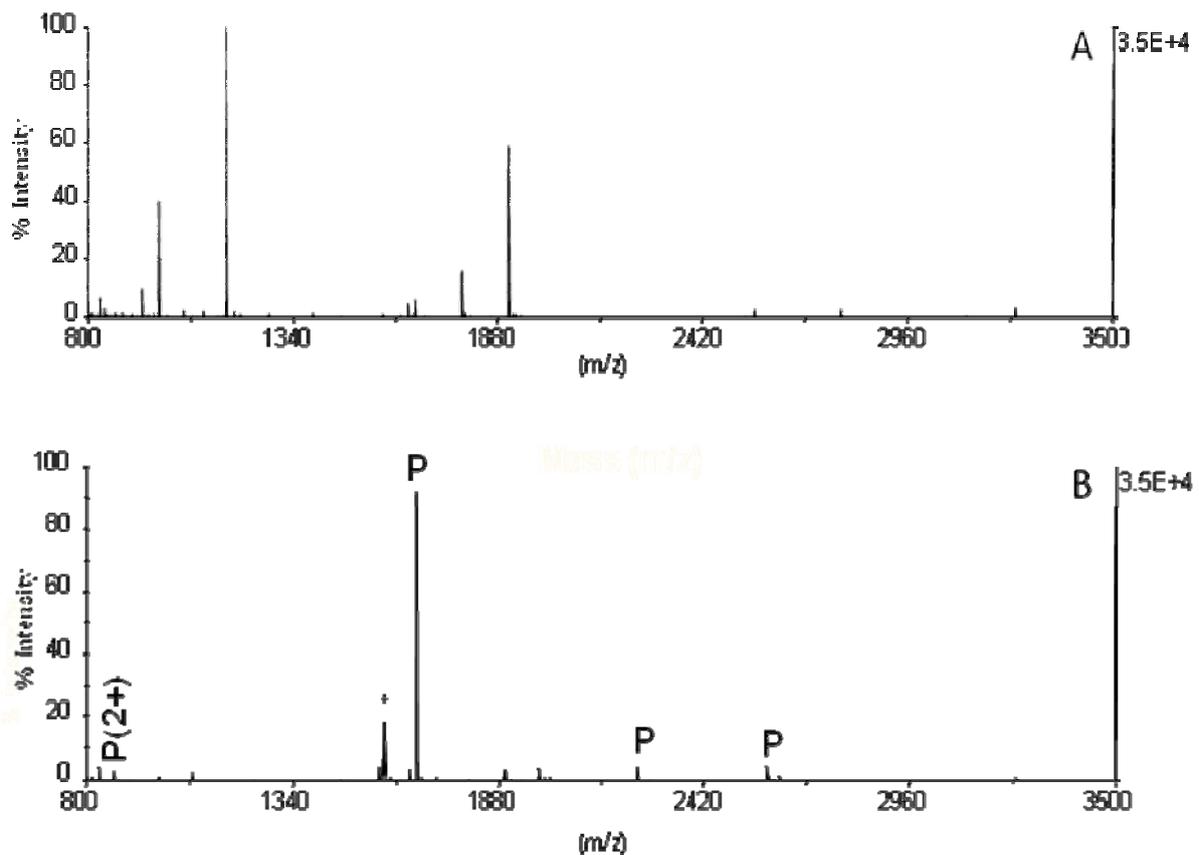


Abb. 3.44: Aufreinigung eines In-Gel-Verdau der HSP B1. A: Kontrolle, B: MALDI-Spektrum nach der Aufreinigung auf der Phosphonatoberfläche.

Würde man, wie herkömmlich gearbeitet wird, diesen *Peptide Mass Fingerprint* einer Datenbanksuche (etwa mit MacotTM) mit Phosphorylierung als mögliche Modifikation der Peptide durchführen, so würde die Datenbank keinen der aufgeführten Peptidmassen einem phosphorylierten Peptid zuordnen können. In solch einem Fall wäre die fatale Gefahr gegeben, dass die Schlussfolgerung gezogen wird, dass gar keine Phosphopeptide im Peptidgemisch vorliegen. Vergleicht man dieses MALDI-Spektrum jedoch mit dem über die Phosphonatoberfläche aufgereinigten tryptischen Verdau der MAPK1 (Abb. 3.44 B), findet

man drei Massen, die drei Phosphopeptiden zuordnenbar sind. Diese Anwendung zeigt eindrucksvoll, dass gerade bei sehr geringem Phosphorylierungsgrad eine Aufreinigung des extrahierten Peptidgemisches unabdingbar ist, wenn nach phosphorylierten Peptiden gesucht wird. Hieraus erkennt man aber auch das große Potential der Phosphonatoberfläche, unterrepräsentierte Phosphopeptide aus einem komplexen Peptidgemisch anzureichern. Könnte die Phosphonatoberfläche so in die Routinemessung (eventuell auch automatisiert) integriert werden, dass sie bei allen relevanten Phosphorylierungsfragestellungen ein fester Bestandteil der Phosphopeptidanalytik wird, so könnten quantitativ und qualitativ verbesserte Möglichkeiten der Phosphoproteinidentifizierung und –charakterisierung eröffnet werden.

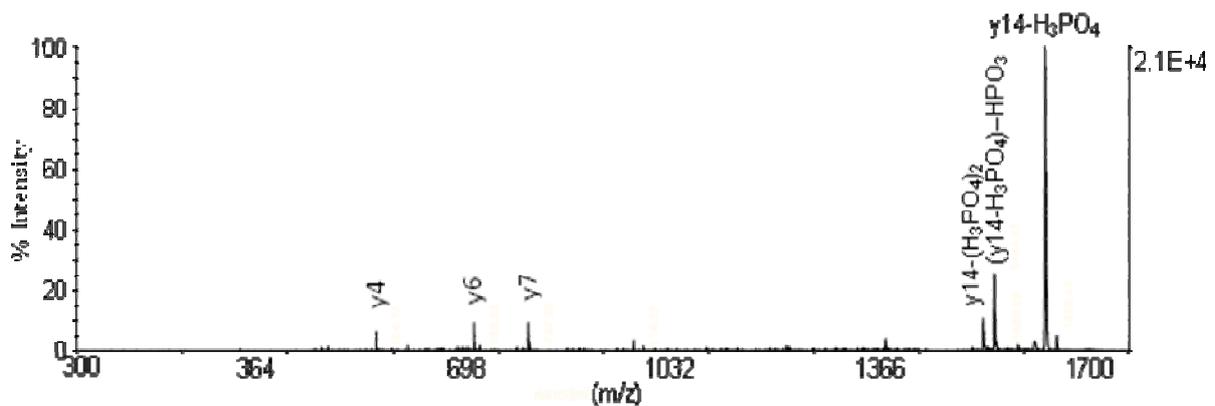


Abb. 3.45: MALDI-MS/MS Spektrum des Precursors m/z 1662 aus dem tryptischen Verdau des HSP B1.

Anhand des MALDI-MS/MS Spektrums des Precursor m/z 1662 von HSP B1 nach Aufreinigung an der Phosphonatoberfläche (stärkstes Signal in Abb. 3.44 B) lässt sich die überaus hohe Nützlichkeit des Phosphonat-modifizierten MALDI-Probentellers demonstrieren. Nachdem nicht-phosphorylierte Peptide aus dem Peptidgemisch entfernt worden sind, konnten drei Phosphopeptide im MS-Modus identifiziert werden. Die höchste Signalintensität bot von den drei phosphorylierten Peptiden das Phosphopeptid mit m/z 1662. Dieser Precursor wurde am Geräte ausgewählt und im MS/MS fragmentiert. Das Fragmentationenspektrum (Abb. 3.45) zeigt vornehmlich den Abgang der beiden Phosphatgruppen des modifizierten Peptids. Hieraus wird bereits die wertvolle Information über die Anzahl der Phosphorylierungsstelle erhalten, was eine initiale Charakterisierung des Peptids ermöglicht. Neben den beiden Neutralabgängen sind lediglich 3 weitere Fragmente zuordnenbar, die anhand ihrer Massen dem y4-, y6- und y7-Ion des Phosphopeptids mit der Amnosäuresequenz ALpSRQLpSSGVSEIR zuordnenbar sind. Durch die exakte Bestimmung des Molekulargewichtes des intakten Peptids in Kombination mit der Bestimmung, dass hier

zwei Phosphorylierungsstellen vorliegen, kann die entsprechende Aminosäuresequenz des Analyten ermittelt werden.

Die unmodifizierte Aminosäuresequenz dieses Peptids ist ALSRQLSSGVSEIR. Dass dieses Peptid zwei Phosphatgruppen trägt, kann zweifelsfrei von den dominierenden Neutralabgängen abgeleitet werden (s. Abb. 3.44). Aus den vorliegenden Aminosäuren geht hervor, dass prinzipiell vier Aminosäuren, alle vier Serine, durch ein Phosphat modifiziert sein könnten. Um nun die beiden Phosphorylierungsstellen exakt den beiden Serinen zuordnen zu können, sind weitere Informationen notwendig. Diese werden durch andere im MS/MS-Spektrum vorhandene Fragmentationen des Phosphopeptids geliefert. Im unteren Massenbereich des Spektrums werden drei y -Ionen detektiert: y_4 , y_6 und y_7 . Alle diese drei Fragmentationen belegen, dass die beiden C-terminalen Serine nicht phosphoryliert sind. Somit ist zweifelsfrei belegt, dass nur die beiden N-terminalen Serine chemisch mit einem Phosphatrest posttranslational modifiziert sein können.

3.4 Quantifizierung der Phosphorylierung von Ovalbumin

Die Quantifizierung von Proteinen und Peptiden im Bereich Proteomics erfordern in der Regel den Einsatz von Derivatisierungsreagenzien (ICAT, ITRAQ (s. Kapitel 1.5)). Diese Methoden sind zeitlich je nach Fragestellung recht aufwendig. Durch einfache Dephosphorylierungsreaktion mit Alkalischer Phosphatase wurde eine Methode entwickelt, mit der man den Phosphorylierungsgrad eines Peptids sehr schnell ermitteln kann, ohne dass der Analyt derivatisiert werden muss. Nähere Beschreibungen und Erläuterungen zur Durchführung der relativen Quantifizierung der Phosphorylierung finden sich in Kapitel 2.6.

Da MALDI in der quantitativen Bestimmung nicht häufig eingesetzt wird, musste vorher untersucht werden, ob mit MALDI anhand von Signalintensitäten überhaupt analytisch befriedigend quantifiziert werden kann. Dazu diente ein Modell, um den linearen Bereich, die Genauigkeit und Richtigkeit der Methode zu ermitteln. Als Hintergrund diente ein BSA-Verdau. Darin befand sich eine konstante Menge an unphosphoryliertem Angiotensin II. Phosphoryliertes Angiotensin II wurde in unterschiedlichen Mengen zu diesem Peptidgemisch gegeben. Die Lösungen wurden je zehnmal auf einen MALDI-Probeneller pipettiert und vermessen. Tabelle 3.10 gibt die Zusammensetzung der sieben Lösungen wieder.

Nr.	BSA	Angio	Angio-P
1	200 fmol	200 fmol	500 fmol
2	200 fmol	200 fmol	300 fmol
3	200 fmol	200 fmol	200 fmol
4	200 fmol	200 fmol	150 fmol
5	200 fmol	200 fmol	100 fmol
6	200 fmol	200 fmol	50 fmol
7	200 fmol	200 fmol	10 fmol

Tabelle 3.10: Zusammensetzung der Lösungen für die Validierung der Quantifizierung der Phosphorylierung

	Angio	P-Peptid	Angio/Cal	P / Cal
BSA 200 fmol, Angio 200 fmol, P 500 fmol	2480,41	15066,67	1,02	6,17
BSA 200 fmol, Angio 200 fmol, P 300 fmol	2385,01	9780,33	0,98	4,01
BSA 200 fmol, Angio 200 fmol, P 200 fmol	2519,23	6791,23	1,03	2,78
BSA 200 fmol, Angio 200 fmol, P 150 fmol	2642,84	4483,61	1,08	1,84
BSA 200 fmol, Angio 200 fmol, P 100 fmol	2355,31	2273,67	0,96	0,93
BSA 200 fmol, Angio 200 fmol, P 50 fmol	2414,80	751,33	0,99	0,31
BSA 200 fmol, Angio 200 fmol, P 10 fmol	2291,11	219,33	0,94	0,09

Tabelle 3.11: Normalisierung der gemessenen Signalintensitäten der Angiotensine II. Gemittelte Signalintensitäten für das unphosphorylierte Peptid (Angio) und das Phosphopeptid (P-Peptid) aus je 10 Messungen und in den grauen Spalten deren normalisierte Werte nach Berücksichtigung des internen Standards (s. Abb. 3.46).

Die Quantifizierung von Peptiden allein anhand der auftretenden Signalintensitäten ist mit zu großen Schwankungen behaftet. Deshalb ist das Messen eines einzelnen Spots, auch wenn bei der Messung eine hohe Laserschusszahl für das Spektrum gebraucht wurde, nicht repräsentativ. Denn Spot-zu-Spot Variationen werden so nicht eingerechnet. Während die mittlere Standardabweichung bei Einbeziehung von nur drei Spots bei etwa 10 % liegt, wird diese signifikant gesenkt durch Erhöhung der Spotzahl auf 10.

Ein Blick auf die Tabelle 3.11 für die ermittelten Intensitäten für das unphosphorylierte Peptid (Angio) zeigt, dass Spot-zu-Spot Unterschiede in Signalintensitäten für die sieben Lösungen lediglich bei 4,7 % liegt, wenn jede Lösung nach *dried-droplet* Präparation mit DHB / 1% Phosphorsäure als Matrix gemessen wird. Dieser Wert liegt somit deutlich unter den für bioanalytische Fragestellungen geforderten 15 % (FDA, 2001).

Dies zeigt sehr deutlich, dass trotz Einsatz von DHB als MALDI-Matrix ein analytisch aussagekräftiges Resultat erzielt werden kann, wenn die Schusszahl pro Spot entsprechend

hoch ist (2000 Laserschüsse) und entsprechend viele Präparationen pro Lösung gemessen werden.

Abb. 3.46 gibt graphisch noch einmal die ermittelten Werte für das Phosphopeptid und das unphosphorylierte Peptid wieder. Man erkennt für das in allen Lösungen in gleicher Menge vorhandene unmodifizierte Peptid als konstante Linie wieder. Die auftretenden Schwankungen sind so gering, dass die Fehlerbalken nicht dargestellt werden können. Die Linearität über einen Bereich von fünfzig Größenordnungen (10 fmol bis 500 fmol) ist gegeben. Der untersuchte Bereich von 10 fmol bis 500 fmol ist so gewählt worden, dass er auch im Bereich von realen Probenmengen liegt und somit auf echte Phosphoproteomics-Fragestellungen anwendbar ist. Der erzielte Korrelationskoeffizient R^2 mit 0,9896 ist für eine Quantifizierung im Bioanalytikbereich deutlich über dem von der FDA geforderten Wert von 0,95 (FDA 2001).

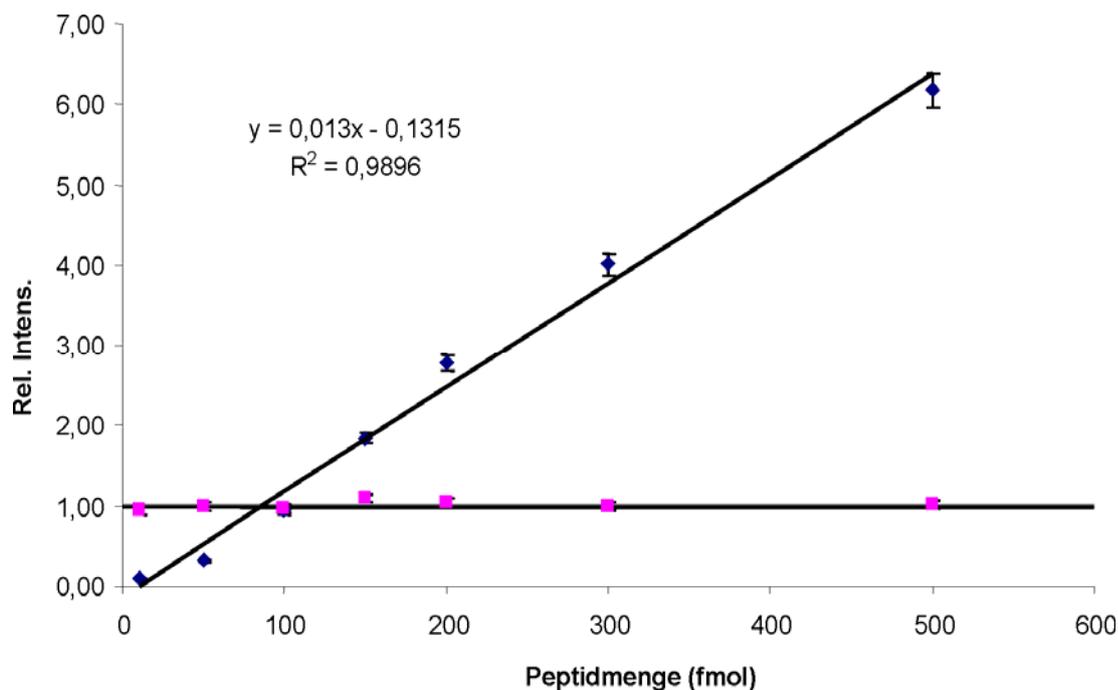


Abb.3.46: Darstellung der ermittelten relativen Intensitäten in Abhängigkeit von der Peptidmenge. In Blau ist die Regressionsreihe mit Funktion für das phosphorylierte Peptid angegeben, während in rosa deutlich die konstante relative Intensitäten für das unphosphorylierte Peptid zu erkennen ist, wobei die Schwankungen grafisch nur unzureichend wiedergegeben werden können.

Nachdem der Linearitätsbereich, die Bestimmungsgenauigkeit und die Richtigkeit der Quantifizierung über normalisierte Signalintensitäten mit MALDI-MS ermittelt wurden, wurde die Methode zur relativen Quantifizierung der Phosphorylierung eines Phosphopeptids aus einem tryptischen Verdau von Ovalbumin angewendet. Abb. 3.47 zeigt einen Ausschnitt aus einem tryptischen Verdau von Ovalbumin. Man erkennt deutlich das Phosphopeptid (P) sowie das unphosphorylierte Peptide (DP) mit einer Massendifferenz von 80 Da. Der mit „St“

markierte Peak diente bei den Bestimmungen als interner Standard zur Normalisierung der Signalintensitäten.

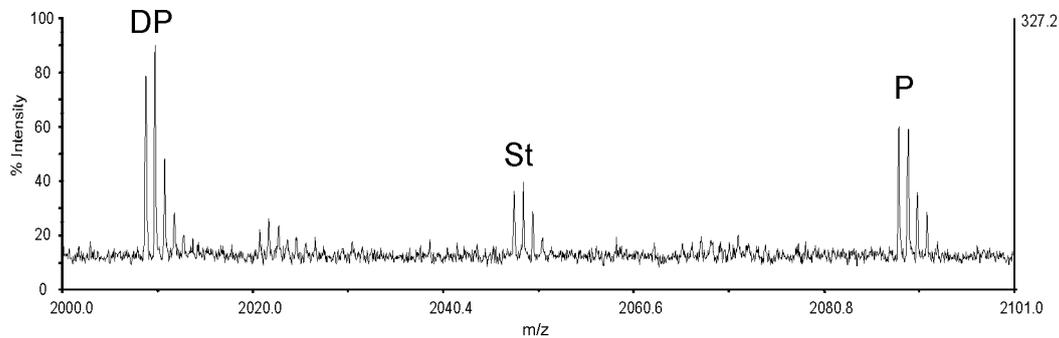


Abb. 3.47: Ausschnitt aus einem tryptischen Verdau von Ovalbumin. P = Phosphopeptid, St = Standard, DP unphosphoryliertes Peptid.

Zur Berechnung des *Response*-Faktors wurden die gegen den internen Standard normalisierten Werte aus Tabelle 3.12 herangezogen. Zur rechnerischen Herleitung des *Response*-Faktors siehe Abb. 2.2 in Kapitel 2.6. Der ermittelte *Response*-Faktor F_R hatte einen Wert von 4,344. Um diesen Wert muss der normalisierte für das Phosphopeptid korrigiert werden. Damit ergab sich ein Phosphopeptid /unphosphoryliertes Peptid-Verhältnis von 3,079:1.

	DP	P	P (corr)
Vor AP	2,13	1,51	6,559
Nach AP	8,69	0,00	0,00

$$F_R = 4,344$$

Tabelle 3.12: Normalisierte Werte für das unphosphorylierte Peptid (DP) und das Phosphopeptid, den errechneten Response Faktor (FR), sowie den um den Faktor korrigierten Wert für das Phosphopeptid (P(corr)).

4. Diskussion

4.1 Einfluss von Matrix und Säurekomponente auf die Detektion von phosphorylierten Peptiden

Schon sehr früh nach Einführung der MALDI-Technik gab es Bestrebungen, phosphorylierte Proteine mit dieser neuen Ionisierungstechnik zu charakterisieren. Zunächst beschränkte sich die Untersuchung auf die Totalmassenbestimmung von Analyten auf Protein- und Peptidebene (Yip *et al.*, 1992). Die Informationen aus solchen MS-Messungen sind sehr limitiert, da sie nur einen Hinweis auf eine vermutete Phosphorylierung allein anhand der Massendifferenz zu einem unmodifizierten Analyten geben. Deshalb war in den frühen Publikationen häufig eine Kombination mit nicht-MS Methoden, wie Dephosphorylierung nötig (Liao *et al.*, 1994). Mit den Möglichkeiten der Fragmentierung von Peptiden mit MALDI-MS/MS konnten phosphorylierte Peptide eingehend untersucht werden. Somit kam man dem Ziel viel näher, die genaue Aminosäure zu bestimmen, welche durch eine Phosphatgruppe modifiziert ist (Annan *et al.*, 1996).

In der Literatur sind nur sehr wenige Publikationen zu finden, die sich mit MALDI-Matrizes und möglichen Zusätzen zur Erhöhung der Signalintensität von Phosphopeptiden befassen. Asara und Kollegen (Asara *et al.*, 1999) benutzten Ammoniumsalze wie Diammoniumcitrat und Ammoniumacetat als Zusätze für DHB und CHCA als Matrix und beobachteten verbesserte S/N-Verhältnisse. Den Einsatz von Ammoniumsalzen für die verbesserte Detektion von Phosphopeptiden berichteten Yang *et al.*, allerdings mit THAP als MALDI-Matrix (Yang *et al.*, 2004). Die Kombination von DHB und Phosphorsäure wurde von Jensen und Kollegen (Stensballe *et al.*, 2004, Kjellström *et al.*, 2004) zur verbesserten MALDI-Detektion von phosphorylierten Peptiden vorgestellt.

Die Änderung in der Signalintensität der Analyten war verglichen mit Spektren, die ohne Zusatz von Ammoniumsalzen aufgenommen wurden kaum unterscheidbar. Ein Gewinn durch einen Einsatz von Ammonium als Zusatz zur verbesserten Detektion von Phosphopeptiden konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Auch gibt es ausser den genannten Publikationen keine weitergehenden Veröffentlichungen, die Ammoniumsalze zur MALDI-Matrix mischen, um phosphorylierte Peptide gezielt in ihrer Signalintensität zu verstärken. Im Bestreben eine noch bessere Matrix/Säure-Kombination zu finden, wurden in dieser Arbeit diverse Matrices mit verschiedenen Säuren untersucht, um herauszufinden, wovon die

MALDI-Ionisation von Phosphopeptiden abhängt. Die Kombination von DHB mit einprozentiger Phosphorsäure zeigte die besten Ergebnisse.

Bei der Wahl der MALDI-Matrix für die verbesserte Detektion von phosphorylierten Peptiden spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Der Azidität der zugesetzten Säure zur Matrix ist nur ein untergeordneter Einfluss beizumessen. TFA besitzt einen pK_s -Wert von 0,23. Phosphorsäure dissoziiert in drei Stufen mit $pK_{s1} = 2,1$; $pK_{s2} = 7,3$ und $pK_{s3} = 12,36$. Von allen eingesetzten Säuren besitzt HPF6 mit einem negativen pK_s -Wert die höchste Azidität. Alle drei Säuren sollten aufgrund ihrer niedrigen pK_s -Werte in der Lage sein, Peptide in gleichem Maße quantitativ zu protonieren. Bei der morphologischen Betrachtung von DHB / 1 % Phosphorsäure mit einem Aufsichtsmikroskop fiel der sichtbare Unterschied zur Präparation mit TFA auf. In beiden Fällen kristallisiert die Matrix in Form eines Ringes. Mit TFA wird dieser Ring durch unregelmäßige, längliche Vielecke ausgebildet. Interessanterweise sehen die Matrixkristalle mit Phosphorsäure anders aus. Die Präparation ist gekennzeichnet durch feine, langgezogene Nadeln. Insgesamt sind die Kristalle viel flacher als bei der Präparation von DHB mit TFA. Dies erklärt auch, warum die Massengenauigkeit von DHB mit Phosphorsäure der CHCA mit etwa 10 ppm bei interner Kalibrierung ebenbürtig ist. Spektren, die mit DHB aufgenommen wurden, enthielten im Vergleich zu CHCA zusätzliche Peptide im Massenbereich von 700 Da bis 1200 Da, welche durch eine relativ hohe Hydrophilie gekennzeichnet sind. In der veränderten Morphologie der DHB könnte also eine mögliche Erklärung für die verbesserte Detektion von Phosphopeptiden liegen. Diese veränderte Morphologie der Matrix kann auch eine verstärkte Inkorporierung von phosphorylierten Peptiden in die DHB-Matrix bedeuten, so dass mehr Analytmoleküle dem eigentlichen Ionisations- und Desorptionsschritt zur Verfügung stehen.

Die Härte der eingesetzten Matrix hat sicherlich auch einen wesentlichen Einfluss auf die Signalstärke von Phosphopeptiden. Karas und Kollegen (Schulz *et al.*, 2005) stellten fest, dass verschiedene Matrix-Moleküle unterschiedlich starke Tendenzen zur Bildung von Fragmentationen besitzen. Nach den Autoren stellt CHCA eine harte Matrix dar, welche Fragmentationen begünstigen, während DHB zu den weichen Matrices gehört, bei denen nur wenig oder kaum Fragmentationen am Detektor nach dem MALDI-Prozess registrierbar sind. Diese Fragmentationen können während des eigentlichen MALDI-Prozesses wie auch auf dem Weg der Analyt-Ionen zum Detektor, welcher über den Reflektor führt, stattfinden. Mit steigender Wahrscheinlichkeit der Fragmentation eines Phosphopeptides sinkt die mögliche sensitive Detektion des phosphorylierten Peptides.

Ein weiterer Aspekt für die starken Signale von phosphorylierten Peptiden mit der DHB/Phosphorsäure-Kombination könnte in der kompetitiven Verdrängung von Phosphopeptiden von Edelstahloberflächen sein. Tuytten *et al.*, (2006) fanden heraus, dass phosphorylierte Peptide eine ausserordentlich hohe Adsorption an Stahloberflächen zeigen, welche bei ersten Korrosionserscheinungen noch zunahm. Die Autoren konnten zeigen, dass durch alkalische Lösung die an den Stahlmaterialien der LC-Apparatur anhaftenden Phosphopeptide eluiert werden konnten. Auch ist nach Meinung der Autoren die Adsorption von Analyten wesentlich vom Grad der Phosphorylierung abhängig. Mit steigender Zahl von Phosphatgruppen an einem Peptid nimmt auch die Adsorption und damit der Probenverlust zu.

4.2 Quantifizierung der Phosphorylierung durch Dephosphorylierung

Die Quantifizierung in Proteomics-Anwendungen geschieht in der Regel über Derivatisierungs-Techniken wie iTRAQ, SILAC und ICAT (s. Kapitel 1.5). In groß angelegten Untersuchungen sind iTRAQ und SILAC hervorragend geeignet, um ein umfassendes Bild bezüglich der quantitativen Verhältnisse der vorliegenden Proteine zu erhalten. Der Aufwand, der betrieben werden muss, und die zeitintensive Durchführung und Auswertung ist für sehr komplexe Proben, häufig verbunden mit einer Auftrennung der Probe über einen oder mehrere LC-Läufe, angemessen. Liegt jedoch eine zahlenmäßig überschaubare Probe vor, bei der keine chromatographische Trennung über HPLC notwendig, oder will man die quantitativen Verhältnisse von wenigen bestimmten Peptiden eines interessierenden Proteins erfassen, ist der Aufwand bei Anwendung von iTRAQ und SILAC unangemessen.

SILAC ist im Falle der *in vivo* Untersuchung der Phosphorylierung gänzlich ungeeignet. Im Phosphoproteomics-Anwendungen ist häufig die Fragestellung gegeben, welche Phosphorylierungsstelle bei einem untersuchten Phosphoprotein vorliegt, wie sie in der lebenden Zelle auftritt. Der Ansatz des SILAC geht über den (Um)-Weg der Zellkultur. Hiermit kann nicht für ein interessierendes Phosphoprotein die Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades bestimmt werden, weil mehrere Faktoren unklar bleiben. Es ist nicht gewiss, dass unter den gewählten Zellkulturbedingungen überhaupt eine Phosphorylierung stattfindet. Sollte sich überhaupt eine posttranslationale Modifizierung in Form einer Phosphorylierung ereignen, dann ist deren Ausmaß ungewiss. Schließlich lassen sich aus

Zellkulturversuchen keine Rückschlüsse auf tatsächlich in lebenden Zellen stattfindenden Phosphorylierungsreaktionen ziehen.

Interessiert nur die Quantifizierung einer Phosphorylierung eines Proteins oder einer begrenzten Zahl von phosphorylierten Proteinen, so ist der Aufwand, der mit iTRAQ für die Quantifizierung notwendig ist, nicht angemessen (Zhang *et al.*, 2002). Bei dieser Methode wird die Probe in zwei Aliquote geteilt. Beide werden dann mit den entsprechenden Reagenzien versetzt. Einer von den Aliquoten wird komplett dephosphoryliert, und beide Teile werden vereinigt und anschließend per MS vermessen. Bei typischerweise sehr geringem *in vivo* Phosphorylierungsgrad, häufig im Subfemtomol-Bereich, liegt man sehr schnell ausserhalb des Detektionslimits dieser Quantifizierungsmethode. Eine interessante Quantifizierungstechnik speziell für Phosphopeptide wurde von Steen und Kollegen (Steen *et al.*, 2005) vorgestellt. Anhand der Dephosphorylierung von Phosphopeptiden wurde die unterschiedliche Ionisation (in der Publikation als „*flyability*“ genannt) der beiden Spezies nach Normalisierung bestimmt. Aus der unterschiedlichen Ionisation bestimmten die Autoren den Grad der Phosphorylierung mittels eines ESI-MS-Ansatzes.

Eine ähnliche Herangehensweise wurde in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung des Phosphorylierungsgrads anhand des Ovalbumins als Beispiel gewählt. Zur Durchführung der Quantifizierung siehe Kapitel 2.6. Steen und Kollegen machten ihre Untersuchungen zur Quantifizierung mittels ESI, während in der vorliegenden Arbeit die quantitative Bestimmung der Phosphorylierung mit MALDI untersucht wurde. Die relative Quantifizierung anhand des Ovalbumins zeigte, dass die hier präsentierte Methode sehr gut geeignet ist für die sehr schnelle Bestimmung des Phosphorylierungsgrads eines gegebenen Phosphopeptids. Ausgehend von der Bestimmung der unterschiedlichen Ionisation von Phosphopeptid zu unphosphoryliertem Peptid kann abgeleitet werden, wie das Verhältnis der beiden Spezies zueinander ist (Vgl. Kapitel 3.4). Bei vorliegendem Wissen über die absolute Menge an untersuchtem Protein ist sogar die absolute Quantifizierung einer spezifischen Phosphorylierungsstelle möglich.

Die Quantifizierung der Phosphorylierung hat aber ihre Grenzen. So ist es unbedingt erforderlich, dass die Phosphorylierung einer Aminosäure nicht zu 100 % erfolgen darf. In solch einem Fall kann der *Response*-Faktor nicht bestimmt werden. Diese Limitierung der Methode ist aber nicht gravierend, da *in vivo* (Vgl. Kapitel 1.1) die Proteinphosphorylierung nicht stöchiometrisch ist; d.h. in realen Proben wird man fast immer sowohl das Phosphopeptid wie auch den unphosphorylierten *Gegenpart* finden.

Vergleicht man den gefundenen *Response*-Faktor von $\sim 4,3$ für das Ovalbumin mit den von Steen und Kollegen publizierten „*flyability*“-Werten (0,5 – 1,74) für ihre untersuchten Phosphopeptid/Peptid-Paare, so liegt dieser im realistischen Bereich, da zum einen die Richtigkeit und Präzision der vorliegenden Methode validiert wurde (s. Kapitel 2.6.2) und zum anderen unterschiedliche Ionisationsmethoden verwendet wurden. Die Diskrepanz in den Absolutwerten der *Response*-Faktoren könnte damit erklärt werden, dass beim ESI-Ansatz doppelt- und dreifachgeladene Signale untersucht werden, während bei MALDI nur einfachgeladene Spezies registriert werden. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den kürzlich publizierten Daten von Gropengiesser und Kollegen (Gropengiesser *et al.*, 2009). Auch sie stellten in ihren Versuchen zur Ionisationseffizienz fest, dass Phosphopeptide in MALDI einen höheren *Response*-Faktor aufweisen als bei ESI.

Die hier vorgestellte Methode ist deshalb hervorragend geeignet, um *in vivo* Phosphorylierungen quantitativ zu ermitteln. Es ist keine Derivatisierungsreaktion notwendig mit den bekannten Problemen von Nebenreaktionen und unvollständigen Modifizierungen. Durch Vergleich zweier aufgenommenen MALDI-Spektren, einmal direkt und nach vollständiger Dephosphorylierung des interessierenden Phosphopeptids, ist die schnelle Bestimmung des Phosphorylierungsgrads einer Probe möglich. Es sind keine teuren Reagenzien notwendig. Die Auswertung kann ohne komplexe Software auf rein manueller Ebene erfolgen. Bei Vorliegen einer weniger komplexen Probe oder wenn nur bestimmte Proteine hinsichtlich ihres Phosphorylierungsgrads untersucht werden sollen, bietet diese Methode der Quantifizierung eine echte Alternative zum iTRAQ-Ansatz und sollte vermehrt in zukünftigen Phosphorylierungs-Untersuchungen eingesetzt werden.

Ein zukünftiges Projekt könnte auch die Frage untersuchen, ob nicht durch einfachen *In-Source-Decay*, d.h. allein durch die Anwendung einer erhöhten Laserbestrahlungsstärke, das Prinzip der relativen Quantifizierung verfolgt werden kann. Da der neutrale Verlust der Phosphorsäure im Falle von Serin- und Threonin-Phosphorylierungen bereits bei geringen Laserbestrahlungsstärken zu beobachten ist, könnte dieser Ansatz vielversprechend sein. Die Prämisse wäre, dass der *Neutral Loss* quantitativ abläuft, bevor der *Backbone* des Phosphopeptids und des internen Standard in der Probe (s. Kapitel 3.4) fragmentieren. In solch einem Falle könnte man das gleiche Prinzip anwenden und durch einen Vergleich der Spektren bei normalem Lasereinsatz und nach *Ion-Source-Decay* induziertem *Neutral Loss* den *Response*-Faktor bestimmen. Vorteil wäre, dass man die gleiche Probe, bei der gleichen MALDI-Präparation untersuchen könnte, ohne den Zwischenschritt der Dephosphorylierung zu gehen.

4.3 Anreicherungstechniken für phosphorylierte Peptide

4.3.1 Graphit als Affinitätsmedium für die Anreicherung von Phosphopeptiden

Die Idee, Graphit für die Anreicherung von Phosphopeptiden aus Peptidgemischen einzusetzen, wurde schon sehr früh verfolgt. Zunächst machte man die Beobachtung, dass Kohlenstoff vornehmlich hydrophile Peptide anreichern kann. Da die Phosphatgruppe eines Phosphopeptids den Analyten insgesamt hydrophiler macht, lag die Schlussfolgerung nahe, Graphit auch für die Anreicherung von phosphorylierten Peptiden zu verwenden. In den ersten Publikationen beschränkte sich die Anwendung auf Phosphoproteinverdau. Die Präsentation der Methodik anhand von relativ unkomplexen Proben erwies sich als wenig hilfreich, die Verwendbarkeit der Technik für reale Phosphoproteomics-Anwendungen zu demonstrieren. Liegt jedoch eine begrenzte Komplexität der Peptidprobe vor, so kann diese Anreicherungstechnik durchaus sinnvoll eingesetzt werden. Allerdings wird sie dann nicht als Technik zur hochselektiven Anreicherung von Phosphopeptiden verwendet, sondern als ein Verfahren zur Vorfraktionierung von Proben. An diese schließen sich dann häufig weitere Aufreinigungsschritte an.

Die Problematik der fehlenden Selektivität von Graphit für Phosphopeptide ist sicherlich multikausal. Zwar sind phosphorylierte Peptide tendenziell hydrophiler als die durchschnittlichen unphosphorylierten Peptide, die man nach einem enzymatischen Verdau eines Phosphoproteins findet. Man muss aber bedenken, dass dennoch häufig eine ganze Reihe von äußerst hydrophilen Peptiden vorliegen können, die nicht phosphoryliert sind. Da das Phosphopeptid keine signifikante hydrophilere Spezies als die übrigen hydrophilen unphosphorylierten Peptiden ist, ist eine spezifische Selektion des Analyten nicht möglich. Untersuchungen von *Flowthrough*- und Waschlösungen bei Aufreinigungsexperimenten zeigten sehr deutlich (s. Kapitel 3.2.1), dass die Bindungskräfte zwischen Graphit und Phosphopeptiden zu gering sind, um eine stringente Waschprozedur zu gewährleisten. Die schwachen Wechselwirkungen zwischen Affinitätsmedium und Analyten ermöglichten nicht das Waschen mit hohen Anteilen an organischen Lösemitteln und niedrigen pH-Werten, so dass der Analyt am Medium gebunden bleibt. Die Bindungskräfte zwischen Phosphopeptiden und unphosphorylierten aber hydrophilen Peptiden unterscheiden nicht merklich, so dass keine chromatographische Auftrennung der beiden Spezies erzielt werden kann. Die Gefahr des Verlustes von phosphorylierten Peptiden bereits in der Waschfraktion ist daher groß, wie die des Auftretens von vielen unphosphorylierten hydrophilen Peptiden im Eluat. Die

Untersuchung der unspezifischen Bindung beim Einsatz von Graphit für die Aufreinigung von Phosphopeptiden zeigte erstaunlicherweise, dass nicht gerade saure Peptide im Eluat zu finden sind. Die im Eluat gefundenen und per MS/MS identifizierten Peptide hatten nur teilweise hydrophilen Charakter. Insofern war erstaunlich, dass neben Peptiden mit hoher Hydrophilie auch Analyte zu finden waren, die weniger hydrophil sind (s. Abb. 3.6). Somit kann man schlussfolgern, dass die unspezifisch gebundenen Peptide gerade deshalb im Eluat gefunden werden, weil sie aufgrund ihrer hohen Abundanz oder besseren MS-Detektierbarkeit auffallend häufig im Spektrum detektiert werden. Dies kann man sich sehr gut mit dem Massenwirkungsgesetz erklären. Da von diesen unerwünschten unphosphorylierten Peptiden sehr viel mengenmäßig vorliegt, reicht die Bindung zwischen dem Affinitätsmedium und den Phosphopeptiden nicht aus, um diese an ihrer Bindung zum Säulenmaterial zu hindern. Sobald diese Probenbestandteile binden, können diese nicht mehr durch die unterrepräsentierten Phosphopeptide verdrängt werden.

Die schwache Wechselwirkung zwischen Graphit und Phosphopeptiden verhindert, dass praktikable Protokolle mit stringenten Wasch- und Elutionsschritten etabliert werden können. Somit kann konstatiert werden, dass das Graphit zwar seinen berechtigten Platz in der Glycoproteomics besitzt, aber im Bereich der selektiven Anreicherung von Phosphopeptiden in Phosphoproteomics-Anwendung eher unberücksichtigt bleiben sollte.

4.3.2 Einsatz von IMAC im Phosphoproteomics-Anwendungen

Im Hinblick auf die IMAC wurde bereits sehr früh deutlich, dass die unspezifische Bindung das Hauptproblem dieser Aufreinigungsmethode ist. Speziell saure Peptide werden häufig neben den Phosphopeptiden im Eluat gefunden. Nachdem dieses Phänomen schon zu Beginn bekannt war, gab es auch sehr frühzeitig einen Lösungsansatz, die unspezifische Bindung von sauren unphosphorylierten Peptiden zu unterbinden. Dieser Lösungsversuch bediente sich der Derivatisierung der sauren Peptide mit Methylgruppen. Dieser kausale Ansatz ist in der Theorie sehr einleuchtend, jedoch nicht einfach in der Praxis umzusetzen. Die chemische Modifizierung der sauren Carboxylgruppen der Glutaminsäure und Asparaginsäure, die für die unspezifische Bindung verantwortlich ist, geschieht in organischem Lösemittel. Hier ergeben sich bereits Diskriminierungstendenzen, da nicht alle Peptide in gleichem Maße in dem entsprechenden Medium löslich sind. Wie bei jeder Derivatisierung ergeben sich auch im Falle der Methylierung der sauren Peptide ungewollte Reaktionsprodukte, die aus

Nebenreaktionen resultieren (z.B. Deamidierung an Asparagin und Glutamin-Seitenketten) und das Ergebnis wesentlich komplexer machen als gewünscht. Neben diesem Phänomen ist wie bei jeder chemischen Modifizierung aufgrund des Massenwirkungsgesetzes eine komplette vollständige Derivatisierung kaum gegeben. Teils ist die Umwandlung der sauren Gruppen unvollständig, teils werden unerwartete und ungewollte Nebenprodukte erzielt. Zwar gibt es Ansätze, das Ausmaß der Nebenprodukte durch Einsatz von wasserfreiem Methanol, erhöhtem Anteil an methanolischer Salzsäure und verlängerter Reaktionszeit, zu senken; eine vollständiges Unterbinden der spezifischen Nebenreaktionen lässt sich aber dennoch nicht erreichen (Xu *et al.*, 2007).

Aus all diesen Gründen wurde dieser Ansatz in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass IMAC trotz sorgfältiger Auswahl von Lade-, Wasch- und Elutionsbedingungen als Aufreinigungsmethode *per se* nicht geeignet ist, Proben mit relativ niedrigem Phosphorylierungsgrad zu untersuchen. Für einfache Modellproteine wie α -Casein und β -Casein, bei denen der Phosphorylierungsgrad relativ hoch ist, können bis zum mittleren Femtomolbereich die meisten in der Probe vorliegenden Phosphopeptide angereichert werden. Liegt der unphosphorylierte Hintergrund in einer Probe weit über 1 (z.B. 10:1) so wird die unspezifische Bindung zu einem massiven Problem. Bei solch substöchiometrischen Verhältnissen überwiegen im Eluat sowohl Anzahl wie auch Signalintensitäten der unspezifisch bindenden Nicht-Phosphopeptide. Die Untersuchung der unspezifisch angereicherten Spezies enthüllt im Einklang mit der Literatur, dass vornehmlich saure Peptide binden. Ganz offensichtlich reicht die Wechselwirkung zwischen Phosphopeptid und immobilisiertem Kation bei IMAC nicht aus, um die Bindung von unphosphorylierten Peptiden zu unterbinden. Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich das Problem, dass sobald freie Bindungsstellen durch saure unphosphorylierte Peptide belegt sind, diese nicht mehr durch Phosphopeptide, die substöchiometrisch vorhanden sind, verdrängt werden.

Ein weiterer Faktor für die unspezifische Bindung ist sicherlich auch in der Struktur von gängigen IMAC-*Beads* zu suchen. Diese bestehen in der Regel aus porösem Material häufig mit einem magnetischen Kern. Aufgrund dieser Struktur ergibt sich für die *Beads* eine sehr große Oberfläche. Die chelatisierende Gruppe, häufig IDA oder NTA, ist meist über einen sogenannten *Spacer* mit den Kügelchen verbunden. Diese *Spacer* sind in der Regel Alkylketten, welche von hydrophober Natur sind. Somit bestehen allein anhand der *Spacer* schon unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zu unphosphorylierten Peptiden.

Aufgrund ihrer porösen Natur können Analyte aber auch in die *Beads* wandern. Solche Peptide sind dann kaum oder nur sehr schwer eluierbar.

Der Ansatz, DHB bei der Aufreinigung mit IMAC in die Ladelösung zu geben, welcher erstmals bei TiO_2 vorgestellt wurde, war bis dato in keiner vorliegenden Publikation eingehend untersucht worden. Larsen und Kollegen (Larsen *et al.* 2005), behaupteten zwar, dass DHB bei Laden der Probe im Falle von IMAC keine Verbesserung zeigt, hatten dies aber durch keine Daten oder Spektren untermauert. Insofern wurde die Behauptung aus dieser Veröffentlichung untersucht. Nach derzeitiger Vorstellung verdrängt die saure DHB Peptide mit niedrigem pI und verhindert, dass diese binden. Weshalb dieses Prinzip mit Titandioxid, jedoch nicht mit IMAC-*Beads* funktioniert, ist noch nicht eingehend untersucht worden. Schlussendlich lässt sich dieses Phänomen nur damit erklären, dass DHB eine höhere Bindung zum Titandioxid aufweist als zum IMAC. IMAC hingegen ist nicht in der Lage zwischen einem DHB-Molekül und einem sauren Peptid zu unterscheiden, so dass es wahrscheinlich beide Spezies in gleichem Maße bindet. Diese These wird dadurch gestützt, dass DHB die Anzahl der unspezifischen Bindung nur marginal herabsetzt (s. Kapitel 3.2.21). Hätte DHB überhaupt keinen Einfluss, so müsste sowohl mit als auch ohne DHB dieselben Peptide detektierbar sein. Interessant ist ferner, dass mit DHB beim Ladevorgang neben sauren Peptiden auch neutrale Peptide binden. Diese neutralen Peptide finden sich aber im Gegenzug nicht, wenn ohne DHB beim Laden gearbeitet wird.

4.3.3 Einsatz von TiO₂ für die selektive Anreicherung von Phosphopeptiden

Die fehlende Spezifität von IMAC-*Beads* machte sehr früh deutlich, dass eine andere Affinitätsmethode notwendig ist für den Phosphoproteomics-Einsatz. Der Einsatz von IMAC in Kombination mit der Methylierung der sauren Gruppen zur Verhinderung der unselektiven Bindung machen diese Technik nicht sehr attraktiv. Auf der Suche nach einer besseren Methode, die möglichst keine oder nur geringe unspezifische Bindung zeigt, wurde Titandioxid als vielversprechende Alternative verfolgt. Mehr und mehr wird die Technik eingesetzt für die Aufreinigung von Phosphoprotein-Verdaus und verdrängt immer mehr den Einsatz von IMAC. Allerdings sollte man, solange es noch keine klar überlegene Aufreinigungsmethode gibt, nicht ausschließen, dass IMAC für bestimmte Fragestellungen noch berücksichtigt werden muss. So zeigten Aebersold und Kollegen (Bodenmiller *et al.*, 2007), dass sowohl mit TiO₂ als auch IMAC jeweils reproduzierbare Analyte im Eluat nachweisbar sind und diese sich nur teilweise überlappen. Das Problem der unspezifischen Bindung des IMACs wird hierdurch jedoch nicht gelöst.

Ikeguchi und Kollegen (Ikeguchi *et al.*, 1997) stellten als erste Gruppe Titandioxid für die selektive Anreicherung von Phosphopeptiden vor. In ihrer Publikation benutzten sie für ihren LC-MS-Ansatz eine mit TiO₂ bepäckte Vorsäule, auf der sie in der Probe befindliche Phosphopeptide anreicherten. Seither findet Titandioxid als Affinitätsmedium weite Verbreitung im Phosphoproteomics-Bereich. Neben dem Einsatz in HPLC-Vorsäulen wird es auch häufig in Pipettenspitzen immobilisiert, in dieser Form wird es meist eingesetzt, wenn vorher keine LC-Trennung nötig ist oder wenn nur eine begrenzte Probenzahl untersucht werden soll.

Im Hinblick auf nicht-spezifische Bindung von unphosphorylierten Peptiden zeigten sich verglichen mit IMAC deutliche Verbesserungen. Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, binden an TiO₂ befüllte Pipettenspitzen wesentlich weniger nicht phosphorylierte Peptide als an IMAC-Material. Während beim IMAC bekannt war, dass vornehmlich saure Peptide für die unspezifische Bindung verantwortlich sind, war dies beim TiO₂ noch nicht bekannt. In einer Publikation von Klemm *et al.* (Klemm *et al.*, 2006) wurde die Frage erörtert, was für die unspezifische Bindung an TiO₂ verantwortlich ist. Die Autoren konnten zeigen, dass auch beim TiO₂ die sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure für die unspezifische Bindung verantwortlich sind. Diese Beobachtung wurde auch in dieser Arbeit gemacht. Auch wenn beide Techniken, IMAC und TiO₂, saure Peptide binden, so ist deren Ausmaß jedoch unterschiedlich stark. Während mit IMAC bei

äquimolaren Verhältnissen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden können, ist die unspezifische Bindung bei höherem Hintergrund nicht mehr akzeptabel. Hier ergibt sich der berechnete Einsatz des TiO_2 . Mit diesem Material kann mit wesentlich höherem Lösemittelanteil gewaschen werden, so dass schwächer bindende Nicht-Phosphopeptide entfernt werden können. Die verbesserte Affinität zu phosphorylierten Peptiden erlaubt ferner das Beladen der Probe im stark sauren pH-Bereich, was dann von vornherein das Binden vieler saurer Peptide bereits verhindert, da diese bei dem gewählten pH-Wert überwiegend protoniert vorliegen. Einen besonderen Ansatz für die Senkung der unspezifischen Bindung mit TiO_2 stellt die Beladung der Probe mit DHB in der Probenlösung dar (Larsen *et al.*, 2005). Mit dieser Modifikation des Aufreinigungsprotokolls lässt sich die unspezifische Bindung signifikant senken. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bis zu einem 25-fachen Überschuss an nicht-phosphoryliertem Hintergrund ist Titandioxid für die Anreicherung bestens geeignet. Allerdings ist mit diesem modifizierten Protokoll, also beim Beladen der Probe DHB in hoher Konzentration hinzuzugeben, eine nachfolgende LC-MS-Bearbeitung der Probe ausgeschlossen, da die DHB sehr leicht an offenen Kapillaren auskristallisieren kann und sowohl beim nachfolgenden ESI als auch MALDI stören kann. Dass es beim Elektrospray stört, ist einleuchtend. Beim MALDI ist es dann störend, wenn als zu spottende Matrix CHCA eingesetzt wird.

4.3.4 Phosphonatoberfläche zur Aufreinigung von Phosphopeptiden

Heute gelten IMAC und Titandioxid als Standardmethoden für die Anreicherung von Phosphopeptiden. In den vorhergehenden Kapiteln wurden diese Techniken eingehend diskutiert. Aufgrund seiner verbesserten Spezifität wird TiO_2 heute als Goldstandard betrachtet. Ein erklärtes Ziel dieser Arbeit war es, eine mindestens ebenbürtige oder überlegene Anreicherungsmethode zu entwickeln. Dies ist mit der Phosphonatoberfläche als MALDI-Probenteller gelungen. Während in der vorliegenden Arbeit die Anwendung von Titandioxid für einen 25-fachen Hintergrund möglich war, konnte mit der Phosphonatoberfläche gezeigt werden, dass selbst bei einem 50-fachen Überschuss an nicht-phosphorylierten Peptiden eine überzeugende Aufreinigung erreicht werden kann. Somit wird die Analyse von stark unterrepräsentierten Phosphopeptiden zugänglich gemacht, die sich der Analyse beim Einsatz von Titandioxid entziehen würden. Der vergrößerte dynamische Bereich erhöht signifikant die Möglichkeit, Phosphopeptide anzureichern, die nur stark

substöchiometrisch in einer realen Probe vorliegen. In allen wichtigen Parametern der Charakterisierung von Anreicherungstechniken zeigte die Phosphonatoberfläche ihre Überlegenheit gegenüber TiO_2 . Sowohl im Hinblick auf Sensitivität als auch Selektivität zeigt die Phosphonatoberfläche signifikant bessere Ergebnisse. Treten bei höherem Hintergrund ungewollte Bindungen von unphosphorylierten Peptiden auf, so waren diese nicht substanziiell verschieden von denen, die beim Einsatz mit TiO_2 beobachtet wurden. Jedoch ist deren Signalintensität wesentlich schwächer. Wie zu vermuten war, sind auch im Falle der Zirkonium-Phosphonat Technik die sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure für die unspezifische Bindung verantwortlich. Die höhere Bindungsaffinität von Phosphopeptiden zur Phosphonatoberfläche führt somit zu wesentlich weniger und schwächeren Signalen von Nicht-Phosphopeptiden.

Auch wenn es bereits Publikationen zu Zirkonium-Phosphonat-Aufreinigungstechniken gibt (Feng et al., 2007; Wei et al., 2008; Zhao et al. 2008, Zhou et al., 2006), so ist noch nicht vollständig klar, worin die Gründe für die höhere Bindungsstärke zu Phosphopeptiden im Vergleich zum Titandioxid liegen. Chemisch gesehen bietet sich die Erklärung eines nach aussen hin neutralen Komplexes an. Das Zirkonium ist als 4-wertiges Ion an der Oberfläche gebunden. Sobald eine Phosphatgruppe bindet, stellt der Komplex eine nach Außen hin neutrale Einheit dar. Die planare Immobilierung auf dem MALDI-Target bietet den großen Vorteil, dass der Analyt auf der gleichen Fläche angereichert und vermessen werden kann. Techniken wie IMAC und TiO_2 haben den Nachteil, dass aufgereinigte Phosphopeptide erst auf einen Probensteller eluiert werden müssen. Bei diesem Schritt kann es schon zu Probenverlusten kommen. Beim modifizierten Probensteller wird neben der chemisch/kompetitiven Elution mit der in der MALDI-Matrix befindlichen Phosphorsäure auch ein Teil der Analyten über den gepulsten Laser von der Oberfläche desorbiert. Eine andere Möglichkeit der Funktionalisierung eines Targets mit Phosphonatgruppen benutzten Zhou und Kollegen (Zhou et al., 2006). Sie benutzten keine SAMs sondern derivatisierten poröse Silikat-Plättchen. Die Modifizierung der Oberfläche mittels *Self Assembled Monolayer* (SAM) Technik bietet ferner den großen Vorteil, dass eine unübertroffen dichte Modifizierung der Fläche möglich ist. Anders als bei der Beadtechnologie (Feng et al., 2007; Wei et al., 2008; Zhao et al. 2008) können Analyte nicht in schlecht zugängliche Hohlräume eindringen und sich der Analyse entziehen. Bedingt durch die sehr dichte Bepackung der Oberfläche ist die Bindekapazität der Oberfläche des modifizierten Probensteller exzellent. Da sie im höheren Femtomol-Bereich liegt, können Probenmengen, die in typischen Phosphoproteomics-Anwendungen untersucht werden, erfolgreich analysiert werden. Anhand der Anwendung der

Phosphonatoberfläche bei den beiden realen Proben MAPK1 und HSP1 konnte dies exemplarisch gezeigt werden. Bei beiden Proben konnten Phosphopeptide erfolgreich analysiert werden, nachdem diese auf der Phosphonatoberfläche aufgereinigt wurden. Die meisten Phosphopeptide waren ohne Aufreinigung nicht detektierbar. Nachdem die Analyte im MS sichtbar wurden, konnten diese in MALDI-MS/MS Versuchen eingehend untersucht werden. Nicht in allen Fällen konnten die kompletten Aminosäuresequenzen und die exakten Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Dies liegt aber nicht an der sehr guten Aufreinigungsmethode, sondern daran, dass MALDI-PSD zur Fragmentierung genutzt wurde. Da hier nicht die Möglichkeit von MSⁿ gegeben ist, wie beispielsweise bei ESI-CID mit einer Ionenfalle, kann zwar eine Phosphorylierung über den deutlichen Neutralverlust zweifelsfrei bewiesen werden, jedoch fehlt u.U. eine hinreichende Anzahl von zusätzlichen Fragmenten, um die erforderlichen Informationen über die Aminosäuresequenz zu erhalten. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit die Phosphonatoberfläche in groß angelegten Phosphoproteomics-Untersuchungen ihre Anwendung finden kann. Gerade bei *Cell-Signaling* Fragestellungen kommt man an einem LC-Ansatz nicht vorbei. Der phosphonatmodifizierte MALDI-Probenteller ist eine ideale Plattform, um in solch einem Rahmen eingesetzt zu werden. Die Phosphonatoberfläche könnte als *Spotting-Target* hervorragende Dienste leisten. Man könnte somit direkt auf die MALDI-Probenteller spotten. So könnte man die Proben nach der LC-Aufreinigung automatisch durch Auftragen der Waschlösung effektiv von unphosphorylierten Peptiden befreien. Die angereicherten Phosphopeptide können dann in einem zweiten Schritt nach manuellem oder automatischem Aufbringen der MALDI-Matrix vermessen werden. Für einen *High-Throughput*-Ansatz ist die Phosphonatoberfläche sicherlich hochinteressant, da man hier mit 20 µL gut automatisch pipettierbare Volumina auftragen kann, was durch derzeitige Pipettierroboter problemlos zu bewerkstelligen ist.

Somit hat man zum ersten Mal eine Methode, um sie mit einem LC-ESI-Ansatz mit Titandioxid-Vorsäule zu vergleichen. Da ESI und MALDI nur teilweise überlappende Ergebnisse liefern, wäre ein Vergleich beider Methoden sehr interessant. Aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität von Phosphonatoberfläche verglichen mit TiO₂ könnte man Analyte detektieren, die mit dem LC-ESI-Ansatz bisher nicht erfassbar waren.

Basierend auf der Zirkonium-Phosphonat-Technik wird es in Kooperation mit der Firma Qiagen noch eine Weiterentwicklung dieser Anreicherungstechnik auf Bead-Technologie geben, um sie einem noch breiteren Publikum zugänglich zu machen. Hier bieten sich weitere Anwendungsmöglichkeiten, die schon mit dem modifizierten Probenteller demonstriert werden konnte, der Aufreinigung der Probe vor der Vermessung mittels ESI. So könnte man neben

Pipettierspitzen auch LC-Säulen packen und als Vorsäule einsetzen. Als Anreicherungstechnik wäre diese Methode, sei es in Bead-Technik oder als *Target*, in Kombination mit ECD und ETD äußerst interessant. Man würde bisher nicht erfassbare Analyte anreichern und könnte diese mit den sehr weichen Fragmentierungstechniken untersuchen und sicherlich viele neue und unbekannte Phosphorylierungsstellen eindeutig nachweisen.

5. Zusammenfassung

Die Analyse der Phosphorylierung mittels Massenspektrometrie stellt in vielerlei Hinsicht große Anforderungen an die Analysemethoden, die eingesetzt werden. Durch die substöchiometrische Modifizierung einer Aminosäure mit einem Phosphatrest ist die grundlegende Herausforderung der Sensitivität an anzuwendende Analysetechniken gegeben. Die Biomassenspektrometrie hat mit den weichen Ionisierungsmethoden ESI und MALDI zwar die Techniken zur Verfügung gestellt, die eine routinemäßige Identifizierung von vorher per MS nicht zugänglichen Proteinen über die Untersuchung der enzymatischen Spaltpeptides ermöglicht, gleichwohl ist der Aufwand, der für die massenspektrometrische Charakterisierung eines bestimmten Proteins besteht, um ein vielfaches höher.

Wegen des *in vivo* variablen und potentiell sehr geringen Phosphorylierungsgrades ist die genaue Identifizierung der Phosphorylierungsstelle allein durch das Vermessen der Probe in einem modernen Massenspektrometer nicht zu bewerkstelligen. Die sich in der Probe befindlichen Phosphopeptide stehen nach einem Verdau des entsprechenden Proteins einer mengenmäßig großen Zahl unphosphorylierter Peptide gegenüber. Auch die hohe Sensitivität von modernen Massenspektrometern reicht in der Regel nicht aus, um das entsprechende Phosphopeptid zu analysieren. Soll die exakte Phosphorylierungsstelle des untersuchten Phosphopeptids bestimmt werden, so müssen ausreichende Mengen an Analyten für eine MS/MS-Analyse generiert werden. Bei realen Proben kann der Phosphorylierungsgrad nicht erhöht werden, somit ist auch die Menge an vorhandenen Phosphopeptiden begrenzt. Somit kommt man an eine Anreicherung von Phosphopeptiden bzw. Abreicherung von unmodifizierten Peptiden nicht vorbei.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Anreicherungstechniken für Phosphopeptide hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht. Hierfür wurden verschiedene Affinitätstechniken (Graphit, IMAC und TiO₂) hinsichtlich Empfindlichkeit und Selektivität untersucht. Von diesen drei Methoden zeigte sich Graphit aufgrund zu geringer Wechselwirkung zwischen Analyt und Medium als ungeeigneteste Methode. IMAC zeigt bei verbesserter Sensitivität eine höhere Spezifität, gleichwohl saure Peptide nicht von Phosphopeptiden zu trennen sind. Von den drei genannten Methoden zeigte TiO₂ die höchste Sensitivität und Selektivität. Da das TiO₂ als Goldstandard in der Anreicherung von Phosphopeptiden angesehen wird, sollte im Rahmen dieser Dissertation eine neuartige

Methode entwickelt werden, die dieser Technik sowohl im Hinblick auf Spezifität und Selektivität überlegen sein sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MALDI-Proben-teller erstmals mit Hilfe von SAMs (*Self Assembled Monolayers*) mit Phosphonatgruppen modifiziert, aus denen durch Beladen mit vierwertigem Zirkonium eine neue funktionelle Oberfläche für die Anreicherung von Phosphopeptiden hergestellt werden kann, die der Titandioxid-Methode überlegen ist. Anhand von reproduzierbaren Modellsystemen von bekannten Phosphoproteinverdau (z.B. Ovalbumin) konnte gezeigt werden, dass diese neue Technik Analyten im niedrigen Femtomol-Bereich auch vor einem großen nicht-phosphorylierten Hintergrund selektiv anreichern kann.

Um zu demonstrieren, dass die Phosphonat-Oberfläche auch bei realen Proben die massenspektrometrische Phosphorylierungsanalyse ermöglicht, wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen die *Mitogen Activated Protein Kinase 1* (MAPK-1) aus einem in-Lösungs-Verdau und das *Heat Shock Protein* (HSP), welches aus einem 2-D-Gel stammt, untersucht. Mit der neu etablierten Phosphonat-Oberfläche konnten die Phosphopeptide aus den Proben angereichert und mittels MALDI-MS/MS die Phosphatgruppe eindeutig der modifizierten Aminosäure zugeordnet werden.

Neben dem Komplex der Anreicherungstechniken wurden im Rahmen dieser Dissertation noch andere relevante Fragestellungen für die Phosphoproteomanalytik untersucht. So konnte gezeigt werden, dass für phosphorylierte Peptide keine Suppression der Signale im MALDI-Gerät stattfindet, was eine noch weit verbreitete Meinung in vielen Arbeitsgruppen ist. Auch Versuche zur MALDI-Matrix und deren Kombination mit der Säurekomponente wurden durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass es neben DHB in Kombination mit Phosphorsäure momentan keine bessere Matrix-Kombination gibt. Im Hinblick auf die Quantifizierung der Phosphorylierung eines Proteins konnte exemplarisch am Ovalbumin als Modellsystem eine einfache und valide Quantifizierungsmethode mit Hilfe der Dephosphorylierung entwickelt werden, die nicht die Nachteile von sonst häufig eingesetzten Derivatisierungsreagenzien besitzt.

Literaturverzeichnis

Anderson L. and Porath J.; Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography. *Anal. Chem.* (1986)254:250-54.

Annan R.S., Carr S.A.; Phosphopeptide analysis by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* (1996) Oct 1;68(19):3413-21.

Arnott D., Gawinowicz M.A., Grant R.A., Neubert T.A., Packman L.C., Speicher K.D., Stone K., Turck C.W.; ABRF-PRG03: Phosphorylation Site Determination. *J Biomol Tech.* (2003) September; 14(3): 205–215.

Asara J.M., Allison J.; Enhanced detection of phosphopeptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ammonium salts. *J Am Soc Mass Spectrom.* (1999) Jan;10(1):35-44.

Barber, M., Bordoli, R.S., Sedgwick, R.D. and Tyler, A.N.; Fast atom bombardment (F.A.B.): A new ion source for mass spectrometry. *J Chem Soc Chem Commun*, (1981), 7, 325-327.

Beavis, R.C., Chaudhary, T. and Chait, B.T.; α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, (1992), 27, 156-158.

Bigelow W.C., Pickett D.L. and Zisman W.A.; Oleophobic monolayers I. Films adsorbed from solution in non-polar liquids *J. Colloid Interface Sci.* 1946, 1, 513.

Blom N., Sicheritz-Pontén T., Gupta R., Gammeltoft S., Brunak S.; Prediction of posttranslational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics.* 2004 Jun;4(6):1633-49.

Bodenmiller B., Mueller L.N., Mueller M., Domon B. and Aebersold R.; Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat. Methods.* (2007) March;4(3):231-7.

- Boeri E., Bergatto E., Cabodi S., Silengo L., Tarone G., Defilippi P., Jensen O.N.; Systematic analysis of the epidermal growth factor receptor by mass spectrometry reveals stimulation-dependent multisite phosphorylation. *Mol Cell Proteomics*. (2005) Aug;4(8):1107-21.
- Brockman A.H., Dodd B.S. and Orlando R.; A desalting approach for MALDI-MS using on-probe hydrophobic self-assembled monolayers. *Anal Chem*. (1997) Nov 15;69(22):4716-20.
- Brown, R. S. and Lennon, J. J.; Mass Resolution Improvement by incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal Chem*, (1995), 67, 1998-2003.
- Chalmers M.J., Håkansson K., Johnson R., Smith R., Shen J., Emmett M.R. and Marshall A.G.; Protein kinase A phosphorylation characterized by tandem Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Proteomics*. (2004) Apr;4(4):970-81.
- Cutting J.A.; Gel protein stains: phosphoproteins. *Methods Enzymol*. (1984) 104:451- 5.
- DeSouza L., Diehl G., Rodrigues M.J., Guo J., Romaschin A.D., Colgan T.J., Siu K.W.; Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005 Mar-Apr;4(2):377-86.
- Ding J., Burkhart W. and Kassel D.B., Identification of phosphorylated peptides from complex mixtures using negative-ion orifice-potential stepping and capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. (1994) Jan;8(1):94-8.
- Faucheux N., Schweiss R., Lützwow K., Werner C. and Groth T.; Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* (2004);25:2721-2730.

- FDA (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM)); Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001).
- Feng S, Ye M, Zhou H, Jiang X, Jiang X, Zou H, Gong B.; Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics*. (2007) Sep;6(9):1656-65.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M.; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, (1989), 246, 64-71.
- Ficarro S.B., McClelland M.L., Stukenberg P.T., Burke D.J., Ross M.M., Shabanowitz J., Hunt D.F. and White F.M.; Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*. (2002) Mar;20(3):301-5.
- Gatti A.; Profiling substrate phosphorylation at the phosphopeptide level. *Anal Biochem*. (2003) Jan 1;312(1):40-7.
- Glinski M. and Weckwerth W.; The role of mass spectrometry in plant systems biology. *Mass Spectrom Rev* (2006) 25, 173-214 (2006).
- Gobom J., Nordhoff E., Mirgorodskaya E., Ekman R. and Roepstorff P.; Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. (1999) Feb;34(2):105-16.
- Gropengiesser J., Varadarajan B.T., Stephanowitz H. and Krause E.; The relative influence of phosphorylation and methylation on responsiveness of peptides to MALDI and ESI mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom*. 2009 Mar. Epub ahead of print.
- Guy G.R., Philip R. and Tan Y.H.; Analysis of cellular phosphoproteins by two-dimensional gel electrophoresis: applications for cell signaling in normal and cancer cells. *Electrophoresis* (1994) Mar-Apr 15(3-4):417-40.

- Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H. and Aebersold R.; Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* (1999) Oct;17(10):994-9.
- Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H. and Aebersold R.; Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* (1999) Oct;17(10):994-9.
- Haydon C.E., Eyers P.A., Aveline-Wolf L.D., Resing K.A., Maller J.L. and Ahn N.G.; Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics.* (2003) Oct;2(10):1055-67.
- Henzel, W.J., Stults, J.T., and Watanabe, C. (1989) *Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society.* Seattle, Washington.
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., and Watanabe, C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *PNAS* 90, 5011-5015.
- Hoffmann R., Wachs W.O., Berger R.G., Kalbitzer H.R., Waidelich D., Bayer E., Wagner-Redeker W. and Zeppezauer M.; Chemical phosphorylation of the peptides GGXA (X = S, T, Y): an evaluation of different chemical approaches. *Int J Pept Protein Res.* (1995) Jan;45(1):26-34.
- Ikeguchi Y., Nakamura H.; Determination of organic phosphates by column-switching high-performance anion-exchange chromatography using on-line preconcentration on titania. *Anal. Sci.* 13:479-85.
- Jaffe H., Veeranna and Pant H.C.; Characterization of serine and threonine phosphorylation sites in beta-elimination/ethanethiol addition-modified proteins by electrospray tandem mass spectrometry and database searching. *Biochemistry* (1998) Nov 17;37(46):16211-24.

- Kallweit, U., Börnsen, K.O., Kresbach, G.M., Widmer, H.M. (1996) Matrix Compatible Buffers for Analysis of Proteins with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 10, 845-849.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. and Hillenkamp, F.; Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of non-volatile Compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, (1987), 78, 53-68.
- Kebarle P. and Ho Y.; On the mechanism of electrospray. In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry; Fundamentals, Instrumentation and Applications* (Cole R.B. ed.) (1997) 3-63, John Wiley and Sons, New York.
- Kern D., Volkman B.F., Luginbühl P., Nohaile M.J., Kustu S. and Wemmer D.E.; Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature* (1999) 402(6764):894-8.
- Kjellström S., Jensen O.N.; Phosphoric acid as a matrix additive for MALDI MS analysis of phosphopeptides and phosphoproteins. *Anal Chem.* (2004) Sep 1;76(17):5109-17.
- Klumpp S. and Krieglstein J.; Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* (2002) 269, 1067-71.
- Kristensen D.B., Kawada N., Imamura K., Miyamoto Y., Tateno C., Seki S., Kuroki T. and Yoshizato K.; Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* (2000) Aug. 32(2):268-77.
- Krüger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Glückmann, M., and Karas, M. (2001) Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes. *Anal. Chem.* **73**, 5812-5821
- Larsen M.R., Cordwell S.J. and Roepstorff P.; Graphite powder as an alternative or supplement to reversed-phase material for desalting and concentration of peptide mixtures prior to matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics* (2002) Sep;2(9):1277-87.

- Larsen M.R., Graham M.E., Robinson P.J and Roepstorff P.; Improved detection of hydrophilic phosphopeptides using graphite powder microcolumns and mass spectrometry: evidence for in vivo doubly phosphorylated dynamin I and dynamin III. *Mol Cell Proteomics*. (2004) May;3(5):456-65.
- Larsen M.R., Thingholm T.E., Jensen O.N., Roepstorff P. and Jørgensen T.J.; Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*. (2005) Jul;4(7):873-86.
- Liang S.S., Makamba H., Huang S.Y., Chen S.H.; Nano-titanium dioxide composites for the enrichment of phosphopeptides. *J Chromatogr A*. (2006) May 26;1116(1-2):38-45.
- Liao P.C., Leykam J., Andrews P.C., Gage D.A., Allison J.; An approach to locate phosphorylation sites in a phosphoprotein: mass mapping by combining specific enzymatic degradation with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*. (1994) May 15;219(1):9-20.
- Mamyrin, B.A., Karataev, V.I., Shmikk, D.V., and Zagulin, V.A. (1973) The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. Phys. JETP* 37, 45.
- Mann, M., Hojrup, P. and Roepstorff, P.; Use of mass-spectrometric molecular-weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom.*, 1993, 22, 338-345.
- Marcus K., Immler D., Sternberger J. and Meyer H.E.; Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis* (2000) Jul;21(13):2622-36.
- Matthews H.R.; Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol Ther* (1995) 67, 323-50.

- Macfarlane R.D., Torgenson D.F.; Californium-252 Plasma Desorption Mass Spectroscopy. *Science* 1976, 191, 920-925.
- Molina H., Horn D.M., Tang N., Mathivanan S. and Pandey A.; Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 13;104(7):2199-204.
- Neville D.C., Rozanas C.R., Price E.M., Gruis D.B., Verkman A.S. and Townsend R.R.; Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Sci.* (1997) Nov;6(11):2436-45.
- Oda Y., Nagasu T. and Chait B.T.; Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol.* (2001) Apr;19(4):379-82.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A. and Mann M.; Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* (2002) May;1(5):376-86.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001); "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". *Endocr. Rev.* 22 (2): 153-83.
- Perkins, D.N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M., Cottrell, J. S.; (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Porter, M.D., Bright, T.B., Allara, D.L., Chidsey, C.E.D. Spontaneously organized molecular assemblies. Structural characterization of n-alkyl thiolmonolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3559-3568 (1987).

- Posewitz M.C. and Tempst P.; Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem.* (1999) Jul 15;71(14):2883-92.
- Raggiaschi R., Lorenzetto C., Diodato E., Caricasole A., Gotta S., Terstappen G.C.; Detection of phosphorylation patterns in rat cortical neurons by combining phosphatase treatment and DIGE technology. *Proteomics.* (2006) Feb;6(3):748-56.
- Roepstorff P. and Fohlman J.; Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* (1984) 11(11) 601.
- Sano A. and Nakamura H.; Chemo-affinity of titania for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides. *Anal Sci.* (2004) Mar;20(3):565-6.
- Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054-70.
- Schulenberg B., Aggeler R., Beechem J.M., Capaldi R.A. and Patton W.F.; Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem.* (2003) Jul. 18;278(29):27251-5.
- Schulz E., Karas M., Rosu F., Gabelica V.; Influence of the matrix on analyte fragmentation in atmospheric pressure MALDI. *J Am Soc Mass Spectrom.* (2006) Jul;17(7):1005-13.
- Shi S.D., Hemling M.E., Carr S.A., Horn D.M., Lindh I. and McLafferty F.W.; Phosphopeptide/phosphoprotein mapping by electron capture dissociation mass spectrometry. *Anal Chem.* (2001) Jan 1;73(1):19-22.
- Sickmann A., Mreyen M. and Meyer H.E.; Identification of modified proteins by mass spectrometry. *IUBMB Life* (2002) 54, 51-7.
- Steen H., Jebanathirajah J.A., Springer M., Kirschner M.W.; Stable isotope-free relative and absolute quantitation of protein phosphorylation stoichiometry by MS. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* (2005) Mar. 15;102(11):3948-53.

- Steinberg T.H., Agnew B.J., Gee K.R., Leung W.Y., Goodman T., Schulenberg B., Hendrickson J., Beechem J.M., Haugland R.P. and Patton W.F.; Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics* (2003) Jul. 3(7):1128-44.
- Stensballe A, Jensen O.N.; Phosphoric acid enhances the performance of Fe(III) affinity chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry for recovery, detection and sequencing of phosphopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004;18(15):1721-30.
- Stensballe A., Jensen O.N., Olsen J.V., Haselmann K.F. and Zubarev R.A.; Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2000);14(19):1793-800.
- Strupat, K., Karas, M. and Hillenkamp, F.; 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, (1991), 111, 89-102.
- Thingholm T.E., Jensen O.N. and Larsen M.R.; The use of titanium dioxide microcolumns to selectively isolate phosphopeptides from proteolytic digests. *Methods Mol Biol.* 2009;527:57-66, xi. Review.
- Tinazli A., Tang J., Valiokas R., Picuric S., Lata S., Piehler J., Liedberg B. and Tampé R.; High-affinity chelator thiols for switchable and oriented immobilization of histidine-tagged proteins: a generic platform for protein chip technologies. *Chemistry.* (2005) Sep 5;11(18):5249-59.
- Torozer D., McMichael R., Krause K.P., Kurreck J., Sonnewald U., Stitt M. and Huber S.C.; Site-directed mutagenesis of serine 158 demonstrates its role in spinach leaf sucrose-phosphate synthase modulation. *Plant J* (1999) 17, 407-13.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1979) Sep;76(9):4350-4.

- Tuytten R., Lemiere F., Witters E., Van Dongen W., Slegers H., Newton R.P., Van Onckelen H., Esmans E.L.; Stainless steel electrospray probe: a dead end for phosphorylated organic compounds? *J Chromatogr A*. (2006) Feb 3;1104(1-2):209-21.
- Unlü M., Morgan M.E. and Minden J.S.; Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. (1997) Oct;18(11):2071-7.
- Vestal, M.L., Juhasz, P. and Martin, A.; Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, (1995),9(11):1044 - 1050.
- Warren M.E., Brockman A.H. and Orlando R.; On-probe solid-phase extraction/MALDI-MS using ion-pairing interactions for the cleanup of peptides and proteins. *Anal Chem*. (1998) Sep 15;70(18):3757-61.
- Wei J, Zhang Y, Wang J, Tan F, Liu J, Cai Y, Qian X.; Highly efficient enrichment of phosphopeptides by magnetic nanoparticles coated with zirconium phosphonate for phosphoproteome analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008 Apr;22(7):1069-80.
- Wettenhall R.E., Aebersold R.H. and Hood L.E.; Solid-phase sequencing of ³²P-labeled phosphopeptides at picomole and subpicomole levels. *Methods Enzymol*. (1991) 201:186-99.
- Wilm M and Mann M; Analytical Properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* (1986), 68:1-8.
- Xu C.F., Wang H., Li D., Kong X.P., Neubert T.A.; Selective enrichment and fractionation of phosphopeptides from peptide mixtures by isoelectric focusing after methyl esterification. *Anal Chem*. (2007) Mar. 1;79(5):2007-14.
- Yang X., Wu H., Kobayashi T., Solaro R.J., van Breemen R.B.; Enhanced ionization of phosphorylated peptides during MALDI TOF mass spectrometry. *Anal Chem*. (2004) Mar 1;76(5):1532-6.

- Yao, J., Scott, J.R., Young, M.K., and Wilkins, C.L. (1998) Importance of Matrix:Analyte Ratio for Buffer Tolerance Using 2,5-Dihydroxybenzoic Acid as a Matrix in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Fourier Transform Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight. *J. Am Soc. Mass Spectrom.* 9, 805-813.
- Yip T.T., Hutchens T.W.; Mapping and sequence-specific identification of phosphopeptides in unfractionated protein digest mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *FEBS Lett.* (1992) Aug. 17;308(2):149-53.
- Zhang X., Jin Q.K., Carr S.A., Annan R.S; N-Terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotopic tags: a method for the determination of site-specific absolute phosphorylation stoichiometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* (2002);16(24)2325-32.
- Zhao L, Wu R, Han G, Zhou H, Ren L, Tian R, Zou H.; The highly selective capture of phosphopeptides by zirconium phosphonate-modified magnetic nanoparticles for phosphoproteome analysis. *J Am Soc Mass Spectrom.* (2008) Aug;19(8):1176-86.
- Zhou C. and Walker A.V.; Dependence of patterned binary alkanethiolate self-assembled monolayers on "UV-photopatterning" conditions and evolution with the time, terminal group, and methylene chain length. *Langmuir.* (2006) Dec. 19;22(26):11420-5.
- Zhou H., Xu S., Ye M., Feng S., Pan C., Jiang X., Li X., Han G., Fu Y., Zou H.; Zirconium phosphonate-modified porous silicon for highly specific capture of phosphopeptides and MALDI-TOF MS analysis. *J Proteome Res.* (2006) Sep;5(9):2431-7.

Abkürzungsverzeichnis

µL	Microliter
µm	Micrometer
2-D	Zweidimensional
3HPA	3-Hydroxy-Picolinsäure
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
BSA	Bovine serum albumine
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat
CHCA	a-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
CI	Chemische Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
cm	Centimeter
d.h.	das heisst
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonulceinsäure
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECD	Eletron capture dissociation
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Electrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
ETD	Electron transfer dissociation
eV	Elektrovolt
FDA	Food and drug administration
FERU	Ferulasäure
fmol	Femtomol
FTICR	Fourier Transform Ionenzyklotronresonanz
HAc	Essigsäure
HCCA	a-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HFP6	Hexafluoro-phosphorsäure
His-tag	Histidin-tag
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP	Hitzschock-Protein
Hz	Hertz
IAA	Iodacetamid
ICAT	Isotope coded affinity tag
ICP	Inductively Coupled Plasma
IDA	Iminodiessigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMAC	Immobilized Metal Ion Chromatography
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LC	Liquid Chromatography
M	molar
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mA	Milliamper
MALDI	Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation

MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nanosekunden
NTA	Nitrilotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	potentia hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide Mass Fingerprint
pmol	Picomol
PSD	Post-source decay
PTM	Posttranslationale Modifikation
RP	Reversed Phase
rpm	rounds per minute
S/N	Signal to noise
SAM	Self Assembled Monolayer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	Stable isotope labeling with amino acids (in cell culture)
SINA	Sinapinsäure
SPR	Surface Plasmon Resonance
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THAP	2,4,6-Trihydroxy-acetophenon
TOF	Time of flight
Tris HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochlorid
U	Unit
UV	Ultraviolett

Publikationen**Posterbeiträge:****Purification and Analysis of Phosphopeptides and His-Tag Proteins with a modified MALDI-Target**

Tri Hoang, Ali Tinazli, Robert Tampé und Michael Karas

39. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)

Rostock (D), 06.03. - 09.03.2005

Enhanced Detection of Phosphopeptides and His-Tag Proteins with a Chemically Modified MALDI-Target

Tri Hoang, Ali Tinazli, Robert Tampé und Michael Karas

53. Conference on Mass Spectrometry of the American Society for Mass Spectrometry (ASMS)

San Antonio (USA), 05.06 - 09.06.2005

Analysis of Phosphoproteins with a functionalized MALDI-Target and Comparison with different chromatographic Techniques

Tri Hoang, Ali Tinazli, Robert Tampé und Michael Karas

40. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)

Mainz (D), 20.03. - 08.03.2006

A modified MALDI-Target for the Phosphorylation Sites Determination of Phosphoproteins and Screening of His-tagged Proteins

Tri Hoang, Ali Tinazli, Robert Tampé und Michael Karas

Annual Meeting "Frontiers in Medicinal Chemistry" of the GDCh division of Medicinal Chemistry and the DPhG

Frankfurt (D), 12.03. - 15.03.2006

Investigation of Techniques for the Enrichment of Phosphopeptides from complex Samples

Tri Hoang, Udo Roth, Kerstin Steinert und Michael Karas

41. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)

Bremen (D), 11.03. - 14.03.2007

Vortrag:**Phosphorylation Site Mapping and Screening of His-tagged Proteins with Mass Spectrometry based Techniques**

Tri Hoang, Ali Tinazli, Robert Tampé und Michael Karas

Joint Meeting of the DPHG, CFS and HSPS

Marburg (D), 04.10. - 07.10.2006

Highly specific capture and direct MALDI MS analysis of phosphopeptides by Zirconium Phosphonate on Self Assembled Monolayers

Hoang T., Roth U., Kowalewski K., Belisle C., Steinert K. und Karas M.

Anal. Chem., akzeptiert

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Tri Hoang
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 20.01.1977 in Saigon (Vietnam)

Schulbildung

1984 - 1988 Grundschule, Dorsten-Wulfen
1988 - 1997 Gymnasium Petrinum Dorsten, Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

04/1998 - 04/2002 Studium der Pharmazie an der Universität Münster
08/2003 Approbation zum Apotheker

Wissenschaftlicher Werdegang

Ab 07/2003 Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Karas

Thema: „Analyse und Charakterisierung der Proteinphosphorylierung auf der Peptidebene mittels massenspektrometrischer Methoden“.

Lehrtätigkeiten

07/2003 - 01/2006 Assistent im Praktikum „Quantitative anorganische Analytik“ des 2. Semesters in der Pharmazie, Goethe-Universität Frankfurt
02/2006 - 10/2007 Leitung und Organisation des Praktikums „Quantitative anorganische Analytik“ für Studenten des 2. Semester Pharmazie an Goethe-Universität Frankfurt am Main

Berufserfahrung

Seit 04/2008 Product Development Manager, Mika Pharma GmbH

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Analyse und Charakterisierung der Proteinphosphorylierung auf Peptidebene mittels massenspektrometrischer Methoden“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Ludwigshafen, den

.....
Tri Hoang