

# **Entwicklung neuer Methoden zur Ergebnisvalidierung in der massenspektrometrischen Proteomanalytik**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Vinh An Thieu-Simchen**

aus Vientiane

(LAOS)

Fachbereich 08 - Biologie und Chemie

Institut für Anorganische und Analytische Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, Juli 2007

PROF. DR. PETER R. SCHREINER (DEKAN)

GUTACHTER:

1. PROF. DR. BERNHARD SPENGLER<sup>1</sup>

2. PROF. DR. ANDREA SINZ<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen

<sup>2</sup> Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Die Massenspektrometrie .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Ionisation .....	3
2.1.1.1 Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) .....	3
2.1.1.2 Elektrosprayionisation (ESI) .....	4
2.1.2 Massenanalysator .....	6
2.1.2.1 Massenaufösung und Massengenauigkeit .....	6
2.1.2.2 Tandemmassenspektrometrie (MS/MS, MS <sup>n</sup> , <i>Post-Source-Decay</i> ) .....	7
2.1.2.3 Ionenfallen-Massenspektrometer: Paul-Falle und Ionenzyklotronresonanz-Falle .....	8
Paul-Falle (IT-MS) .....	8
Ionenzyklotronresonanz-Falle (FTICR-MS) .....	11
2.1.3 Detektor .....	14
<b>2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Auswertung massenspektrometrischer Daten in der Proteomanalytik .....</b>	<b>16</b>
2.3.1 Die „Proteomanalytik“ .....	16
2.3.2 Die massenspektrometrische Peptid- und Proteinanalytik .....	16
2.3.2.1 Der Peptidmassenfingerruck (PMF) .....	16
2.3.2.2 Der Peptidfragmentierungsfingerruck (PFF) .....	17
2.3.2.3 Die <i>de novo</i> -Sequenzierung .....	19
2.3.3 Prinzip der DB-Suche mithilfe eines automatischen DB-Suchprogramms anhand von MS/MS-Daten .....	20
<b>2.4 Was macht die Analyse kleiner Peptide interessant? (MHC-Peptide) .....</b>	<b>22</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>24</b>
Chemikalien, Laborkleingeräte und Verbrauchsmaterialien .....	24
Nierenkarzinomzellen und monoklonale Antikörper .....	25
Synthetische Peptide .....	25
<b>3.2 Instrumentierung .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Geräte .....	26
Dionex <i>Summit</i> -Anlage (Kapillar-LC): .....	27
LCPackings <i>Ultimate Plus</i> -Anlage (Nano-LC): .....	28
3.2.2 Massenspektrometer .....	29
Thermo <i>Finnigan LCQ Deca XP</i> (3D-Ionenfallen-Massenspektrometer) .....	31
Thermo <i>Finnigan LTQ FT</i> (Hybridmassenspektrometer) .....	32
AP-MALDI-Quelle (MALDI-Präparation) .....	33
Weitere Massenspektrometer: <i>ALADIM II</i> und <i>Bruker Ultraflex TOF/TOF</i> .....	33

<b>3.3 Methoden</b> .....	<b>34</b>
3.3.1 Probenmaterial: MHC-Klasse I Peptide aus spezifischer Aufreinigung (Immunaффinitätschromatographie) .....	34
3.3.2 Probenmaterial: Peptide aus unspezifischer Aufreinigung (Säureelution) .....	37
3.3.3 Datenbankrecherchen .....	39
Datenbank für <i>TurboSEQUEST</i> .....	39
<i>De novo</i> -Sequenzierungsprogramm .....	40
Weitere Datenbanken .....	41
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 Vergleich von Parametern für die MS/MS-Aufnahme</b> .....	<b>43</b>
4.1.1 Vergleich verschiedener Ionisationstechniken (MALDI, ESI, Ladungszustände) .....	44
4.1.1.1 Einfach geladene Spezies in der Ionenfalle .....	45
Vergleich von IT-MS <sup>2</sup> mit TOF/TOF-MS .....	46
4.1.1.2 Zweifach geladene Spezies in der Ionenfalle .....	47
4.1.2 MS <sup>n</sup> -Option und Kollisionsenergie .....	48
Vorteile des <i>Finnigan LTQ FT</i> .....	50
4.1.3 Auflösung und Massengenauigkeit .....	51
4.1.4 Schlussfolgerung aus dem Parametervergleich .....	53
<b>4.2 Klassische Analyseverfahren zur Bestimmung von Peptiden und Proteinen</b>	
<b>auf der Oberfläche von Nierenkrebszellen</b> .....	<b>55</b>
4.2.1 <u>Klassische Methode mithilfe IT-MS/MS-Analyse und <i>de novo</i>-Sequenzierung</u> (MHC-Klasse-I Peptide aus spezifischer IAC-Aufreinigung von A498) .....	55
4.2.1.1 <i>De novo</i> -Sequenzierung .....	55
4.2.1.2 Schwierigkeiten bei der <i>de novo</i> -Sequenzierung .....	59
4.2.1.3 Resultate der Primärstrukturaufklärung von MHC-I bindenden Peptiden .....	62
4.2.1.4 Automatische Datenbank-Suche (spezifisch aufgereinigte A498-Proben) .....	68
4.2.2 Vereinfachte Probenaufarbeitung von Peptiden <u>aus unspezifischer Aufreinigung</u> .....	69
4.2.2.1 Weitere Vorteile der vereinfachten Probenaufarbeitung .....	69
Mehr Probenausgangsmaterial macht Mehrfachanalyse mit online-Kopplung möglich .....	69
Reduzierung der Komplexität .....	70
4.2.2.2 Automatische DB-Suche (unspezifisch aufgereinigte A498-Proben) .....	70
4.2.3 Schlussfolgerung für die Peptididentifizierung mittels IT-MS/MS-Analyse .....	72
<b>4.3 <u>Neue validierte Methoden für die massenspektrometrische Proteomanalytik</u></b>	
<b>mithilfe hochpräzise gemessener MS- und MS/MS-Daten</b> .....	<b>75</b>
4.3.1 Validierte Ergebnisse aus den <u>unspezifisch aufgereinigten</u> RCC-Proben mithilfe von verifizierbaren FTICR-MS- und FTICR-MS/MS-Daten .....	76
4.3.1.1 Vorgehensweise bei der Datenverifizierung und Ergebnisvalidierung .....	76
Prinzip der MS-Datengenerierung anhand eines Beispiels mit CBS-Verifizierung der Peptidsequenz .....	77
Vorgehensweise bei der kompositionsbasierten <i>de novo</i> -Sequenzierung CBS .....	78
Modifizierte Vorgehensweise auf der Basis der kompositionsbasierten <i>de novo</i> -Sequenzierung: der „akkurate Peptid-Fragmentionenmassen-Fingerabdruck“ (APFF) .....	79
Zusammenfassung des vollständigen Ablaufs für die neu entwickelte Methode .....	80

4.3.1.2	Erste Resultate aus unspezifisch aufgereinigten RCC A498-Proben mithilfe der neuen Methode.....	81
	Verbesserte Vorauswahl der Ergebnistreffer bei der DB-Suche .....	81
	Modifizierte Vorgehensweise aufgrund der Verbesserungen bei der DB-Suche .....	82
4.3.1.3	Ergebnisse aus der unspezifischen Aufreinigung von RCC A498 und BN30 .....	84
	Diskussion zu den identifizierten Peptiden bzw. zugehörigen Ursprungsproteinen .....	90
4.3.1.4	Schlussbetrachtung für die neu entwickelte Analysenmethode .....	91
	Vergleich der Ergebnisse aus den DB-Analysen anhand der <i>LCQ Deca XP</i> - bzw. <i>LTQ FT</i> -Daten für die unspezifisch aufgereinigten RCC A498-Proben .....	92
	Folgerungen aus den Ergebnissen .....	94
4.3.2	Anwendung der neuen Datenvalidierungsmethode auf die <u>spezifisch aufgereinigten</u> A498-Proben .....	95
4.3.2.1	Vorgehensweise .....	95
4.3.2.2	Ergebnisse aus der Primärstrukturaufklärung der spezifisch aufgereinigten A498-Proben mithilfe von IT- und FTICR-MS und –MS/MS.....	95
4.3.2.3	Schlussfolgerung für die Identifizierung der MHC-I bindenden Peptide aus den spezifisch aufgereinigten A498-Proben.....	100
<b>5</b>	<b><i>Ausblick: Weitere Validierungsansätze in der massenspektrometrischen Proteomanalytik .....</i></b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b><i>Anhang.....</i></b>	<b>104</b>
<b>6.1</b>	<b>Top 20-Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung Fraktion 5 .....</b>	<b>104</b>
6.1.1	<i>TurboSEQUEST</i> -Ergebnisse aus Lauf 1 von „Frk5-3“ .....	104
6.1.2	<i>TurboSEQUEST</i> -Ergebnisse aus Lauf 2 von „Frk5-3“ .....	105
6.1.3	<i>TurboSEQUEST</i> -Ergebnisse aus Lauf 3 von „Frk5-3“ .....	106
<b>6.2</b>	<b>Beispiele von Peptidkandidaten aus der unspezifischen Aufreinigung der A498.....</b>	<b>107</b>
<b>6.3</b>	<b>Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung .....</b>	<b>108</b>
<b>6.4</b>	<b>Kandidatenliste aus unspezifischer BN30-Probenaufarbeitung.....</b>	<b>119</b>
<b>6.5</b>	<b>Kandidatenlisten aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung (zu Abb. 4-15 + Abb. 4-16).....</b>	<b>123</b>
6.5.1	Ergebnisse aus C8-Fraktion 5 (mit <i>Cut Off</i> < 3 kDa).....	123
6.5.2	Ergebnisse aus C8-Fraktion 5 (mit <i>Cut Off</i> < 3 kDa).....	123
6.5.3	Ergebnisse aus allen C8-fraktionen 4 - 8 (mit <i>Cut Off</i> < 3 kDa) .....	124
6.5.4	Ergebnisse aus den Einzelfraktionen 4 - 8 (mit <i>Cut Off</i> < 3 kDa).....	125
<b>6.6</b>	<b>Kandidatenliste aus spezifischer IAC-Probenaufarbeitung der A498.....</b>	<b>127</b>
	Literaturverzeichnis .....	130
	Abbildungsverzeichnis .....	144
	Tabellenverzeichnis .....	145
	Verzeichnis über eigene Publikationen.....	146
	Lebenslauf .....	147
	Danksagung.....	150

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure (engl.: <i>amino acid</i> )
AAC	Aminosäurezusammensetzung (engl.: <i>amino acid composition</i> )
Abb.	Abbildung
AP	Atmosphärendruck (engl.: <i>atmospheric pressure</i> )
APFF	„akkurates Peptid-Fragmentionenmassen-Fingerabdruck“
C8 bzw. C18	Spezifizierte Bezeichnung zur Kennzeichnung für die acht bzw. 18 C-Atom langen Ketten, die zur Umkehrung der stationären Phase (Säule) bei der RP-HPLC eingesetzt worden sind; wird synonym anstatt „RP“ verwendet
CBS	kompositionsbasierte <i>de novo</i> -Sequenzierung (engl.: <i>composition based sequencing</i> )
CHCA	<i>alpha</i> -Cyano-4-hydroxycimtsäure (engl.: <i>α-cyano 4-hydroxycinnamic acid</i> ) (oft auch als „HCCA“ abgekürzt)
CID	Stoß-induzierte Dissoziation (engl.: <i>collision induced dissociation</i> ) (synonym auch „CAD“ von <i>collision activated decomposition</i> )
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DAD	(Photo-)Diodenarray-Detektor
DB	Datenbank
ESI	Elektrosprayionisation
FA	Ameisensäure (engl.: <i>formic acid</i> )
FT	Fouriertransformation
FWHM	Halbwertsbreite (engl.: <i>full width at half maximum</i> )
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> )
IAC	Immunaффinitätschromatographie
ICR	Ionenzyklotronresonanz (engl.: <i>ion cyclotron resonance</i> )
IT	Ionenfalle (engl.: <i>ion trap</i> )
Kap.	Kapitel
mAk	monoklonale Antikörper
MAGE	Melanom Antigen (engl.: <i>melanoma antigen-encoding gene</i> )
MALDI	Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i> )
MS	Massenspektrometrie
MS/MS, MS <sup>2</sup>	Tandemmassenspektrometrie (mit einem Fragmentierungsschritt)
MS <sup>n</sup>	Tandemmassenspektrometrie mit höherer Anzahl an Fragmentierungsschritten (d.h. n-1 Schritten, aber n-ter Dimension)
NSI	Nano-Elektrosprayionisation
PFF	Peptidfragmentierungsfingerabdruck
PMF	Peptidmassenfingerabdruck
PSD	engl.: <i>post source decay</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
QIT	Quadrupolionenfalle (engl.: <i>quadrupol ion trap</i> ), 3D-Ionenfalle, Paul-Falle
R	Massenaufklärungsvermögen (engl.: <i>mass resolving power</i> )
RCC	Nierenzellkarzinom (engl.: <i>renal cell carcinoma</i> )

---

RF	Radiofrequenz bzw. radiofrequent
RP	Umkehrphase (engl.: <i>reversed phase</i> )
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: <i>trifluor acetic acid</i> )
TOF	Flugzeit (engl.: <i>time of flight</i> )
TOF/TOF-MS	Tandem-Flugzeitmassenspektrometrie
UniProtKB	<u>U</u> niversal <u>P</u> rotein <u>K</u> nowledge <u>B</u> ase (Universal-Proteindatenbank)
UV/Vis	Abkürzung bei der Photometrie für den <u>u</u> ltravioioletten und <u>v</u> isuellen Bereich des Lichtes

Die Aminosäuren wurden mit dem international gebräuchlichen Einbuchstabencode abgekürzt:

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

---

## 1 Zusammenfassung

Die sichere Identifizierung von Proteinen aus komplexen Probenmischungen stellt ein Problem in der Proteomforschung dar. Ein kürzlich durchgeführter Ringversuch zur Proteinidentifizierung aus einer aliquotierten Zellysatsprobe ergab nur wenige Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen aus den verschiedenen massenspektrometrischen Methoden der sechs teilnehmenden Firmen [Chamrad & Meyer **2005**]. Nur 3 % aller identifizierten Proteine konnten von allen Teilnehmern gemeinsam gefunden werden, während 97 % der insgesamt identifizierten Proteine von mindestens einem Teilnehmer nicht gefunden wurden. Dies weist darauf hin, dass validierte, sichere Verfahren in der Massenspektrometrie (MS) noch fehlen. Ein wesentliches Problem scheint in den wahrscheinlichkeitsbasierten Zuordnungen der in Datenbanken verzeichneten Sequenzen zu den MS-Daten zu liegen. Die Wahl der Methode zur Interpretation der Fragmentionen- (MS/MS-) Spektren für die Proteinidentifizierung aus hochkomplexen Peptidmischungen spielt dabei eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Qualität dieser Ergebnisse. Es hat sich erwiesen, dass gerade wenn das Spaltenzym nicht bekannt ist, eine Datenbank-unterstützte Proteinidentifizierung meistens fehlschlägt oder fragwürdige, mehrdeutige Ergebnisse liefert.

In dieser Arbeit wurde ausgehend von der klassischen, aufwändigen Analytik MHC-Klasse-I bindender Peptide eine neue Methode entwickelt, die zu validierten, vertrauenswürdigen Ergebnissen führt [Thieu et al. **2006**]. Sie besteht aus einer minimierten Probenaufarbeitung einer renalen Humankarzinomzelllinie mittels unspezifischer Säureelution und Ultrafiltration und basiert auf einer verifizierbaren Analyse von hochpräzise gemessenen MS- und MS/MS-Daten. Bei deren Auswertung wird neben der automatischen Datenbanksuche ein Datenbank-unabhängiges, auf Aminosäurezusammensetzungen basierendes *de novo*-Sequenzierungsverfahren [Spengler **2004**] angewendet. Dieses Verfahren dient zur Datenverifizierung der im ersten Schritt erhaltenen Ergebnisse auch ohne Angabe eines spezifischen Spaltenzyms und stützt sich auf die Kenntnis der akkuraten Massen nicht nur der Vorläuferionen, sondern auch der Fragmentionen. Das neu entwickelte Validierungsverfahren nutzt somit ein iteratives Zusammenspiel von schneller Datenbanksuche und zuverlässiger *de novo*-Sequenzierung auf Grundlage der höchstgenau gemessenen Massen. Durch diese neu entwickelte Methode wurden autoproteolytisch entstandene Peptide mit unbekannter Entstehungsgeschichte sowie ihre zugehörigen Ursprungsproteine eindeutig identifiziert, so dass auch solche Peptide eine nützliche Quelle für die Charakterisierung biologischer Proben darstellen können. Außerdem konnten durch die analoge Anwendung des neuen Validierungsverfahrens auf die mithilfe der spezifischen Immunaффinitätschromatographie klassisch aufbereiteten Proben weitere MHC-Klasse-I bindende Peptide auch ohne zusätzliche Synthese der Referenzpeptide erfolgreich identifiziert werden.



## 2 Grundlagen

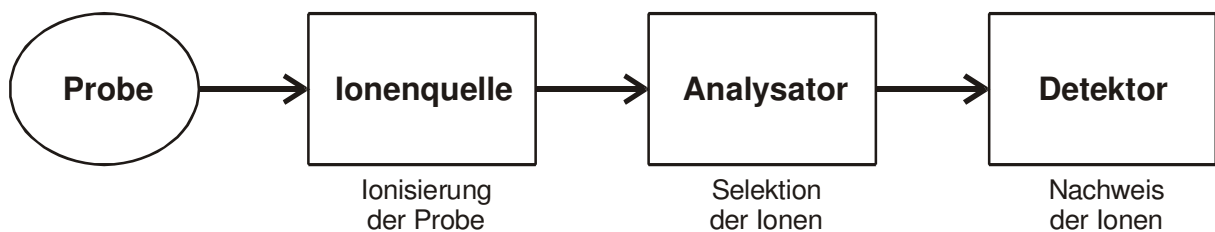
### 2.1 Die Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine der wichtigsten Methoden der modernen Analytischen Chemie. Ihre Leistungsfähigkeit beruht auf der höchst sensitiven Bestimmung der Massen von chemischen Elementen und Molekülen und hilft bei der Aufklärung der Zusammensetzung und Struktur von Verbindungen und Gemischen.

Sie ist ein Analyseverfahren, das die Anwesenheit einer zu untersuchenden Substanz, des Analyten, nach vorhergehender Ionisierung in einem Massenspektrum wiedergibt. Dadurch lässt sich nach hinreichend genauer Bestimmung der Masse des Analyten aufgrund der bekannten Atommassen direkt auf die elementare Zusammensetzung, d.h. die Summenformel der Substanz, schließen. Wird die untersuchte Analysesubstanz unter geeigneten Bedingungen im Massenspektrometer fragmentiert, so können die Massenspektren auch Signale strukturspezifischer Fragmentationen beinhalten, mit deren Hilfe die Struktur der unbekanntes Verbindung aufgeklärt werden kann. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist in der hohen Sensitivität begründet. Die Nachweisgrenzen der Probenmenge können dabei den Femtogramm-Bereich ( $fg = 10^{-15} \text{ g}$ ) unterschreiten.

Die Funktionsweise eines Massenspektrometers kann wie folgt skizziert werden:

Die zu untersuchende Probe wird in das Massenspektrometer eingebracht, verdampft und ionisiert. Die erzeugten Ionen müssen dabei im Hochvakuum ( $10^{-5}$  bis  $10^{-10}$  mbar) gehalten werden, damit sie nicht vorher durch Stoß mit anderen Gasmolekülen unbeabsichtigt entweder wieder neutralisiert oder fragmentiert werden. Als bewegte geladene Teilchen lassen sich die Ionen in Analysatoren auf verschiedene Weise nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ -Verhältnis) auftrennen und anschließend detektieren (Abb. 2-1). Nach der Detektion werden die Ionensignale digitalisiert und mithilfe eines Computers zur weiteren Auswertung gespeichert.



**Abb. 2-1:** Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

### 2.1.1 Ionisation

Atome oder Moleküle können auf unterschiedliche Weise ionisiert werden. Diese Ionisation findet in der Regel in Ionenquellen statt, wobei sich die Auswahl der Ionisierungsmethode nach dem physikalischen Zustand der Probe sowie nach ihrer Flüchtigkeit und thermischen Stabilität richtet.

Man unterscheidet „harte“ und „weiche“ Ionisationsmethoden. Bei der „harten“ Ionisation ist die zugeführte Energie so hoch, dass zusätzlich zur Ionisation in erheblichem Maße Fragmentierungsreaktionen ausgelöst werden, die von der chemischen Struktur des Moleküls abhängig sind. Diese Fragmentierungsreaktionen können z.B. bei der Elektronenstoßionisation (EI, engl.: *electron impact*) beobachtet werden, bei der der Energieübertrag für die Ionisation der untersuchten Moleküle durch Beschuss mit auf 70 eV beschleunigten Elektronen erfolgt. Die dabei auf das entstandene Molekülion übertragene, überschüssige Anregungsenergie erzeugt hier weitere Bindungsbrüche.

Bei der „weichen“ Ionisation wie z.B. der Matrix-assistierten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) oder der Elektrosprayionisation (ESI) werden die Substanzen nicht oder nur geringfügig fragmentiert und im Massenspektrum hauptsächlich als intakte Molekül- oder Quasimolekülionen (z.B.  $[M+H]^+$ ) erfasst. Zusätzliche Strukturinformationen können hier durch Tandemmassenspektrometrie z.B. nach einer gezielten Stoßaktivierung mittels CID (engl.: *collision induced dissociation*, synonym auch CAD *collision activated decomposition*) erhalten werden.

Da die beiden „sanften“ Ionisationsmethoden MALDI und ESI in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden, sollen sie nachfolgend näher erläutert werden.

#### 2.1.1.1 Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisation

Für das Verfahren der Matrix-assistierten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) wird die Probe in eine organische Matrix eingebettet und dann mit einem gepulsten, hochenergetischen Laserstrahl beschossen [Karas et al. **1985**]. Dabei wird die Laserstrahlenergie in erster Linie über die das Laserlicht absorbierende Matrix in den Festkörper übertragen. Die Folge ist eine Festkörperdesintegration. Der weitere Mechanismus ist bis heute nicht vollständig geklärt, allerdings existieren zwei plausible Modellvorstellungen. Dabei werden entweder durch Säure-Basenreaktionen in Lösung präformierte Molekülionen freigesetzt [Karas et al. **2000**] oder es werden Molekülionen durch Gasphasenreaktionen des Analyten mit den Matrixionen in der Gasphase dicht oberhalb des sich auflösenden Festkörpers gebildet [Bökermann et al. **1995**]. Auf diese Weise können große, intakte und polare, also schwer verdampfbare, Moleküle aus kondensierten Phasen nahezu ohne Fragmentierung in die Gasphase und den ionischen Zustand überführt werden [Karas et al. **1987/88/89a/89b**].

So sind Polymere, Proteine, Kohlenhydrate und andere Biopolymere nachweisbar, die durch MALDI typischerweise ein- oder seltener mehrfach geladene Spezies ergeben. Eine wichtige Voraussetzung bei dieser Ionisationsmethode ist, dass die Matrix bei der eingestrahlten Laserwellenlänge eine hohe spektrale Absorption besitzt, damit die Moleküle bei geringer thermischer Belastung schnell in die Gasphase gebracht werden können. Dadurch kann die auf die Analyten übertragene Energie gering gehalten werden. Da die meisten zum Einsatz kommenden Laser Strahlung im ultravioletten Wellenlängenbereich emittieren, eignen sich als Matrix vor allem kleine organische, aromatische Säuren wie z.B. *alpha*-Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) [Beavis & Chait **1989**] oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [Strupat et al. **1991**].

Für die Probenpräparation wird die Analytprobe mit einem 1 000 bis 100 000-fachen molaren Überschuss von Matrix gemischt, um die Analytmoleküle dadurch räumlich voneinander zu trennen und ihre intermolekularen Wechselwirkungen zu minimieren. Beim Verdunsten des Lösungsmittels erfolgt eine Einbettung des Analyten in die Matrix.

Die MALDI-Technik wurde ursprünglich für Flugzeitmassenspektrometer entwickelt, in denen die Ionenquelle direkt in das Massenspektrometer integriert ist. Der Probenhalter, auf dem sich die präparierte Probe befindet, muss in diesen Geräten zunächst ins Hochvakuum eingeschleust werden.

Bei den so genannten AP-MALDI-Quellen entfällt der technisch aufwändige Vorgang der Einschleusung, da sie bei Atmosphärendruck (AP, engl.: *atmospheric pressure*) arbeiten. Hier kann ein zügiger Austausch der Probenhalter oder anderer AP-Ionenquellen am Massenspektrometer realisiert werden. Es werden mit AP-MALDI-Quellen jedoch geringere Signalintensitäten und damit auch geringere Nachweisempfindlichkeiten erreicht als mit Hochvakuumquellen. Dies kann auf den Ionenbildungsprozess und auf Stöße mit Luftmolekülen zurückgeführt werden. Die resultierenden Stöße können dabei zu Neutralisierungs- und Fragmentierungsreaktionen führen oder zu einer Streuung der Ionen beitragen.

#### 2.1.1.2 Elektrosprayionisation

Bei der Elektrosprayionisation (ESI) wird eine Analytlösung unter Atmosphärendruck kontinuierlich in Richtung der Einlassöffnung des Massenspektrometers versprüht. Dabei wird ein starkes elektrisches Potential zwischen der Probenlösung in der Kapillare und der Gegenelektrode im Massenspektrometer angelegt, so dass kleine geladene Tröpfchen produziert werden, die letztlich zur Ausbildung der nachweisbaren Ionen führen. Durch diese fragmentierungsfreie Ionisierungstechnik konnten ebenfalls biologische Makromoleküle untersucht werden [Meng et al. **1988**; Fenn et al. **1989/90**]. John Bennett Fenn wurde für diese Entwicklung im Jahre 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie bedacht.

Bei der ESI wird für die Bildung und den Nachweis positiv geladener Ionen die Kapillare mit der Flüssigkeit als Anode und das Massenspektrometer als Kathode geschaltet. Durch das angelegte elektrische Potentialfeld werden die an der Flüssigkeitsoberfläche angereicherten positiven Ionen gegen die Oberflächenspannung der Flüssigkeit in Richtung Kathode gezogen, wodurch sich der charakteristische Taylorkonus bildet (d0 in Abb. 3-3). Dieser Flüssigkeitsstrom zerfällt in einiger Entfernung von der Anode in einzelne Tröpfchen, die zunächst einen Durchmesser von wenigen Mikrometern besitzen und mehrere positive Ladungen enthalten. Durch kontinuierliches Verdampfen von Lösungsmittel kommt es im weiteren Verlauf zu einer Abnahme der Tröpfchengröße bei gleichzeitiger Zunahme der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche (d1 – d3 in Abb. 3-3). In Folge der zunehmenden Coulombkräfte zwischen den gleichen Ladungen kommt es schließlich zum spontanen Zerfall der Tröpfchen (Coulomb-Explosion).

Der endgültige Übergang der Analytmoleküle in die Gasphase erfolgt nach der *single ion in droplet* Theorie von Kebarle [Ikonomou et al. **1991**, Tang & Kebarle **1993**] bzw. Röllgen [Schmelzeisen-Redeker et al. **1989**] in Weiterentwicklung der Arbeiten von Dole [Dole et al. **1968**] durch Bildung kleinster Tröpfchen, die noch ein einziges geladenes Molekül enthalten, und anschließender Desolvatisierung der Analytmoleküle durch Kollision mit Stickstoffmolekülen am Übergang zum Massenspektrometer (*charged residue model*).

Das Ionenemissionsmodell nach Iribarne und Thomson erklärt den Vorgang dagegen durch die direkte Emission von Ionen aus hochgeladenen Tröpfchen (*ion evaporation model*) [Iribarne & Thomson **1976**; Thomson & Iribarne **1979**].

Im Gegensatz zu MALDI resultieren beim ESI-Prozess vorwiegend mehrfach geladene Ionen.

Im Bereich der Peptid- und Proteinanalytik hat sich eine spezielle Ausführung der Elektrosprayionisation, die Nanospraytechnik (Nano-Elektrosprayionisation, Nano-ESI oder auch NSI), durchgesetzt [Arnott et al. **1993**; Wilm & Mann **1994/96**]. Bei der offline-Methode werden mit Edelmetall bedampfte, ausgezogene Glaskapillaren verwendet, die mit wenigen Mikrolitern Probelösung befüllt werden. Für online-Messungen werden häufig so genannte *fused silica*-Kapillaren (mit Polyimid beschichtete Quarzkapillaren) verwendet, die ebenfalls leitend beschichtet sein können. Alternativ kann die Hochspannung mithilfe einer *Liquid Junction* angelegt werden (T-Stück mit Drahtelektrode direkt im Fluss der zu versprühenden Analytlösung). Durch die sehr geringen Flussraten im Bereich von nl/min erweist sich diese Methode gegenüber der herkömmlichen Elektrosprayionisation (Flussraten von 5 – 50 µl/min bis zu 1 ml/min) als höchst sensitiv: der Ionenstrom korreliert im Elektrosprayprozess mit der Probenkonzentration und nicht mit dem versprühten Lösungsmittelvolumen pro Zeit [Valaskovic et al. **1995**; Blackburn & Anderegg **1996**].

## 2.1.2 Massenanalysator

Im Analysator werden die Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) getrennt. Dafür gibt es mehrere Methoden, die auf verschiedenen physikalischen Prinzipien beruhen. Die Ionen können z.B. in elektrostatischen oder magnetischen Feldern abgelenkt (Sektorfeldgeräte) oder in elektrischen Wechselfeldern (Quadrupol, Ionenfalle, Zyklotronresonanz-Analysator) nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis selektiert und anschließend bestimmt werden. Des Weiteren werden in Flugzeitmassenspektrometern (TOF-MS-Gerät, engl.: *time of flight*) unterschiedliche Flugzeiten von Ionen im feldfreien Raum einer Driftstrecke gemessen, die zuvor mithilfe eines elektrischen Feldes in eine Richtung beschleunigt worden sind.

### 2.1.2.1 Massenauflösung und Massengenauigkeit

Wichtig für die Charakterisierung eines Analysators sind Massenauflösung und Massengenauigkeit.

Das Massenauflösungsvermögen  $R$  (engl.: *mass resolving power*) wird definiert als der Quotient einer Masse  $m$  zum Massenunterschied  $\Delta m$ : 
$$R = \frac{m}{\Delta m}.$$

Hierbei drückt  $\Delta m$  den minimalen Massenunterschied aus, den zwei Ionen haben müssen, damit sie noch getrennt voneinander erkannt und unterschieden werden können. Ein größerer Zahlenwert für  $R$  bedeutet eine bessere Massenauflösung.

Methodisch bedingt gibt es verschiedene Definitionen der Auflösung:

- Bei der 10 %- bzw. 50 %-Tal-Methode wird  $\Delta m$  als der Massenabstand zweier Ionensignale (Peaks) definiert, wenn das Tal zwischen den zwei überlagerten Peaks 10 % bzw. 50 % der Peakhöhe des intensitätsschwächeren Peaks nicht überschreitet.
- Bei der Halbwertsbreitenmethode ist  $\Delta m$  die Breite eines Peaks bei halber Höhe (FWHM, engl.: *full width at half maximum*).

Da man nicht immer zwei benachbarte Massenpeaks mit der definiert überlappenden Peakhöhe im Spektrum findet, wird heute häufig die zweite Definition verwendet.

Die Massengenauigkeit ist die beobachtete maximale Abweichung des gemessenen Wertes zum Referenzwert, d.h. zur theoretisch ermittelten Masse des Analytiums. Dieser Referenzwert wird aus der Summenformel mithilfe der Atommassen berechnet. Die Abweichung kann in atomaren Masseneinheiten  $u$  angegeben werden, wobei auch die Tausendstelangabe  $mmu$  (engl.: *milli mass units*) benutzt wird. Zudem findet traditionell vor allem in der Biochemie eine weitere, nicht SI-konforme Einheit, das Dalton Verwendung (abgekürzt „Da“), welches synonym zur atomaren Masseneinheit ist.

Neben dieser absoluten Bestimmung der Massengenauigkeit ist es bei sehr hochauflösenden Massenspektrometern und hochmolekularen Verbindungen üblich, die erreichte Genauigkeit der gemessenen Massen relativ zur bestimmten Masse des Analytiums anzuführen. Diese wird in ppm (engl.: *parts per million*) angegeben und gibt die Massenabweichung relativ zur Referenzmasse in millionstel Anteilen wieder.

Unabhängig von den verwendeten Einheiten für die Massengenauigkeit gilt:

je kleiner der Zahlenwert innerhalb der vergleichbaren Einheiten ist, desto höher ist die beobachtete Massengenauigkeit.

#### 2.1.2.2 Tandemmassenspektrometrie

Durch Verwendung einer Reihenschaltung zweier Analysatoren, zwischen denen die Ionen durch Kollisionen mit Gasatomen gezielt fragmentiert werden, können strukturspezifische Fragmentationen gebildet und mithilfe dieser so genannten Tandemmassenspektrometer in einem Fragmentationenspektrum wiedergegeben werden. Die Analysenmethode heißt Tandemmassenspektrometrie MS/MS, wobei man die aufgenommenen Massenspektren analog dazu auch MS/MS-Spektren nennt.

Bei Flugzeitmassenspektrometern wird auch der Begriff TOF/TOF-MS verwendet, um die Analysenmethode zu spezifizieren.

Ionenfallen-Massenspektrometer brauchen diese Reihenschaltung nicht. In diesen Geräten ist eine mehrfache Wiederholung von Anregung und Massenselektion durchführbar ( $MS^n$ ), ohne dass prinzipiell ein weiteres Bauteil benötigt wird.

Eine weitere Ausnahme ohne notwendige Reihenschaltung mehrerer Analysatoren bildet die Primärstrukturaufklärung mithilfe des Post-Source-Decay-Verfahrens. Es ist in Verbindung mit der MALDI-TOF-MS entwickelt worden und trägt auch den Namen MALDI-PSD [Kaufmann et al. **1993/94/96**; Spengler et al. **1992a/92b**; Spengler **1997**]. Hierbei werden neben den intakten Molekülionen aus dem MALDI-Prozess auch die Fragmentationen gemessen, die aus den zuvor beschleunigten Ionen durch späteren Zerfall (z.B. durch Kollisionen mit Restgasmolekülen) in der feldfreien Driftstrecke entstanden sind.

### 2.1.2.3 Ionenfallen-Massenspektrometer: Paul-Falle und Ionenzyklotronresonanz-Falle

Die Ionenfalle dient zur Speicherung von elektrisch geladenen Teilchen, Ionen und Elektronen, die im Vakuum und ohne Kontakt zu einer Oberfläche festgehalten werden. Hier finden zwei verschiedene Ausführungen Anwendung, die in der MS weit verbreitet sind, die Paul-Falle und die Ionenzyklotronresonanz-Falle.

In der MS wird von diesen beiden Systemen nur die Paul-Falle als „*Ion Trap*“ (daher IT-MS) verstanden und ist nach seinem Erfinder Wolfgang Paul [Paul & Steinwedel **1953**; Paul & Raether **1955**] benannt worden, der hierfür 1989 den Nobelpreis für Physik erhielt.

Die Ionenzyklotronresonanz-Falle, kurz ICR-Falle, wird zur höchstauflösenden und sehr genauen Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie eingesetzt (engl.: *fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, FTICRMS, kurz: FTMS) [Comisarow & Marshall **1974a**; Amster **1996**; Marshall & Hendrickson **2002**].

#### Paul-Falle

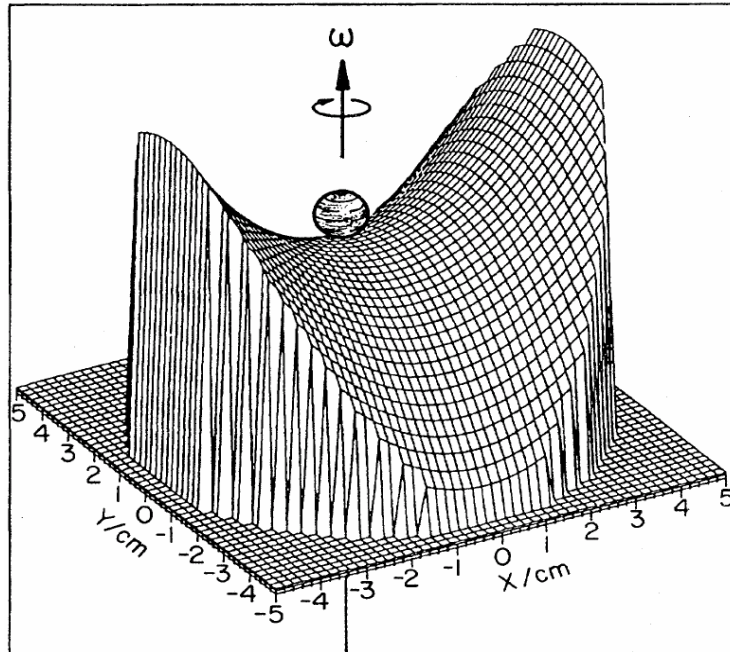
In einer Paul-Falle wird ein oszillierendes elektromagnetisches Feld verwendet, um die geladenen Teilchen festzuhalten.

Die Paul-Falle besteht aus drei Elektroden, einer mittleren Ringelektrode und zwei Schalen- oder Endkappenelektroden, die meist hyperbolische Innenflächen besitzen (Abb. 3-3, II). An die Ringelektrode wird eine hochfrequente Wechselspannung angelegt, die im Inneren der Falle ein elektrisches Feld erzeugt, welches auf die Ionen eine zeitlich periodisch wechselnde Kraft ausübt und sie auf stabilen Bahnen kreisen lässt. Je weiter sich die Ionen vom Zentrum der Falle entfernen, desto größer wird diese speichernde Kraft. Die Stabilität der Bahnen hängt dabei vom  $m/z$ -Verhältnis der Ionen ab.

Das Prinzip der Falle kann mit einem mechanischen Analogon nach Wolfgang Paul erklärt werden [Paul **1989**; Rückner et al. **1995**; Thompson et al. **2002**]:

In der Falle bilden die äquipotentialen Feldlinien die Form eines Sattels (Abb. 2-2). Würde nun entsprechend zu einem Ion eine schwere Kugel auf solch einer geformten Sattelfläche liegen, so würde sie bei der kleinsten Störung an einer Seite des Sattels herunterrollen. Rotiert die Fläche aber mit einer geeigneten Frequenz horizontal um die Mitte, kann die Kugel in einem quasi-parabolischen Becher stabilisiert werden. Je weiter die Kugel sich vom Zentrum wegbewegt, umso steiler ist die ansteigende Fläche und umso stärker die rücktreibende Kraft. Ähnlich verlief der Versuch mit mehreren Kugeln, wobei sie ebenfalls geringe oszillierende Bewegungen um die Ursprungmitte vollführen würden.

Im elektrischen Fall lässt sich die Drehung des Sattelpotentials durch Anlegen einer Wechselspannung realisieren. Dabei rotiert die Sattelfläche dann nicht mehr, sondern klappt unentwegt um, so dass das Verhalten des elektrischen Potentials in der Falle bildhaft eher mit einem „flügel-schlagenden Potentialsattel“ verglichen werden kann.



**Abb. 2-2:** Schemazeichnung zum „Potentialsattel“ in der Paul-Falle [Paul 1989]

Die Wertebereiche von der an den Elektroden angelegten Gleich- und Wechselspannung, in denen Ionen stabile Bahnen beschreiben, können hier durch Lösung der Mathieuschen Differentialgleichungen bestimmt werden [Paul & Raether 1955; Paul 1989].

Bei der Massenanalyse werden die Spannungen an den Elektroden so variiert, dass die Flugbahnen der Ionen instabil werden. Dadurch kann ein Teil der Ionen die Falle durch die Öffnung der hinteren Endkappe verlassen (Abb. 3-3, II<sub>d</sub> + III<sub>a</sub>) und anschließend detektiert werden. Der Ausstoß erfolgt aufgrund der Massenträgheit sukzessiv beginnend mit kleinem  $m/z$  und liefert nach Verarbeitung der Messsignale ein Massenspektrum für den erwünschten Massenbereich (erfolgreiche Kalibrierung mit Standardsubstanzen vorausgesetzt).

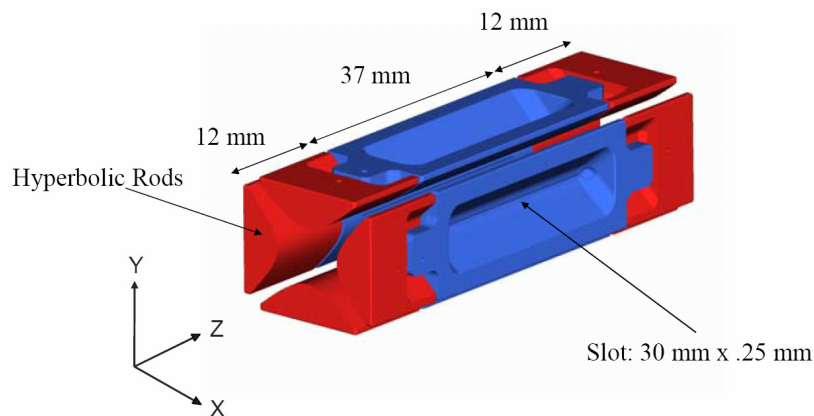
Das elektrische Feld in der Ionenfalle besitzt die Form eines Quadrupol-Feldes, so dass sie bildlich gesehen ebenso durch in sich kreisförmig gebogene Quadrupolstäbe erzeugt werden könnte, deren Enden miteinander verbunden sind. Daher wird die Paul-Falle auch als Quadrupolionenfalle (QIT) bezeichnet.



Einige neuere Aufbauten folgen nicht mehr der konventionellen dreidimensionalen Geometrie, sondern gleichen eher einer lang gezogenen Paul-Falle bzw. einem in drei Segmente unterteilten Quadrupol-Filter (Abb. 2-3). Diese linearen oder 2D-Ionenfallen besitzen einige Vorteile gegenüber der konventionellen Paul-Falle, die zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Geometrie auch 3D-Ionenfalle genannt wird.

Zum einen ergibt sich durch eine einfachere Realisierung einer Vergrößerung des 2D-Ionenfallenvolumens eine höhere Effizienz des *Trappings*, d.h. eine größere Anzahl von Ionen können eingefangen und gespeichert werden.

Zum anderen lässt ein radialer Ausstoß der gespeicherten Ionen über zwei längsseitige Schlitze bei der linearen Ionenfalle die Benutzung von gleichzeitig zwei Detektoren und dadurch eine höhere Sensitivität der Detektion zu. Außerdem kann in diesem Fall auch eine einfache Hybridisierung mit einem weiteren Detektor wie beim *Finnigan LTQ FT* realisiert werden, da zusätzlich ein axialer Ausstoß der Ionen möglich ist (Abb. 3-4, AII).



**Abb. 2-3:** Schema einer linearen Ionenfalle im *Finnigan LTQ*.

Rot gekennzeichnet sind die Endkappenelektroden, blau das Äquivalent der Ringelektrode (mit freundlicher Genehmigung der Thermo Scientific GmbH).

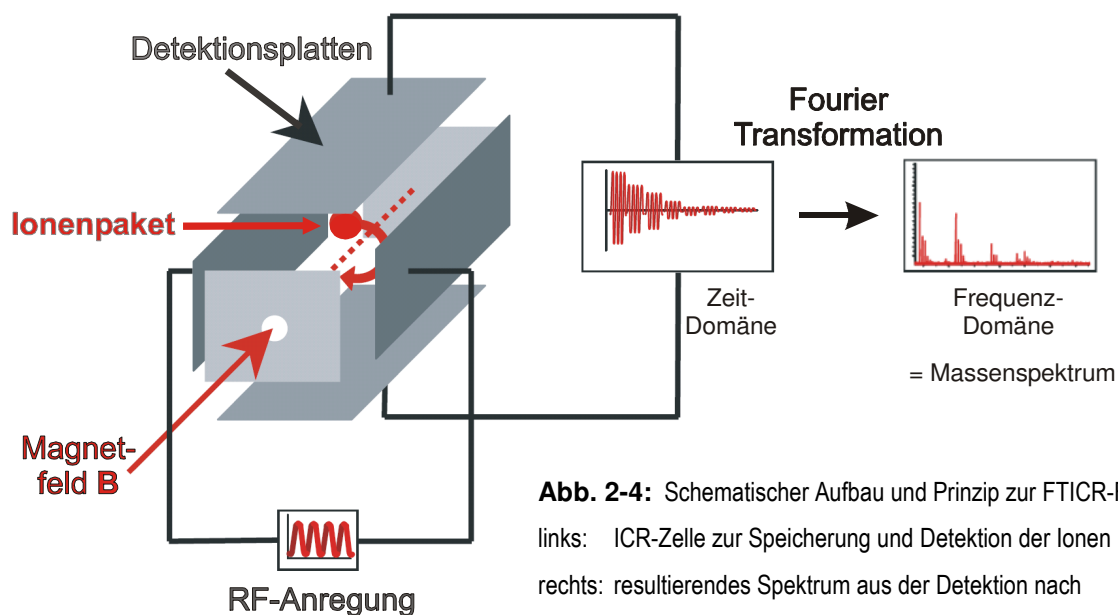
### Ionenzyklotronresonanz-Falle

Die Ionenzyklotronresonanz-Falle nutzt ein elektrostatisches Feld und ein statisches, starkes Magnetfeld zum Ioneneinschluss, wobei in der Regel nur Teilchen mit gleichem Ladungsvorzeichen zur selben Zeit gespeichert werden. Für die Massenanalyse wird hier dasselbe Bauteil benutzt, das auch zum *Trapping* verwendet wird, die ICR-Zelle (Abb. 2-4).

Die ICR-Zelle besteht aus mehreren Elektroden, den Anregungs- und Detektionsplatten und zwei Endkappen [Amster **1996**]. Ihre Anordnung kann im einfachen Falle einem Würfel gleichen, bei dem die Flächen an den Kanten voneinander elektrisch isoliert sind und die vordere Fläche als Einlass-Endkappe ein zentrales Loch für den Ioneneintritt besitzt. Auch ein offener zylindrischer Aufbau aus einer längs in drei Segmente unterteilten Röhre ist möglich, wobei der mittlere Zylinder noch in Längsrichtung in vier Segmente unterteilt ist und die anderen beiden Röhrensegmente als Endkappen fungieren.

Die beiden äußeren Endkappen liegen beim *Trapping* auf gleichem Potential und weisen das gleiche Ladungsvorzeichen wie die zu untersuchenden Teilchen auf. Das angelegte elektrische Feld verhindert, dass die Ionen beim Eintritt in die Falle sogleich gegen die gegenüberliegende Elektrode fliegen oder sich entlang der Röhre aus der Falle befreien. Sie liegen zentral in einer Potentialmulde, die ihre Bewegung in axialer Richtung einschränkt.

Das homogene Magnetfeld verläuft parallel zur Einflugachse der Ionen und zwingt sie auf Kreisbahnen mit senkrecht auf den Magnetfeldlinien stehender Ebene (Lorentzkraft). Die radiale Bewegungsfreiheit der Ionen ist begrenzt, so dass sie in der ICR-Zelle gehalten werden können.



**Abb. 2-4:** Schematischer Aufbau und Prinzip zur FTICR-Falle.

links: ICR-Zelle zur Speicherung und Detektion der Ionen  
rechts: resultierendes Spektrum aus der Detektion nach radiofrequenter (RF) Ionen-Anregung und mathematische Umwandlung durch Fouriertransformation in ein Massenspektrum

(Abbildung modifiziert; aus [Schrader & Klein **2004**])

Die Bewegung der gespeicherten Ionen kann in drei Arten differenziert werden: die Zyklotronbewegung, die Magnetronbewegung und die axiale Teilchenbewegung.

Die Zyklotronbewegung ist eine periodische Kreisbewegung um die Magnetfeldlinien. Ihre Frequenz  $f_c$  ist bestimmt durch das Gleichgewicht von Lorentzkraft  $F_L$  und Zentrifugalkraft  $F_z$  und hängt bei gegebener Masse  $m$  nur von der magnetischen Flussdichte  $B$  sowie der Ladung  $Q$  des gefangenen Teilchens ab.

$$\underbrace{Q \cdot v \cdot B}_{F_L} = \underbrace{\frac{m \cdot v^2}{r}}_{F_z} \Rightarrow Q \cdot B = \frac{m \cdot v}{r} = m \cdot \omega = m \cdot 2\pi f \quad (1)$$

$$\Rightarrow \omega_c = \frac{Q}{m} \cdot B \quad \text{bzw.} \quad f_c = \frac{Q}{m} \cdot \frac{B}{2\pi} \quad (2)$$

mit  $v$ : Geschwindigkeit der Teilchenbewegung auf der Kreisbahn

$v = \omega r = 2\pi f r$  ( $\omega$ : Winkelgeschwindigkeit;  $r$ : Bahnradius;  $f$ : Umlauffrequenz)

Diese Frequenz lässt sich sehr genau messen, so dass auch  $m/z$  verschiedener Teilchen sehr präzise bestimmt werden kann, da das angelegte magnetische Feld konstant gehalten wird. Dabei hat die Geschwindigkeit der Teilchen (Gleichungen 2) und damit auch ihre kinetische Energie nur Einfluss auf den Radius  $r$  ihrer Kreisbahnen und nicht auf die gemessene Zyklotronfrequenz  $f_c$ .

Zur Vereinfachung wird die Ladung  $Q$  in der Massenspektrometrie durch die Ladungszahl  $z$  ersetzt:

$$Q = n z F = n z e N_A$$

(mit  $n$ : Stoffmenge;  $F$ : Faraday-Konstante;  $e$ : Elementarladung;  $N_A$ : Avogadro-Konstante)

Die Magnetronbewegung ist eine Kreisbewegung der Ionen um die Fallmitte, ein Resultat aufgrund der Wechselwirkungen durch das Magnetfeld und das elektrische Feld, das für den Einschluss in axialer Richtung notwendig ist. Die Magnetronfrequenz  $f_m$  wird somit beeinflusst von dem angelegten *Trapping*-Potential  $U_0$ , dem Abstand  $d$  der Endkappen zueinander, von der magnetischen Flussdichte  $B$  und von der Geometrie der Zelle, die durch den geo-metrischen Faktor  $\alpha$  repräsentiert wird.

$$f_m = \frac{\alpha \cdot U_0}{\pi d^2 \cdot B} \quad (3)$$

Aus Gleichung (3) wird ersichtlich, dass  $f_m$  unabhängig vom  $m/z$  eines Ions ist.

Die Magnetronbewegung bringt daher keinen analytischen Nutzen mit sich und kann hingegen unerwünschte Effekte wie z.B. radiale Diffusion der Ionen, sowie Auflösungs- und Massengenauigkeitsverluste zur Folge haben.

Zusätzlich zur kombinierten Bewegung in der Radialebene gibt es eine axiale Teilchenbewegung zwischen den Endkappen aufgrund der Abstoßung zwischen diesen gleichgeschalteten Elektroden. Diese axiale Bewegung wird jedoch ebenfalls nicht für die Massenanalyse der Ionen genutzt.

In einer ICR-Falle können Ionen nicht nur gefangen, sondern auch detektiert und analysiert werden. Hierbei spielen die Anregungs- und Detektionsplatten eine entscheidende Rolle (Abb. 2-4). Im Unterschied dazu werden sie beim Trapping-Prozess prinzipiell nicht benötigt. Die Radien der Kreisbahnen, die die Ionen durch ihre anfänglichen Bewegungen in der Radialebene beschreiben, sind im Vergleich zur ICR-Zelle sehr klein. Für die Detektion müssen die Ionen zunächst in eine gemeinsame, größere Kreisbewegung überführt werden. Dies geschieht durch Anlegen eines radiofrequenten, elektrischen Feldes über die Anregungsplatten, so dass die gespeicherten Ionen kinetische Energie aufnehmen können, wenn die angelegte Frequenz mit der Zyklotronfrequenz der Ionen übereinstimmt. Bei kontinuierlicher, resonanter Einstrahlung würden sich die Ionen immer weiter in größeren Spiralen nach außen bewegen, bis sie gegen eine Elektrodenplatte stoßen und neutralisiert werden. Des Weiteren können nur die Ionen Energie absorbieren, die sich in Resonanz zur eingestrahlten Frequenz befinden, so dass Ionen anderer Masse im Fallenzentrum zurückbleiben. Daher wird für die Anregung der verschiedenen Ionen eine größere Bandbreite an Frequenzen (meist zwischen einigen kHz bis wenigen MHz) in nur einem kurzen Puls, dem so genannten *Chirp*, durchlaufen, so dass alle interessierenden Ionen auf detektierbare, größere Kreisbahnen gebracht werden [Comisarow & Marshall **1974b**; Marshall et al. **1998**].

Die Bestimmung der Ionen erfolgt nach beendeter Pulsanregung durch Messung der induzierten Ströme bzw. Bildladungen, die die geladenen Teilchen durch periodisches Vorbeifliegen an den Detektionsplatten erzeugen („*image current*“ [Comisarov **1978**]). Die Teilchen mit gleichem  $m/z$  bewegen sich aufgrund der gemeinsamen, resonanten Anregung als kollektives Ionenpaket. Dieses erzeugte, harmonische Signal gibt ein Frequenzspektrum wieder, welches hauptsächlich die (bei Gemischen unterschiedlichen) Zyklotronbewegungen der Ionen widerspiegelt bzw. genauer: die Differenz zwischen Zyklotron- und Magnetronfrequenz.

Für die Auswertung wird dieses aufgenommene Signal elektronisch verstärkt, mithilfe eines Transientenrekorders digitalisiert (Transientensignal) und durch ein mathematisches Verfahren, die Fouriertransformation (FT), in ein Massenspektrum umgewandelt. Die Fouriertransformation trennt dabei das Spektrum der überlagerten Frequenzen in seine Einzel frequenzen auf. Die Frequenz entspricht dem  $m/z$ -Wert, die Amplitude der Ionenintensität. Hierbei ist anzumerken, dass sich das erreichbare Massenaufhebungsvermögen  $R$  direkt proportional mit der Aufnahmedauer  $T$  des Transientensignals verbessert:

$$R = f_c T / 2 \quad (4)$$

Die untersuchten Ionen werden bei der FTICR-Technik zerstörungsfrei analysiert und detektiert. Sie bleiben auch noch nach dem Detektionsprozess chemisch unverändert in der ICR-Zelle, solange keine Kollisionen mit Restgasmolekülen stattfinden. Um große Lebensdauern von Ionen zu erhalten, erzeugt man in der ICR-Zelle ein Ultrahochvakuum von etwa  $10^{-9}$ -  $10^{-10}$  mbar.

Wie aus den Gleichungen in (2) und (4) ersichtlich, hängt das Massenauflösungsvermögen R auch von der angelegten magnetischen Flussdichte B ab. Daher kommt ein supraleitender Magnet zum Einsatz, der Flussdichten von einigen Tesla erzeugt (sechs Tesla im *Finnigan LTQ FT* unseres Instituts).

### 2.1.3 Detektor

Bei der FTICRMS werden zur Detektion die Bildladungen genutzt, die durch die an den Detektionsplatten vorbeifliegenden Ionen induziert werden.

Bei den anderen Massenspektrometern erfolgt der Nachweis der Analyten durch das Registrieren der zuvor im Analysator massengetrennten, selektierten Ionen z.B. auf einer Mikrokanalplatte (MCP, engl.: *microchannel plate*), einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder anderen Signalempfangsverstärkern.

Der SEV wird teilweise in Kombination mit einer zusätzlichen Konversionsdynode verwendet. Hierbei prallen die Ionen aufgrund einer angelegten hohen Beschleunigungsspannung (mehrere kV) auf eine Metalloberfläche, so dass durch die Kollisionen mit hoher kinetischer Energie eine kleine Anzahl an Elektronen produziert wird. Diese Sekundärelektronen werden durch ein elektrisches Feld auf die Dynoden des gegenüberliegenden SEV beschleunigt, wo fortlaufend weitere Elektronen herausgeschlagen werden, was schließlich zu einer Vervielfältigung der Elektronen und zu einer Signalverstärkung führt (Abb. 3-3, III).

Die erhaltenen Signale werden anschließend digitalisiert und gespeichert, so dass die akquirierten MS-Daten auch zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung stehen.

## 2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Bei sehr komplexen Proben kann vor der MS-Analyse auch eine Auftrennung des Gemisches nötig sein, um unerwünschte Effekte zu verhindern. Zum Beispiel kann es bei der gleichzeitigen Ionisierung mehrerer Substanzen zur Unterdrückung von Ionen kommen, da einige Peptide schlechter als andere (auch andere Moleküle, Atome) ionisiert werden und dann nicht im Massenspektrum auftreten. Für die Gemischauftrennung eignet sich besonders die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl.: *high performance liquid chromatography*, oft auch nur mit „LC“ abgekürzt) [Shi et al. 2004].

Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Probe zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase, durch eine Trennsäule, die die stationäre Phase enthält, unter hohem Druck gepumpt wird (Abb. 3-1). Üblicherweise ist dieser Säule eine Vorsäule vorgeschaltet, die die Aufgabe hat, Verunreinigungen abzuhalten, um damit die eigentliche Trennsäule zu schonen und ihre Trennleistung über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Die Vorsäule ist aufgrund der viel kleineren Dimension wesentlich preisgünstiger und einfacher zu wechseln als die Trennsäule. Es können auch verschiedene Laufmittel kombiniert werden (Abb. 3-2), so dass eine Aufreinigung und Aufkonzentrierung der zuvor eingebrachten Probe in der Vorsäule (= Trapsäule) durch einen vorgeschalteten Waschschrift möglich ist.

Maßgeblich für die Trennung von verschiedenen Substanzen aus einem Gemisch sind die Wechselwirkungen ihrer Bestandteile mit der stationären und der mobilen Phase. Das Trennprinzip ist die wiederholte Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen diesen Phasen, welches sich aufgrund unterschiedlicher physikalisch-chemischer Effekte wie z.B. Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch oder Affinität einstellen kann. Die Stärke dieser Wechselwirkungen bestimmt die Verweildauer oder Retentionszeit eines Stoffes bis zum Ende der Trennsäule, wo er dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden kann.

Zwei verschiedene HPLC-Systeme wurden während der Doktorarbeit eingesetzt, die sich hauptsächlich in ihren Dimensionen und damit auch in den Konzentrationsbereichen unterscheiden (Kapillar- bzw. Nano-LC).

## 2.3 Auswertung massenspektrometrischer Daten in der Proteomanalytik

### 2.3.1 Die „Proteomanalytik“

Das Proteom wurde 1995 als die Gesamtheit aller Proteine eines Genoms definiert [Wasinger et al. 1995]. Heute wird häufig eine exaktere Definition verwendet, worunter man die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort und unter bestimmten Umweltbedingungen vorhandenen Proteine verstehen kann (z.B. die eines biologischen Systems wie der Zelle). Im Vergleich zum Genom ist das Proteom dynamischer und aufgrund diverser, oft entwicklungsabhängiger Regulationsmechanismen auch wesentlich komplexer, z.B. aufgrund alternativen Spleißens, posttranslationaler Modifikationen (PTMs, engl.: *posttranslational modifications*) oder natürlicher Degradationen [Haynes et al. 1998]. Die Studie des Proteoms, seiner Zusammensetzung, Funktionen und Wechselwirkungen, wird unter dem Begriff „Proteomics“ zusammengefasst.

### 2.3.2 Die massenspektrometrische Peptid- und Proteinanalytik

Zu den Methoden, um massenspektrometrische Daten für die Proteinidentifikation zu nutzen, gehören der Peptidmassenfingerabdruck, der Peptidfragmentierungsfingerabdruck und die *de novo*-Sequenzierung.

#### 2.3.2.1 Der Peptidmassenfingerabdruck

Ähnlich wie der Fingerabdruck in der Kriminologie, der durch Vergleich bestimmter visueller Merkmale eine sehr sichere Identifizierung einer Person erlaubt, kann ein Protein durch einen Peptidmassenfingerabdruck (PMF, engl.: *peptide mass fingerprint*) [Cottrell 1994; Wise et al. 1997; Henzel et al. 2003] identifiziert werden. Hierzu wird das Protein durch eine bekannte Protease spezifisch gespalten, so dass charakteristische Peptide entstehen. Diese werden in ihrer molekularen Masse bestimmt. Die Proteinidentifizierung erfolgt anschließend anhand des Vergleichs der gemessenen Peptidmassen mit den errechneten Massen, die durch einen simulierten Verdau von Proteinen einer Proteinsequenz-Datenbank *in silico* entstehen [Henzel et al. 1993; James et al. 1993; Mann et al. 1993; Pappin et al. 1993; Yates III et al. 1993]. Häufig wird das zu identifizierende Protein mit Trypsin umgesetzt, welches spezifisch auf der C-terminalen Seite von Arginin (R) und Lysin (K) schneidet.

Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist, dass Proteine nur dann identifiziert werden können, wenn sie vorher isoliert worden sind oder es sich um ein einfaches Proteingemisch handelt bzw. alle anderen Komponenten im Gemisch bekannt sind.

Des Weiteren gelingt eine Identifizierung nur, wenn die Sequenzen der untersuchten Proteine in einer Sequenz-Datenbank (korrekt) eingetragen sind oder aus anderen Organismen homologe Proteine zum Vergleich herangezogen werden können [Pearson **1990**; Doolittle **1990**]. Homologe Proteine haben aufgrund ihrer stammesgeschichtlichen Verwandtschaft eine weitgehende Übereinstimmung ihrer Primär- (Aminosäuresequenz) sowie Tertiärstruktur und meist auch ähnliche Funktionen.

### 2.3.2.2 Der Peptidfragmentierungsfingerabdruck

In Analogie zur oben beschriebenen Analysenmethode spricht man vom Peptidfragmentierungsfingerabdruck (PFF, engl. *peptide fragmentation fingerprint*), wenn die Peptide zusätzlich in einem Massenspektrometer fragmentiert und die Massen der resultierenden Fragmente bestimmt werden (MS/MS). Erste Untersuchungen dieser Art wurden bereits 1986 durchgeführt, wo die aus dem Verdau resultierenden Peptide des Apolipoproteins B durch Stoßaktivierung bestimmt und dem bekannten Protein zugeordnet wurden [Hunt et al. **1986**]. Meist wird dies, wie z.B. in Triplequadrupolinstrumenten oder *Ion Traps*, durch eine niederenergetische Stoßaktivierung (*low energy CID*, engl.: *collision induced dissociation*) erreicht. Hierbei betragen die Kollisionsenergien  $< 100$  eV. Dagegen liegen sie bei hochenergetischen Stößen (*high energy CID*) bei mehr als 1000 eV [Yost et al. **1979**; Cody et al. **1982**; Papayannopoulos **1995**].

Die Stoßaktivierungen mithilfe *low energy CID* führen zu bevorzugten Fragmentierungen am Peptidrückgrat, vorwiegend an den Peptidbindungen des Peptids. Die beobachteten Massendifferenzen (Inkrementen) zwischen diesen Fragmenten entsprechen somit den Aminosäuren (AA, engl.: *amino acid*). Sie können idealerweise direkt aus dem MS/MS-Spektrum abgelesen und bildlich gesehen mit den Stufen einer „Sequenzleiter“ verglichen werden (siehe dazu Abb. 4-1). Genau wie das Peptidvorläuferion müssen die aus ihm entstandenen Fragmente noch mindestens eine Ladung tragen, um detektiert werden zu können. Verbleibt diese Ladung am C-terminalen Peptidfragment, spricht man von  $\gamma$ -Ionen. Ist sie hingegen am Fragment mit intaktem N-Terminus lokalisiert, bezeichnet man sie als  $\beta$ -Ionen. Für die genaue Zuordnung ihrer Reihenfolge werden die Ionen noch von den jeweiligen Peptidenden her durchnummeriert und mit tiefer gestellten Indices gekennzeichnet [Roepstorff & Fohlman **1984**]. Häufig findet man noch andere strukturspezifische Fragmente, die man z.B. durch formale Abspaltung von Wasser (-18 u), Ammoniak (-17 u) oder CO (-28 u) erklären kann. Fragmentationen mit CO-Abspaltungen, die sich aus  $\beta$ -Ionen ableiten lassen, werden als  $\alpha$ -Ionen bezeichnet.



Es gibt noch eine ganze Reihe weiterer Fragmente, die durch Brüche an anderen Bindungen gebildet werden, aber bei *low energy* CID relativ selten oder gar nicht auftreten (z.B. c-, x-, z-Ionen).

Die so genannten Immoniumionen sind ebenfalls wichtige strukturspezifische Fragmentationen. Diese entstehen durch doppelte Brüche am Peptidrückgrat und zählen somit zu den internen Fragmenten. Sie bestehen aus nur einem Kettenglied und werden aus einer kombinierten Spaltung gebildet, die strukturell gesehen zu einem a-Ion bzw. y-Ion geführt hätte. Die Immoniumionen und einige davon abgeleitete Fragmente geben direkt Aufschluss über die Anwesenheit der jeweiligen Aminosäure in einem Peptid und können nur im unteren Massenbereich bis ca.  $m/z = 200$  u detektiert werden [Johnson & Biemann **1989**; Falick et al. **1993**].

Die Identifizierung der meisten anderen internen Fragmente ist kompliziert und ist bei unbekanntem Peptid oftmals erst im Nachhinein möglich, wenn die Sequenz bereits ermittelt worden ist (siehe auch Kap. 4.1.1, 4.1.2 und 4.2.1.2).

Mithilfe von MS/MS-Spektren können vielfältige Informationen über die Peptidsequenz gewonnen werden, die im Unterschied zu einem einfachen PMF sichere Peptid- und damit auch zuverlässigere Proteinidentifizierungen liefern. Außerdem ist beim PMF keine Charakterisierung (z.B. von PTMs) möglich. Für die Bestimmung eines Peptids bzw. Proteins über die Fragmentationenspektren können mitunter auch schon sehr kleine Teilsequenzstücke eines fragmentierten Peptids ausreichen, wenn z.B. nur wenige Fragmentationensignale sicher zugeordnet werden können. Hierbei liefern die Suchanfragen mittels so genannter *sequence tags* oft erst dann gute Ergebnisse, wenn diese ermittelten Teilsequenzen aus mehr als zwei Aminosäuren bestehen und zusätzliche Angaben wie z.B. die beiden Fragmentationmassen, die jenes identifizierte Teilstück eingrenzen, und die Spezifität des schneidenden Enzyms berücksichtigt werden [Mann & Wilm **1994**].

Die Suche nach einem Protein mittels PFF basiert wie beim PMF auf dem Vergleich mit einer Datenbank (DB). Eine nähere Beschreibung des allgemeinen Prinzips bei der DB-Suche erfolgt in Kapitel 2.3.3.

### 2.3.2.3 Die de novo-Sequenzierung

In einigen Fällen ist eine *de novo*-Sequenzierung erforderlich, d.h. ein Abklären der Aminosäuresequenz allein aus dem MS/MS-Spektrum ohne weitere Vorinformationen. Grund dafür kann z.B. ein falscher oder fehlender DB-Eintrag sein, so dass die Zuordnung eines Fragmentationsspektrums zu einer bekannten Peptid-/Proteinsequenz nicht möglich ist. Auch bei Unklarheiten aufgrund mehrerer möglicher Zuordnungen zu verschiedenen Peptidsequenzen muss eine Verifizierung (= Überprüfung und Bestätigung) anhand der aufgenommenen MS/MS-Daten nach dem Prinzip dieser Primärstrukturanalyse durchgeführt werden. Dabei sind folgende Kalkulationen für die Massenberechnung zu berücksichtigen:

$$\text{Vorläuferion: } [M+H]^+ = \sum_{i=1}^n m(\text{AA}_i) + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \quad (1)$$

$$\text{y-Ion: } y_p^+ = [M+H]^+ - \sum_{i=1}^p m(\text{AA}_i) \quad (2)$$

$$\text{b-Ion: } b_q^+ = \sum_{i=1}^q m(\text{AA}_i) + \text{H}^+ \quad (3)$$

$$\text{a-Ion: } a_q^+ = b_q^+ - \text{CO} \quad (4)$$

$$\text{falls } p + q = n \Rightarrow y_p^+ + b_q^+ = [M+H]^+ + \text{H}^+ \quad (5)$$

mit  $[M+H]^+$ : Masse des einfach geladenen Vorläuferions

$n$ : Aminosäureanzahl des Vorläuferions

$i$ : Laufindex für das jeweilige Aminosäure-Inkrement

$m(\text{AA})$ : Masse des jeweiligen Aminosäure-Inkrementes (= Aminosäure – H<sub>2</sub>O)

$y, b, a$ : Masse des jeweiligen Fragmentions

$p, q$ : Positionsindices und Angaben der Aminosäureanzahlen des betrachteten  $y$ - bzw.  $b$ -Ions

H<sub>2</sub>O, H<sup>+</sup> bzw. CO: Masse des Wassers, des Protons (<sup>1</sup>H-Wasserstoffions) bzw. des Kohlenstoffmonoxids

Einen genaueren Einblick sowohl zu der herkömmlichen als auch zu einer neu entwickelten, kombinierten Vorgehensweise bei der *de novo*-Sequenzierung geben die nachfolgenden Kapiteln 4.2.1.1 und 4.2.1.2 bzw. 4.3.1.1 und 4.3.2.1.

### 2.3.3 Prinzip der DB-Suche mithilfe eines automatischen DB-Suchprogramms anhand von MS/MS-Daten

Bei der Analyse mittels PMF bzw. PFF ist für die Identifizierung der Peptide und damit auch der Ursursungsproteine ein Vergleich der beobachteten Peptidmassen bzw. der aus den MS/MS-Spektren abgelesenen Sequenzen mit den Einträgen in Datenbanken erforderlich. Dieser Abgleich geschieht aufgrund der meist sehr großen Datenmenge mithilfe von Computerprogrammen. Bei komplexeren Protein- bzw. Peptidgemischen ist ein einfaches PMF nicht sinnvoll. Aufgrund der großen Zahl von Möglichkeiten sind keine eindeutigen Zuordnungen der Peptide zu einem bzw. mehreren Proteinen nur anhand der gemessenen Peptidmassen möglich.

Für die Analyse mittels PFF kommt häufig noch eine vorherige Trennmethode wie die HPLC zum Einsatz (LC-MS/MS), die die Komplexität der Probe reduziert.

Das Prinzip der DB-Suche anhand von MS/MS-Daten bzw. des PFF mithilfe eines automatischen DB-Suchprogramms kann wie folgt beschrieben [Eng et al. 1994] und anhand des Schemas in Abb. 2-5 veranschaulicht werden:

Punkt (1): Zunächst werden die Daten eines Fragmentationenspektrums vorprozessiert („Eliminierung“ des Untergrundrauschens und gleichzeitige Reduzierung der Anzahl an Ionensignalen durch Berücksichtigung nur der intensivsten Ionen).

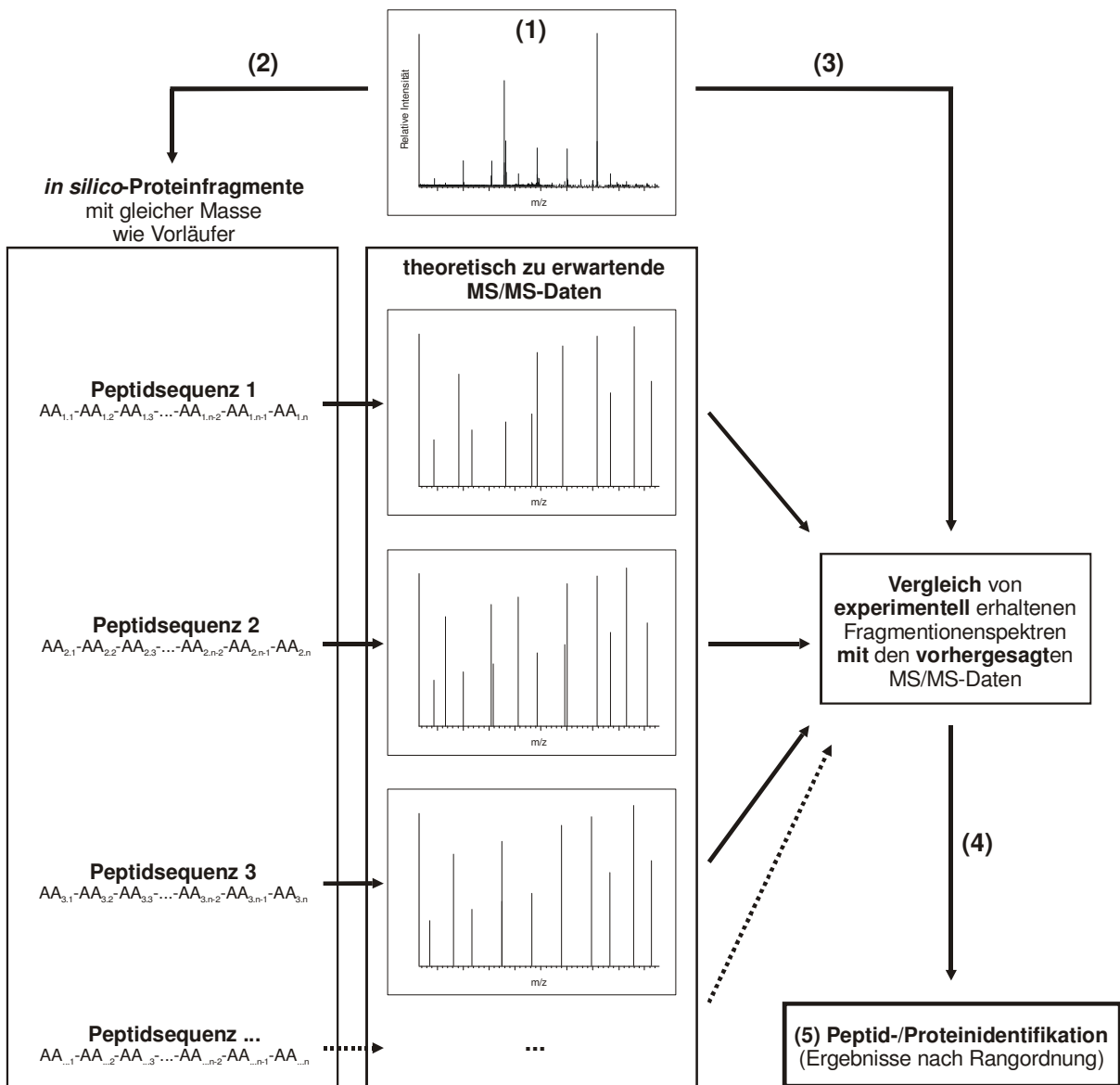
Punkt (2): Danach wird die Masse des Vorläuferions (= des untersuchten Peptids) festgestellt und mit den in Frage kommenden Molekulargewichten potentieller *in silico*-Proteinfragmente verglichen, die innerhalb eines angegebenen Massentoleranzfensters liegen. Zusätzlich werden für diese ermittelten, potentiellen Peptidsequenzen die theoretisch zu erwartenden MS/MS-Daten errechnet.

Punkt (3): Anschließend werden die vorausberechneten Fragmentationen dieser Peptidkandidaten mit den gemessenen massenspektrometrischen Daten verglichen. Es werden Punkte (*Score*-Werte) für jede einzelne Peptidsequenz nach unterschiedlichen Kriterien wie z.B. die Anzahl übereinstimmender Fragmentationensignale und ihrem Korrelationsgrad zueinander vergeben (*Scoring*).

Punkt (4): Die so gewerteten Peptidkandidaten werden zum Schluss sortiert und in eine Rangfolge gebracht (*Ranking*). Das in der Rangliste an oberster Stelle stehende Peptid spiegelt somit den besten Treffer mit höchster Wahrscheinlichkeit für eine richtige Zuordnung zu einem MS/MS-Spektrum wider.

Punkt (5): Ein Protein kann anhand der identifizierten Peptide bestimmt werden, die ihm aufgrund der Sequenzübereinstimmung zugeordnet werden. Hierbei muss angemerkt werden, dass die verschiedenen, zu berücksichtigenden Kriterien bei der DB-Suche vom Anwender individuell mit bestimmten Schwellenwerten versehen werden können, so dass

eine Filterung der Ergebnistreffer durchgeführt wird, die die Rangfolge und somit die Ergebnisse für eine Identifizierung beeinflussen kann (siehe dazu auch Kap. 4.2.1.4 und 4.2.2.2).



**Abb. 2-5:** Schema zur Vorgehensweise einer DB-Suche mithilfe von DB-Suchprogrammen.

zu (1): Das Fragmentationsspektrum eines Vorläuferions wird vorprozessiert.

zu (2): Es werden die potentiellen *in silico*-Proteinfragmente zum Vorläuferion anhand der beobachteten Peptidmasse ermittelt. (n: Gesamtanzahl der Aminosäuren für das jeweilige Peptid)

zu (3): Ein Datenabgleich der gemessenen mit den simulierten MS/MS-Daten wird durchgeführt. Dabei werden zu jedem Peptidkandidaten Bewertungspunkte vergeben (*Scoring*).

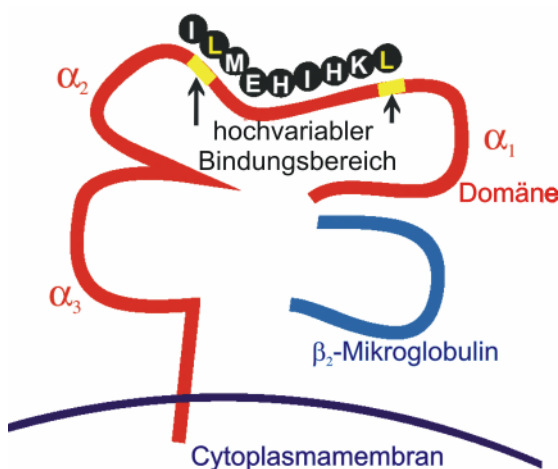
zu (4): Die gewerteten Kandidaten werden sortiert und in eine Rangfolge gebracht (*Ranking*).

zu (5): Die Proteinidentifikation erfolgt anhand der zugeordneten, identifizierten Peptide.

## 2.4 Was macht die Analyse kleiner Peptide interessant?

MHC-Peptide spielen eine bedeutende Rolle für die Immunerkennung, die Histokompatibilität (Gewebeverträglichkeit) bei Transplantationen und die immunologische Individualität [Ceppellini et al. 1969]. Sie leiten sich vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl.: *major histocompatibility complex*) ab, einer Gruppe von Genen, die beim Menschen auf Chromosom 6 zu finden sind. Ihre Genprodukte, die MHC-Moleküle auch MHC-Komplexe genannt, sind körpereigene Träger von Antigenen auf der Oberfläche nahezu jeder Zelle eines Organismus. Sie kennzeichnen die Zellen als zum Körper gehörig und regulieren so immunologische Vorgänge. Diese transplantationsrelevanten Gewebsantigene wurden erstmals auf humanen Leukozyten nachgewiesen [Dausset 1954], so dass für das Regulationssystem der Immunabwehr im Menschen auch die Bezeichnung HLA-System (engl.: *human leucocyte antigen*) verwendet wird.

Im Folgenden wird von den verschiedenen MHC-Klassen nur auf die der Klasse I eingegangen, die von fast allen Körperzellen exprimiert wird. Zu ihr gehören die Isotypen HLA-A, HLA-B und HLA-C. Der schematische Aufbau eines MHC-Klasse I Moleküls ist in Abb. 2-6 beschrieben.



(mit freundlicher Genehmigung von  
Herrn Dr. Thomas Flad, modifiziert)

**Abb. 2-6:** Schematischer Aufbau eines MHC-I-Komplexes.

Ein MHC-I-Komplex besteht aus einem antigenischen, nicht-kovalent gebundenen Peptid (ca. 8 - 10 Aminosäuren), einer in der Cytoplasmamembran verankerten Glykoproteinuntereinheit, der *heavy chain* mit drei  $\alpha$ -Domänen, und einer kleineren, nichtkovalent an der  $\alpha_1$ -Domäne gebundenen Untereinheit, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin.

Der MHC-I bindende Ligand, hier als eine Kugelkette dargestellt, besitzt bestimmte Ankeraminoaciden an den Positionen 2 und 9 in der Peptidsequenz. Diese werden bevorzugt von der so genannten polymorphen Peptidbindungsgrube festgehalten (hochvariabler Bereich der gemeinsamen  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne).

Die MHC-I bindenden Peptide sind Spaltprodukte der Proteine aus dem Zellinneren und werden in großer Vielfalt durch das im Cytosol befindliche Proteasom, einen zelleigenen Proteinabbaukomplex, gebildet. Ihre eigentliche Prozessierung erfolgt dabei zufällig und letztlich durch Aminopeptidasen, die sich ebenfalls im Cytoplasma befinden und die vorgeschrittenen Peptide N-terminal weiter verkürzen (trimmen).

Ihre weitere Degradation zu von der Zelle wieder verwendbaren Aminosäuren wird nur dann verhindert, wenn sie vorher ins Innere eines Zellkompartiments, genauer des Endoplasmatischen Retikulums, gelangen und dort bei geeigneter Peptidlänge (aus meist acht bis zehn Aminosäuren) an „leere“ MHC-I Moleküle assemblieren können [Rammensee **2002**].

Aufgrund der Dekomposition an verschiedenen Stellen des Prozessierungsweges werden aus nur weniger als 0.1 % der abgebauten Peptide auch spezifische Antigene präsentiert [Yewdell et al. **2003**]. Trotzdem kann ihre Anzahl auf einer einzigen humanen Zelle etwa 10 000 verschiedene Peptid-MHC-Komplexe in 1 - 10 000 Kopien betragen [Stevanovic & Schild **1999**]. Die präsentierten Antigene stellen sozusagen ein Abbild nahezu aller im Cytoplasma kontinuierlich synthetisierten Proteine dar.

T-Killerzellen, d.h. CD8 positive T-Lymphozyten mit cytotoxischen Funktionen (CTL, engl. *cytotoxic T lymphocytes*), ignorieren in der Regel mit ihrem T-Zell-Rezeptor solche Zellen, die ein Peptid präsentieren, das einem körpereigenen Protein entstammt. Der Körper bleibt vor Angriffen des eigenen Immunsystems geschützt (Selbsttoleranz). Auf diese Weise kann das Immunsystem den Körper fortwährend auf das Vorliegen viraler Infektionen und entarteter oder fremder Zellen überwachen. Ist eine Zelle mit Viren infiziert oder von Mutationen z.B. aufgrund eines Tumors betroffen, werden somit neuartige Proteine exprimiert und von den T-Zellen identifiziert, da dem Immunsystem nun körperfremde Antigene als Teil des MHC-I-Komplexes angeboten werden. Anschließend eliminieren die so aktivierten CTL die betroffenen Zellen, so dass eine Verbreitung verhindert wird. Ein Tumor kann folglich auf diese Weise früh erkannt und bekämpft werden.

Die Analyse von MHC-I bindenden Peptiden findet daher sehr großes Interesse bei der Aufklärung von Krebsmechanismen und in der Immuntherapie (möglicher Einsatz von Peptiden als Vakzine). Die Identifizierung der Antigene stellt allerdings aufgrund der bereits beschriebenen großen Vielfalt und der marginal zur Verfügung stehenden Probenmenge der Peptide eine große Herausforderung für den Analytiker dar [Hunt et al. **1992a**; Cox et al. **1994**].

In der vorliegenden Arbeit wird aus diesem Grund für die Charakterisierung der Oberfläche von Krebszellen ein weiterer Präparationsansatz beschrieben, der die Probenaufarbeitung und anschließende massenspektrometrische Analyse stark vereinfacht. Die wesentlichen Unterschiede beruhen darauf, dass beim zweiten Ansatz eine unspezifische Aufarbeitung durchgeführt wird, die zu einer viel größeren Ausgangsprobenmenge für die Analytik und letztlich zu mehr identifizierbaren Peptiden führt. Anhand dieser Peptide wird dann auf die exprimierten Proteine dieser Krebszelllinie geschlossen (Kap. 3.3.2).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### Chemikalien, Laborkleingeräte und Verbrauchsmaterialien

Name (Bestandteile)	Summenformel (Kürzel / Hinweis)	Spezifikation zur Anwendung/Reinheit	Bezugsquelle / Hersteller
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN (MeCN)	für die Spektroskopie, Uvasol	VWR International GmbH, (Merck KGaA) Darmstadt, D
Ameisensäure	HCO <sub>2</sub> H (FA)	für die MS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Fluka) Steinheim, D
<i>Calmix</i> (aus Koffein, Tetrapeptid MRFA, Ultramark 1621)	(Lösung enthält Acetonitril, Essigsäure, Methanol, Wasser)	zur Kalibrierung für <i>Thermo Finnigan</i> <i>LCQ Deca XP</i> und <i>LTQ FT MS</i> -Geräte	Thermo Scientific GmbH, Bremen, D (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
<i>alpha</i> -Cyano-4-hydroxy- zimtsäure	HO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH=C(CN)CO <sub>2</sub> H (CHCA)	rekristallisierte Matrix für MALDI-MS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
2,5-Dihydroxybenzoesäure	(HO) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H (DHB)	Matrix für MALDI-MS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Fluka) Steinheim, D
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (EtOH)	für die Spektroskopie, Uvasol	VWR International GmbH, (Merck KGaA) Darmstadt, D
Methanol	CH <sub>3</sub> OH (MeOH)	für die Spektroskopie, Uvasol	VWR International GmbH, (Merck KGaA) Darmstadt, D
Wasser	H <sub>2</sub> O	für Gradientenelution, HPLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Fluka) Steinheim, D

**Tab. 3-1:** Verwendete Chemikalien und Standard-Lösung zur Kalibrierung

Name	Orderinformation	Spezifikation	Bezugsquelle / Hersteller
Mikropipettenspitzen	<i>Microloader</i>	zum Befüllen von Mikroinjektionskapillaren	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikrozentrifuge	<i>MiniSpin</i> <sup>®</sup>	relative Zentrifugal- beschleunigung bis 12100 x g (13400 min <sup>-1</sup> )	Eppendorf AG, Hamburg, D
Nanospraynadeln 1 und 2	<i>Online PicoTips</i> <sup>®</sup> , 15 µm Tip-ID  <i>Offline PicoTips</i> <sup>®</sup> , 2 µm Tip-ID	für NSI online  für NSI offline	MS Wil GmbH, Wil, CH  (New Objective, Inc., Woburn, USA)
Nanospraynadeln 3	2 µm Tip-ID	für NSI offline	MasCom GmbH, Bremen, D
Zentrifugal-Ultrafilter 1	<i>Centrex</i> <sup>®</sup> UF-0.5 RC 3 K MWCO	3 kDa Trenngrenze	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, D
Zentrifugal-Ultrafilter 2	<i>Nanosep</i> <sup>®</sup> 3 kD Omega	3 kDa Trenngrenze	VWR International GmbH, (Merck KGaA) Darmstadt, D

**Tab. 3-2:** Verwendete Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

### Nierenkarzinomzellen und monoklonale Antikörper

Die Nierenkarzinomzellen der Linie RCC (engl.: *renal cell carcinoma*) A498 (HTB-44) und die monoklonalen Antikörper W6/32.HL [Barnstable et al. **1978**] wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen.

RCC BN30 ist eine Nierenkarzinomzelllinie aus dem Labor von Prof. Dr. Gerhard A. Müller (Universitätsklinikum Göttingen, D).

### Synthetische Peptide

Das synthetisch hergestellte MHC-I bindende Referenzpeptid mit der Sequenz FLWGPRALV stammt aus dem Labor von Frau Prof. Dr. Claudia Müller und Herrn Dr. Thomas Flad (Abteilung für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie der Universität Tübingen, D) und wurde für den Vergleich der instrumentellen Parameter in Kapitel 4.1 herangezogen.

Für die Verifikation der identifizierten Peptide mittels MS/MS-Datenabgleich in Kapitel 4.2.1.3 wurden folgende Referenzpeptide synthetisiert:

Monoisotopische Masse des [M+H] <sup>+</sup>	Peptidsequenz	Bezugsquelle	Verifizierung des identifizierten Peptids	
834.4567 u	SVASTITGV	PANATecs GmbH, Tübingen, D	+	
	VSASTITGV		-	
903.4782 u	GLATDVQTV		+	
	VAATDVQTV		-	
913.5717 u	GLLGTLVQL		Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jürgen Bernhagen, Institut für Biochemie, Abteilung für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Aachen, D	+
	LGLGTLVQL			-
	VALGTLVQL	-		
954.5870 u	SLLPAIVEL	PANATecs GmbH, Tübingen, D	+	
	LSLPAIVEL		-	
1009.6404 u	RLLDVLAPL		+	
1153.5888 u	FLGENISNFL		+	

**Tab. 3-3:** Synthetische Referenzpeptide

Für die massenspektrometrische Analyse mittels Nano-Elektrosprayionisation (NSI) wurde jedes untersuchte Peptid in einem 1:1-Gemisch von Methanol/Wasser (v/v) mit 0.1 % Ameisensäure gelöst und auf eine Endkonzentration von etwa  $10^{-5}$  mol/l gebracht. Anschließend wurden für die Messung je 2 µl Peptidlösung in Nanospraynadeln gefüllt und bei einem Potential von 1-1.6 kV versprüht.

Bei den %-Angaben für flüssige Lösungen handelt es sich in der vorliegenden Arbeit immer um Volumenprozent.



## 3.2 Instrumentierung

### 3.2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Geräte

Die beiden HPLC-Geräte von der Firma Dionex GmbH (Idstein, D) wurden mit dem mitgelieferten Programm *Chromeleon 6* (zuletzt in der Version 6.5) gesteuert.

Beide HPLC-Systeme sind für sehr kleine Probenaufgabemengen ausgelegt. Bei der *Summit*-Anlage wurden kleine Injektionsvolumina von  $< 5 \mu\text{l}$  manuell mithilfe einer HPLC-Mikroliterspritze ( $10 \mu\text{l}$  Hamilton *Gastight*<sup>®</sup> *Syringe* Type 1701RN, pst 3) injiziert. Bei der *Ultimate*-Anlage erfolgte die Probenaufgabe programmgesteuert mit einem Autosampler. Die sehr geringen, stabilen Flussraten (*Summit*:  $\sim 4 \mu\text{l}/\text{min}$  bzw. *Ultimate*:  $\sim 200 \text{ nl}/\text{min}$ ) werden durch Vorsäulensplittung und Einsatz von so genannten Calibratoren erreicht. Die Splittung vor der Säule erfolgt durch ein T-Stück, welches den Laufmittelfluss aufteilt. Die Calibratoren sind spiralförmig gewickelte feine Kapillaren von großer Länge, die aufgrund des verursachten definierten Rückdrucks für ein konstantes Splittverhältnis sorgen und somit die erwähnten Flussraten ermöglichen.

Die Separation der Peptide erfolgte nach ihrer Hydrophobie durch einen wässrigen Ameisensäure/Acetonitril-Gradienten (Eluent A: 0.1 % FA<sub>(aq)</sub>; Eluent B: 0.1 % FA in 80 % MeCN<sub>(aq)</sub>):

Minute	% Eluent B
0 – 2	5
2 – 37	5 – 45
37 – 41	45 – 95
41 – 49	95
49 – 50	95 – 5
50 – 65	5

**Tab. 3-4:** Parameter für den Gradienten eines HPLC-Laufs

Da sich die Programme für die verschiedenen Läufe an den beiden HPLC-Anlagen hauptsächlich in der Flussrate und aufgegebenen Probenmenge unterscheiden, wird hier nur ein repräsentatives Beispiel zu den Bedingungen für einen Gradientenlauf angegeben. Die Auftrennung der meisten Peptide fand dabei im linearen Gradientenbereich von ca. 25 % bis 45 % Eluent B (20-40 min, grau unterlegt) statt. Eine zusätzliche UV-Detektion erfolgte bei 214 nm.

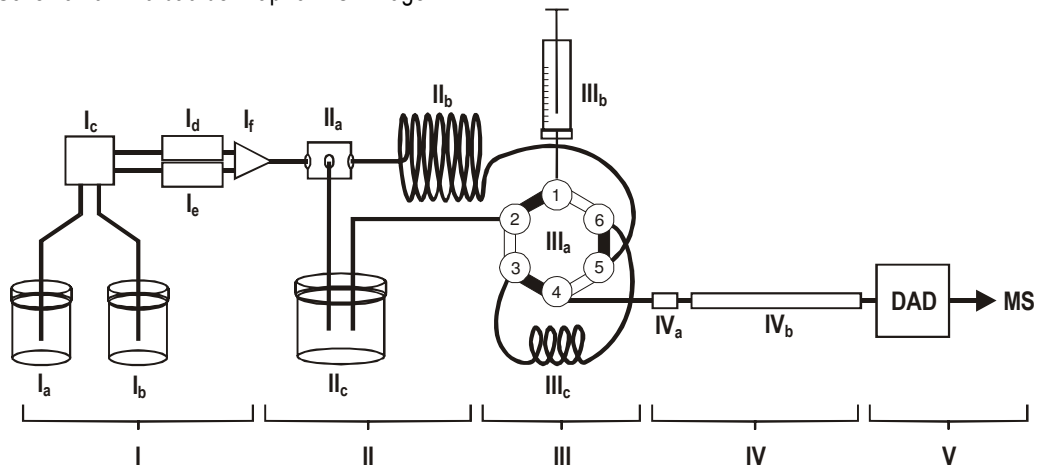
Die weiteren Parameter für die einzelnen HPLC-Anlagen werden nachfolgend angegeben.

Dionex Summit™-Anlage (Kapillar-LC):

- Pumpe: P 580A HPG (Hochdruckgradientenpumpe)
- Entgasereinheit: Degasys™ DG-1210 (online)
- Flusssplitter: Acurate™ IC-100-VAR (Vorsäulen-Flusssplitter)
- Probenaufgabe: VICI Cheminert™-Ventil  
(manuelle Spritzeninjektion mit Probenschleife)
- Trennsäule: PepMap™ 15 cm Länge x 300 µm ID, C18, 3 µm, 100 Å
- UV/Vis-Detektor: UVD 340 U (Photodiodenarray-Detektor)
- Messzelle: Mikro-Kapillarflusszelle (V = 0,14 µl; d = 8 mm)

Die Summit-HPLC-Anlage besteht aus einem Gradientenpumpsystem (Abb. 3-1, I: eine Entgasereinheit, eine Mischkammer und zwei Pumpen mit jeweils eigener Laufmittelzuführung), was zwei verschiedene Laufmittel auf der Hochdruckseite mischen kann. Die Probenaufgabe erfolgt hinter dem Splittsystem (II) über ein manuelles Schaltventil (III). Die injizierte Probe wird durch die Chromatographiesäulen (IV) aufgetrennt und mittels Diodenarray-Detektor und Kopplung am Massenspektrometer vermessen (V).

**Abb. 3-1:** Schema zum Aufbau der Kapillar-LC-Anlage



Legende:

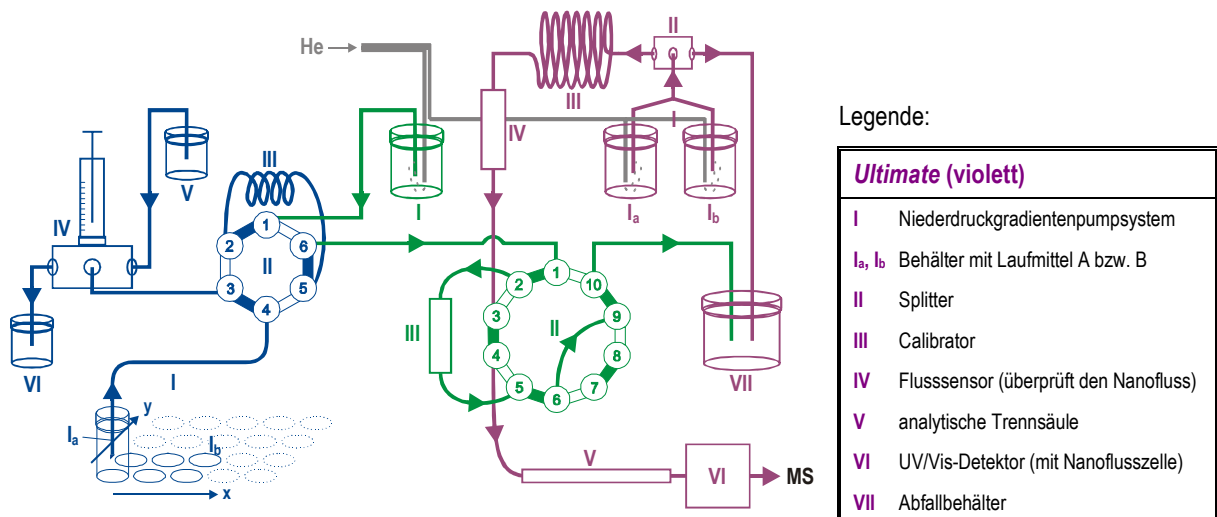
<b>I</b> Gradientenpumpsystem	<b>III</b> Probenaufgabesystem
Ia, Ib Behälter mit Laufmittel A bzw. B	IIIa 6-Port-Ventil (manuelle Bedienung)
Ic Entgaser	IIIb manuelle Injektion mittels HPLC-Spritze
Id, Ie Hochdruckgradientenpumpen	IIIc Probenschleife (hier : 5µl-Volumen)
If Mischkammer	<b>IV</b> Chromatographiesäulen
<b>II</b> Splittsystem	IVa Vorsäule
IIa Splitter	IVb analytische Trennsäule
IIb Calibrator	<b>V</b> Detektion mittels
IIc Abfallbehälter	<b>DAD:</b> Diodenarray-Detektor mit Mikroflusszelle (UV/Vis-Absorption)
	<b>MS:</b> Massenspektrometer

LCPackings *Ultimate Plus*™-Anlage (inerte Nano-LC):

- Probenaufgabe: *Famos*™ Inert (automatisches Aufgabesystem)
- Ladekreislauf: *Switchos*™ II Inert (computergesteuerte Umschaltventile, Pumpeinheit)  
 Trapsäule: PepMap™ 5 mm Länge x 300 µm ID, C18, 5 µm, 100 Å
- Trennkreislauf: *Ultimate Plus*™ Inert (Pumpeinheit mit Vorsäulen-Flusssplitter, Flusssensor, UV/Vis-Detektor)  
 Trennsäule: PepMap™ 15 cm Länge x 75 µm ID, C18, 3 µm, 100 Å  
 Messzelle: U-Z View™ (Nanoflusszelle: V = 3 nl; d = 10 mm)

Die *Ultimate Plus*-HPLC-Anlage besteht aus drei Gerätebaugruppen (Abb. 3-2): *Famos*, *Switchos* und *Ultimate*. Der *Famos*-Autosampler verfügt über ein temperierbares Gestell, was mit Probengläschen bestückt wird. Die Probenaufgabe erfolgt programmgesteuert mithilfe Spritzenpumpe und Probenschleife. Anschließend spült das *Switchos*-eigene Pumpensystem die auf die Schleife geladene Probe in die Vorsäule (= Trapsäule). Dort kann die Probe aufkonzentriert und von Verunreinigungen wie Puffersalzen befreit werden. Das auf Niederdruckseite vorgemischte Laufmittel wird in der *Ultimate*-Einheit über die Trapsäule geschickt und trennt die so injizierte Probe auf der analytischen Trennsäule auf. Die Detektion erfolgt über UV/Vis-Absorption und/oder Massenspektrometrie.

**Abb. 3-2:** Schema zum Aufbau der Nano-LC-Anlage



Famos (blau)	Switchos (grün)
I Probenentnahme	I Pumpensystem zum Laden der Trapsäule
I <sub>a</sub> Injektionsnadel (verfahrbar in y-Richtung)	II 10-Port-Ventil (mit PC ansteuerbar)
I <sub>b</sub> Gestell bestückt mit Probengläschen (verfahrbar in x-Richtung)	III Trapsäule
II 6-Port-Ventil (mit PC ansteuerbar)	He Helium zur Laufmittelbegasung (grau)
III Probenschleife (5µl-Volumen)	MS Massenspektrometer
IV Spritzenpumpe mit 4-Wege-Ventil	
V Behälter mit Spüllösung	
VI Abfallbehälter	

### 3.2.2 Massenspektrometer

Die beiden Massenspektrometer der Firma Thermo Scientific GmbH (San Jose, CA, USA bzw. Bremen, D) wurden mit den Programmen *Xcalibur 1.4 SR1* und *Tune Plus 1.4* gesteuert. Für die Elektrosprayionisation (ESI) und die Nano-Elektrosprayionisation (NSI) wurden kommerzielle Ionisationsquellen derselben Firma benutzt. Vor jedem Messzyklus wurde eine routinemäßige Kalibrierung mit der *Calmix*-Standardlösung durchgeführt. Dabei wurden die Instrumentenparameter auf das Tetrapeptid MRFA mit  $m/z = 524.3$  u automatisch abgestimmt. Außerdem fanden alle Messungen im positiven Modus mit Profilaufnahme statt, wobei für die  $MS^n$ -Messungen eine Auswahl der Vorläuferionen im Massenfenster (*isolation width*) von 2 - 3 u vorgenommen wurde. Durch die Profilaufnahme werden mehr Datenpunkte als bei der *Centroid*-Aufnahme aufgezeichnet, so dass bei ersterem eine bessere Erkennung und Zuordnung von Isotopenpeaks erreicht wird. Aus demselben Grund wurden relativ große Massenfenster bei der Selektion der Vorläuferionen im  $MS^n$ -Modus ausgewählt.

Zu den weiteren manuell eingestellten Instrumentenparametern gehörten die Spannungen an der Spraynadel (ESI: 3.6 kV; NSI: 1 - 1.6 kV) und die Temperatur der Ionentransferkapillare (220 - 275 °C).

Die Programmeinstellungen für den datenabhängigen MS/MS-Modus (*Data Dependent™* bzw. „Dep MS/MS“) geben die nachfolgenden Tabellen wieder:

Kapillar-LC-ESI-MS/MS am <i>Finnigan LCQ Deca XP</i>	
Datenerfassung ( <i>Scan Event</i> )	Details
(1)	MS, m/z-Bereich: 400 - 2000 u
(2)	Dep MS/MS, intensivstes Ion aus (1)

**Tab. 3-5:** Parameter für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme bei der Kapillar-LC-Kopplung am *LCQ Deca XP*-Gerät

Nano-LC/Nano-ESI-FTICR-MS/MS am <i>Finnigan LTQ FT (1. Messreihen) *</i>	
Datenerfassung ( <i>Scan Event</i> )	Details
(1)	<u>IT-MS</u> , MS, m/z-Bereich: 190 – 2000 u
(2)	<u>FT-MS</u> , MS, Auflösung: 100 000, m/z-Bereich: 300 – 2000 u
(3)	<u>IT-MS</u> , Dep MS/MS, <u>intensivstes</u> Ion aus (1)
(4)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>intensivstes</u> Ion aus (1)

**Tab. 3-6:** Parameter 1 für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme bei der Nano-LC-Kopplung am *LTQ FT*-Gerät

Nano-LC/Nano-ESI-FTICR-MS/MS am <i>Finnigan LTQ FT</i> (2. Messreihen) *	
Datenerfassung (Scan Event)	Details
(1)	<u>FT-MS</u> , MS, Auflösung: 100 000, m/z-Bereich: 300 – 2000 u
(2)	<u>IT-MS</u> , MS, m/z-Bereich: 300 – 2000 u
(3)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>intensivstes</u> Ion aus (1)
(4)	<u>IT-MS</u> , MS, m/z-Bereich: 300 – 2000 u
(5)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>zweitintensivstes</u> Ion aus (1)
(6)	<u>IT-MS</u> , MS, m/z-Bereich: 300 – 2000 u
(7)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>drittintensivstes</u> Ion aus (1)
(8)	<u>IT-MS</u> , MS, m/z-Bereich: 300 – 2000 u

**Tab. 3-7:** Parameter 2 für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme bei der Nano-LC-Kopplung am *LTQ FT*-Gerät

Offline Nano-ESI-FTICR-MS/MS am <i>Finnigan LTQ FT</i>	
Datenerfassung (Scan Event)	Details
(1)	<u>IT-MS</u> , MS, m/z-Bereich: 400 – 2000 u
(2)	<u>FT-MS</u> , MS, Auflösung: 100 000, m/z-Bereich: 400 – 2000 u
(3)	<u>IT-MS</u> , Dep MS/MS, <u>intensivstes</u> Ion aus (2)
(4)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>intensivstes</u> Ion aus (2)
(5)	<u>IT-MS</u> , Dep MS/MS, <u>zweitintensivstes</u> Ion aus (2)
(6)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>zweitintensivstes</u> Ion aus (2)
(7)	<u>IT-MS</u> , Dep MS/MS, <u>drittintensivstes</u> Ion aus (2)
(8)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>drittintensivstes</u> Ion aus (2)
(9)	<u>IT-MS</u> , Dep MS/MS, <u>viertintensivstes</u> Ion aus (2)
(10)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>viertintensivstes</u> Ion aus (2)
(11)	<u>IT-MS</u> , Dep MS/MS, <u>fünftintensivstes</u> Ion aus (2)
(12)	<u>FT-MS</u> , Dep MS/MS, Auflösung: 100 000, <u>fünftintensivstes</u> Ion aus (2)

**Tab. 3-8:** Parameter für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme bei der offline Nano-ESI-Messung am *LTQ FT*-Gerät

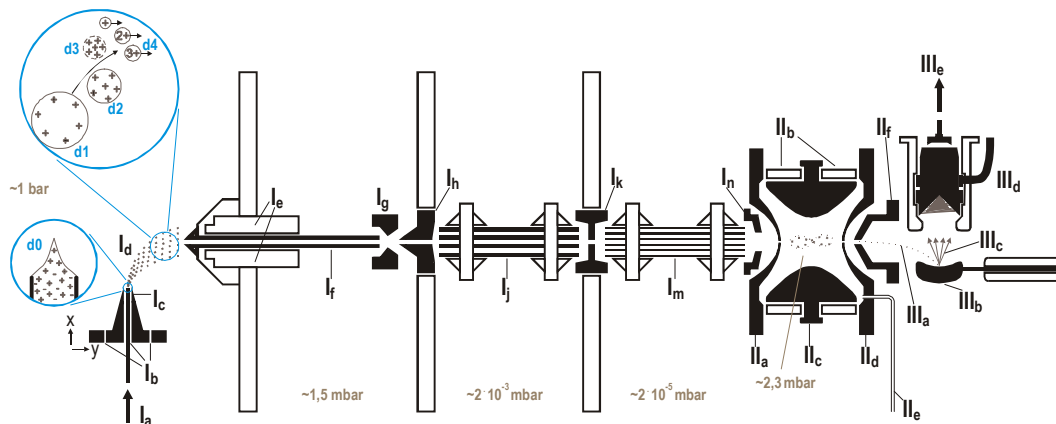
\* Aufgrund verschiedenster Ursachen sowohl auf gerätespezifischer (erstes ausgeliefertes *Finnigan LTQ FT*, Prototyp-Stadium) als auch programmtechnischer Seite wurden die Einstellungen für die automatischen, datenabhängigen MS/MS-Aufnahmen während der Nano-LC/Nano-ESI-FTICR-MS/MS-Messungen der A498-Proben variiert. Die BN30-Proben wurden jedoch nur nach Parameter 2 (Tab. 3-7) vermessen.

Weitere Einzelheiten zu den verschiedenen Instrumenten werden nachfolgend aufgeführt.

Thermo Finnigan LCQ Deca XP

Das *LCQ Deca XP* 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer besitzt ein differentiell gepumptes Vakuumsystem mit Druckgradienten von Atmosphärendruck bis ca.  $2 \cdot 10^{-5}$  mbar, welches die Analyt-Ionen beim Weg in die Paul-Falle durchqueren (Abb. 3-3). Die Ionen werden z.B. durch die orthogonal angebrachte, justierbare ESI-Quelle bei Atmosphärendruck erzeugt. Zur Veranschaulichung ist hier der ESI-Ionenbildungsprozess schematisch dargestellt. Durch eine beheizbare Transferkapillare gelangen die Ionen in das MS-Gerät. Zur besseren Lösemittelabtrennung befindet sich der restliche lineare Ionenweg in den Massenanalysator achsenverschoben zu dieser Eingangskapillare. Die Ionen werden bei ihrem Weg durch vier Linsen und zwei Multipolen geleitet und zu einem Ionenstrahl gebündelt, bis sie, in der Paul-Falle angekommen, durch Stöße mit Heliumatomen und aufgrund des elektrischen Feldes abgebremst werden. Hier können sie gesammelt und analysiert werden. Zur Detektion werden die Ionen sukzessiv nach ihrem  $m/z$ -Wert über die hintere Endkappe entleert und mithilfe einer Konversionsdynode und einem Elektronenvervielfacher registriert.

**Abb. 3-3:** Schema zum Aufbau der 3D-Ionenfalle



Legende:

<p><b>I Ionenquelle</b> (Probenzufuhr/Ionisation/Ionentransfer)</p>	<p><b>II Massenanalysator</b> (3D-Ionenfalle, Paul-Falle)</p>
<p>Ia Zuleitung der Probelösung                  Ib Zuleitung von Vernebelungsgas um die Spraynadel (N<sub>2</sub>-Zufuhr für bessere Desolvation der Analytmoleküle)                  Ic metallische Spraynadel, justierbar in x,y-Richtung                  Id Elektrospray (mit vergrößerter Ansicht dargestellter „Positiv-Modus“: d0: Taylorkonus; d1-d4: Desolvation + Coloumb-Explosion; Erläuterungen dazu in Kap. 2.1.1.2)                  Ie Messingheizblock mit Thermolement                  If beheizbare Ionentransferkapillare                  Ig Tube Lens (zur Fokussierung der Ionen nach Austritt aus Ie)                  Ih Skimmer (reduziert den Einlassanteil an Neutralteilchen wie Lösemittelmoleküle)                  Ij Quadrupol (vier quaderförmige Metallstäbe)                  Ik Intermultipol-Linse (zur Fokussierung nach Ij)                  Im Octapol (acht runde Metallstäbe)                  In Einlasslinse vor der Ionenfalle (zur Fokussierung nach Im)</p>	<p>IIa Einlass-Endkappe (hyperbolisch gewölbt)                  IIb Quartz Spacer (Isolerringe)                  IIc Ringelektrode (hyperbolisch geformt)                  IIa Auslass-Endkappe (hyperbolisch gewölbt)                  IIe Zuleitung für inertes Stoßgas (Helium-Zufuhr)                  Ifr Ausgangslinse hinter der Ionenfalle</p>
	<p><b>III Detektion</b></p> <p>IIIa Ionenstrom aus der Ionenfalle                  IIIb Konversionsdynode auf 15 kV (abh. v. Ionensorte entgegengesetzte Zug-Spannung: positive Ionen „-15 kV“ oder negative „+15 kV“)                  IIIc Sekundärpartikel (geladene und ungeladene Teilchen herausgeschlagen nach Auftreffen der Ionen aus der Ionenfalle auf die Dynode: Verstärkung des Signals)                  IIId Elektronenmultiplier (weitere Signalverstärkung durch Elektronenkaskade)                  IIIe MS-Datenverarbeitung</p>

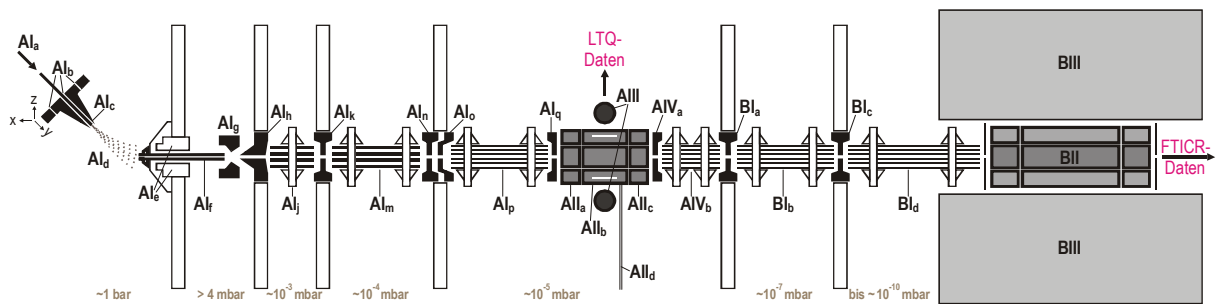
Thermo Finnigan LTQ FT

Das *LTQ FT* Hybridmassenspektrometer besteht aus zwei MS-Geräteeinheiten mit einem vorderen, unabhängigen *LTQ*- (Abb. 3-4, A: lineare Ionenfalle) und einem daran ange-  
koppelten *FT*-Teil (Abb. 3-4, B: FTICR-MS-Gerät). Das differentiell gepumpte Vakuumsystem  
umfasst hierbei einen Druckgradienten von 13 Größenordnungen (bar bis  $10^{-10}$  mbar).

Der Aufbau der ESI-Ionenquelle und des Ionentransfersystems zur linearen Ionenfalle ist  
dem beim *LCQ Deca XP*-Gerät fast identisch. Das *LTQ*-Gerät besitzt jedoch eine zusätzliche  
Druckstufe und damit eine Linse und ein Multipol mehr. Außerdem hat die lineare Ionenfalle  
seitlich zwei Detektoreinheiten zur Ionenregistrierung.

Die Ankopplung an den *FT*-Teil geschieht axial über eine Reihe von Linsen und Multipolen.  
Die Detektion erfolgt wie in Kapitel 2.1.2.3 beschrieben. Der verwendete supraleitende  
Magnet erzeugt eine Flussdichte von sechs Tesla.

**Abb. 3-4:** Schema zum Aufbau des Hybridmassenspektrometers



Legende:

<b>A</b>	<b>LTQ</b> (linearer Ionenfallenmassenspektrometer)	<b>AIV</b>	Ionentransfer aus der Ionenfalle heraus
<b>AI</b>	Ionenquelle (ähnlich wie bei <i>LCQ Deca XP</i> )	<b>AIV<sub>a</sub></b>	Ausgangslinse
<b>AI<sub>a</sub> - AI<sub>h</sub></b>	Probenzufuhr und Ionenbildung	<b>AIV<sub>b</sub></b>	Octapol
<b>AI<sub>j</sub> - AI<sub>q</sub></b>	Ionenoptik für Ionentransfer	<b>B</b>	<b>FT-ICR</b> (Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz- Massenspektrometer)
<b>AI<sub>j,m</sub></b>	kurzes und längeres Quadrupol (je 4 quaderförmige Metallstäbe)	<b>BI</b>	Ionenoptik für Ionentransfer in die ICR-Zelle
<b>AI<sub>k,n,o,q</sub></b>	Intermultipol-Linsen (Ionenlinsen zur Fokussierung des Ionenstrahls und zur Abgrenzung der verschiedenen Druckstufen)	<b>BI<sub>a,c</sub></b>	Intermultipol-Linsen
<b>AI<sub>p</sub></b>	Octapol	<b>BI<sub>b,d</sub></b>	Octapole
<b>AII</b>	Massenanalysator (lineare Ionenfalle)	<b>BII</b>	Massenanalysator/-detektor (zylindrische ICR-Zelle)
<b>AII<sub>a,c</sub></b>	Einlass- bzw. Auslass-Endkappen	<b>BIII</b>	aktiv abgeschirmter, supraleitender Magnet: 6 Tesla bei 4,2 K; Ringspule aus multiverdrillten NbTi-/Cu-Filamenten; Ummantelung gekühlt: innen mit He (g) (Siedepunkt bei 4,2 K) bzw. außen mit N <sub>2</sub> (g) (Siedepunkt bei 77,4 K)
<b>AII<sub>b</sub></b>	speziell geformtes Quadrupol (4 innen hyperbolisch Metallstäbe, 2 Stäbe mittig längs offen für den Ionenauslass zur Detektion mittels <b>AIII</b> )		
<b>AII<sub>d</sub></b>	Zuleitung für inertes Stoßgas (He-Zufuhr)		
<b>AIII</b>	2 Detektoreinheiten (Aufbau siehe <i>LCQ Deca XP</i> )		

### AP-MALDI-Quelle

Neben ESI bzw. NSI wurde auch die kommerziell erhältliche AP-MALDI-Quelle Modell *AP/MALDI 121* mit der Steuerungssoftware *AP MALDI Target v.3.3* (MassTech, Inc., Columbia, MD, USA) benutzt. Zur Ionisierung wurde ein Stickstofflaser (*Thermo Laser Science OEM 337-Si Nitrogen Laser*) mit einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 337$  nm und einer Pulslänge von 4 ns verwendet.

### MALDI-Präparation

Die Proben für MALDI wurden mit  $\alpha$ -CHCA nach Dünnschicht-Methode [Vorm et al. **1994**] bzw. für das *ALADIM II*-Reflektor-TOF-MS mit DHB nach *Dried Droplet*-Methode [Karas & Hillenkamp **1988**; Strupat et al. **1991**] präpariert, wobei die Matrixlösung in Ethanol/Wasser (1:1, v/v) mit 0.1 % Ameisensäure hergestellt wurde.

### Weitere Massenspektrometer: ALADIM II und Bruker Ultraflex TOF/TOF

Das *ALADIM II* (*Advanced Laser Desorption Ionisation Mass Analyser II*) [Chaurand et al. **1999**] ist ein zweistufiges Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer aus Eigenbau und arbeitet mit einer Beschleunigungsspannung von etwa 18.5 kV. Zur Verbesserung der Massenauflösung besitzt es zusätzlich eine Einheit zur verzögerten Ionenextraktion (DE, engl.: *delayed extraction*). Zur Ionisierung wird ein N<sub>2</sub>-Laser (*VSL-337 NDS*, Laser Science, Inc., Franklin, MA, USA) mit der Wellenlänge von  $\lambda = 337$  nm und einer Pulslänge von 3 ns verwendet. Besonderes Merkmal dieses Massenspektrometers ist die koaxiale Laser- und Ionenoptik. Für die Steuerung, Datenaufnahme und -auswertung wurde das Programm *Ulisses (Universal Laser Ionisation Spectrometry System's Evaluation Software*, Version 8.1, © Prof. Dr. Bernhard Spengler) benutzt, wobei die Daten mit einem digitalen Oszilloskop (*LeCroy 9350 AM*) aufgenommen wurden.

Die Messungen am *ALADIM II* wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Dieter Kirsch aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und für die Abb. 4-2 verwendet.

Das *Ultraflex TOF/TOF* ist ein Tandem-Flugzeitmassenspektrometer der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen, D) ausgestattet mit einem Stickstofflaser ( $\lambda = 337$  nm) und einer LIFT-MS/MS-Einheit. Die LIFT-Technik ermöglicht eine Nachbeschleunigung der selektierten Vorläuferionen in der Kollisionszelle, so dass auch *high energy* CID durchgeführt werden kann. Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit den Programmen *FLEXControl 1.2* und *XMASS/NT Version 5.1.5*.

Die Messungen am *Ultraflex* wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Monica Linder (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klaus T. Preissner, Universitätsklinikum Gießen, D) durchgeführt und für die Abb. 4-4 verwendet.



### 3.3 Methoden

Für die Analyse der HLA-Antigene auf den Nierenkarzinomzellen wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt:

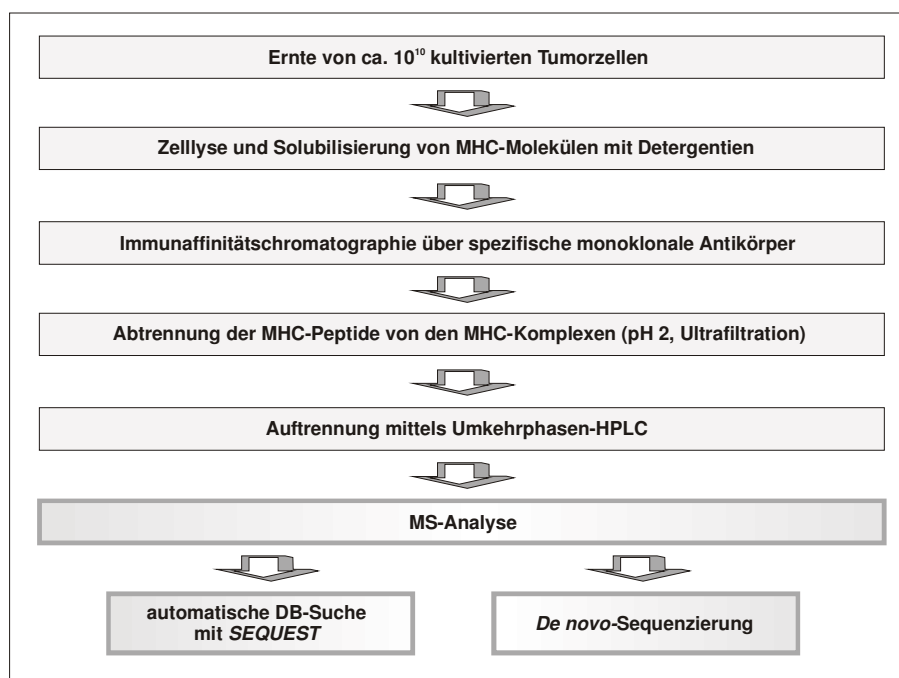
- (1.) Ein klassischer Ansatz verwendet Immunaффinitätschromatographie zur spezifischen MHC-Peptidgewinnung.
- (2.) Eine stark vereinfachte, unspezifische Probenaufarbeitung basiert auf Säureelution und Größenausschluss.

Zur Entwicklung der neuen, vereinfachten Methode kam es, nachdem von den untersuchten, komplexen Proben auch hochgenaue Massen im unteren ppm-Bereich für Vorläufer- und Fragmentationen akquiriert werden konnten.

#### 3.3.1 Probenmaterial: MHC-Klasse I Peptide aus spezifischer Aufreinigung (Immunaффinitätschromatographie)

Für die Analyse der MHC-I bindenden Peptide wurden ca.  $10^{10}$  Tumorzellen der kommerziell erhältlichen Nierenkrebszelllinie RCC A498 (engl.: *renal carcinoma cell line*) gesammelt und mittels Immunaффinitätschromatographie spezifisch aufgereinigt. Das resultierende Probenmaterial wurde von Herrn Dr. Thomas Flad (Abteilung für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie der Universität Tübingen, D) für die weiteren MS-Analysen zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der MHC-Klasse I Antigene mit anschließender Freisetzung der assoziierten Peptide erfolgte wie in der Literatur beschrieben [Flad et al. **1998**; Flad **1998**]. Die Kultivierung der Krebszellen fand ohne Stimulierung mit Interferon-gamma statt.

Eine kurze Skizzierung der Vorgehensweise ist nachfolgend dargestellt:



**Abb. 3-5:** Fließschema zur Isolierung der MHC-I bindenden Peptide

Zunächst wurden die geernteten Tumorzellen mithilfe von Detergentien lysiert, um die auf der Oberfläche befindlichen, fest mit der Zellwand verankerten MHC-Moleküle in Lösung zu bringen und für die nachfolgende Untersuchung zugänglich zu machen. Durch die anschließende Verwendung von monoklonalen Antikörpern (mAk) wurden dann spezifisch HLA-Klasse I Antigene gebunden und durch mehrere Waschschriffe von den anderen Bestandteilen isoliert. Hierbei war es besonders wichtig, auch kleinste Restmengen an Detergentien zu entfernen, die später in der MS-Analyse stören konnten. Die nachfolgende saure Elution der MHC-Peptidkomplexe von den mAk bei pH 2 löste auch gleichzeitig die Assoziation zwischen MHC-Proteinen und gebundenen Peptiden, die durch Ultrafiltration voneinander abgetrennt wurden. Das Filtrat mit den freien Peptiden wurde zum Schluss mit Umkehrphasen-HPLC fraktioniert und als eingefrorene Probe gelagert.

Die eingefrorenen Fraktionen mit je 3 µl Inhalt wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurden jeweils 5 µl 50 % Methanol in Wasser mit 0.1 % Ameisensäure (FA, engl.: *formic acid*) zugegeben und von diesen Ansätzen je 2 µl für die offline Nano-ESI-MS/MS verwendet.

Die MS/MS-Aufnahmen wurden zunächst auf dem *Finnigan LCQ Deca XP* durchgeführt. Hierbei war eine manuelle Auswahl der Vorläuferionen nötig, da die aus der spezifischen Aufarbeitung resultierenden Proben noch immer sehr komplex waren (Gesamtpeptidgehalt: < 1 pmol pro HPLC-Fraktion mit 10 bis 100 Peptidspezies). Durch die manuelle Auswahl konnte eine optimale Geräteeinstellung für die Ionenausbeute und für hinreichend gute Fragmentationenspektren der zuvor im Übersichtspektrum beobachteten Signale erreicht werden.

Des Weiteren wurden auch einige AP-MALDI-Messungen mit der kommerziell erhältlichen Ionenquelle von MassTech (*AP/MALDI 121*) durchgeführt.

Die Auswertung der Spektren geschah hauptsächlich manuell mit *de novo*-Sequenzierung, da eine automatische Datenbanksuche mithilfe von *TurboSEQUENT* nicht erfolgreich war (siehe Kap. 4.2.1.4).

Mit der späteren Verfügbarkeit des *Finnigan LTQ FT* an unserem Institut konnte nun auch eine teilweise Automatisierung des Ablaufs durch die schnellere MS-Datenaufnahme in der linearen Ionenfalle und der nahezu zeitgleichen Erfassung im hochgenauen FT-ICR-Teil des Hybridmassenspektrometers bewerkstelligt werden. Dabei wurden die Vorteile ausgenutzt, die maßgeblich durch die computergestützte datenabhängige MS/MS-Aufnahme (im *Data Dependent*<sup>TM</sup>-Modus, „Dep MS/MS“ Tab. 3-8) und anschließende Auswertung mit der neueren Version von *BioWorks* beigetragen wurden.

Die Identifizierung des Ursprungsproteins erfolgte mit Hilfe des frei zugänglichen Programms *PeptideSearch*, wodurch vorgeschlagene Peptidsequenzen bestätigt oder noch fehlende Teilstückchen ermittelt werden konnten. Die enthaltene Peptidsequenzsuche (Kap. 3.3.3) hatte auf eine nicht redundante Proteindatenbank (Stand vom 28.5.2003) Zugriff. Für die Datenbanksuche mit *PeptideSearch* wurden folgende Standardeinstellungen verwendet:

Proteingröße: 0 – 300 kDa

Organismus: Human

weitere Einstellung: „Isoleucine equals Leucine“ bzw. „Glutamine equals Lysine“

(letzteres nicht bei FTICR-Daten, da K und Q hier unterscheidbar sind)

Im Anschluss wurden die Peptidsequenzen noch mit dem Programm *Syfypeithi* (Kap. 3.3.3) auf passende Bindungsmotive der identifizierten MHC-Peptide für den ausgewählten HLA-Typ untersucht (z.B. HLA-A\*0201 und HLA-B\*08 für RCC A498 [Flad et al. **1998**; Rammensee et al. **1995**; Sutton et al. **1993**]). Mit dem Programm können T-Zell-Epitope vorhergesagt werden, die abhängig von einem berechneten *Score*-Wert (siehe unten) eine bestimmte Wahrscheinlichkeit für die Bindung an MHC-Komplexen besitzen sollen. Die Vorhersage basiert auf den in der Literatur beschriebenen Bindungsmotiven und berücksichtigt somit die Aminosäuren (AA, engl.: *amino acid*) eines möglichen MHC-Peptids, die an bestimmten Ankerpositionen zu finden sind (siehe Abb. 2-6). Eine häufig in der Literatur erwähnte Aminosäure an einer bestimmten Position stellt somit einen idealen Anker für eine Bindung dar.

Bei der Berechnung des *Scores* bekommen die einzelnen AA eines betrachteten Peptids bestimmte Kennwerte zugeordnet. Dabei hängt die Größe dieser Kennwerte davon ab, ob es sich hierbei um ideale (= 10) oder weniger übliche Ankeramino-säuren (= 6 bis 8) an bestimmten Peptidpositionen handelt. Ebenso werden bei der Kalkulation Hilfsanker (= 4 bis 6) und bevorzugte Reste (= 1 bis 4) an anderen Positionen mit einbezogen. Aminosäuren, denen ein negativer Einfluss auf das Bindungsvermögen zugeschrieben wird, erhalten Werte zwischen -1 bis -3. Die Summe der einzelnen Kennwerte ergibt dann den angezeigten *Score*-Wert.

Ab einem *Syfypeithi*-*Score*-Wert von 25\* kann ein vorgeschlagenes Peptid als potentieller Ligand für den jeweiligen HLA-Typ betrachtet werden.

\* (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Stefan Stevanovic)

### 3.3.2 Probenmaterial: Peptide aus unspezifischer Aufreinigung (Säureelution)

Die im vorangegangenen Kapitel geschilderte Immunaффinitätsaufreinigung ist aufgrund der Verwendung von monoklonalen Antikörpern sehr aufwändig. Da hierbei zudem nur eine geringe Ausbeute erreicht wird, sollte ein Verfahren entwickelt werden, womit sich die gesuchten Liganden auf der Zelloberfläche einfacher und gleichzeitig in höherer Ausbeute erfassen lassen.

Als Ausgangsmaterial diente hier die bereits erwähnte Zelllinie A498. Für einen zusätzlichen Vergleich wurde noch eine andere renale Krebszelllinie, die RCC BN30 von der Abteilung Nephrologie der Universität Göttingen, mit derselben Methode untersucht.

Für die unspezifische Aufreinigung wurden die Krebszellen in einem Citrat-Phosphat-Puffer (0.131 M Citronensäure, 0.066 M Natriumphosphat) bei pH 3.0 inkubiert, um die assoziierten Peptide im sauren Medium direkt von den auf der Zelloberfläche befindlichen MHC-Komplexen zu eluieren und in Lösung zu bringen [Storkus et al. **1993**; Frassanito et al. **1995**; Herr et al. **2000**; Clark et al. **2001**]. Danach erfolgte eine Abscheidung von den Zellen durch Zentrifugation. Der gelöste Überstand wurde weiter mit Umkehrphasen-HPLC fraktioniert (C8-Säule, UV-Detektion bei  $\lambda = 220$  nm, Fraktionsintervall: 5 min).

Diese Vorarbeiten wurden an der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Flad durchgeführt, so dass die vorfraktionierten und eingefrorenen Proben für die weitere massenspektrometrische Untersuchung zur Verfügung standen.

Jede erhaltene Fraktion wurde zunächst durch Ultrafiltration mit einer Ausschlussgröße (*Cut Off*) bei 3 kDa von den größeren Peptiden und Proteinen getrennt. Die verwendeten Zentrifugal-Ultrafilter wurden durch Waschen vorkonditioniert:

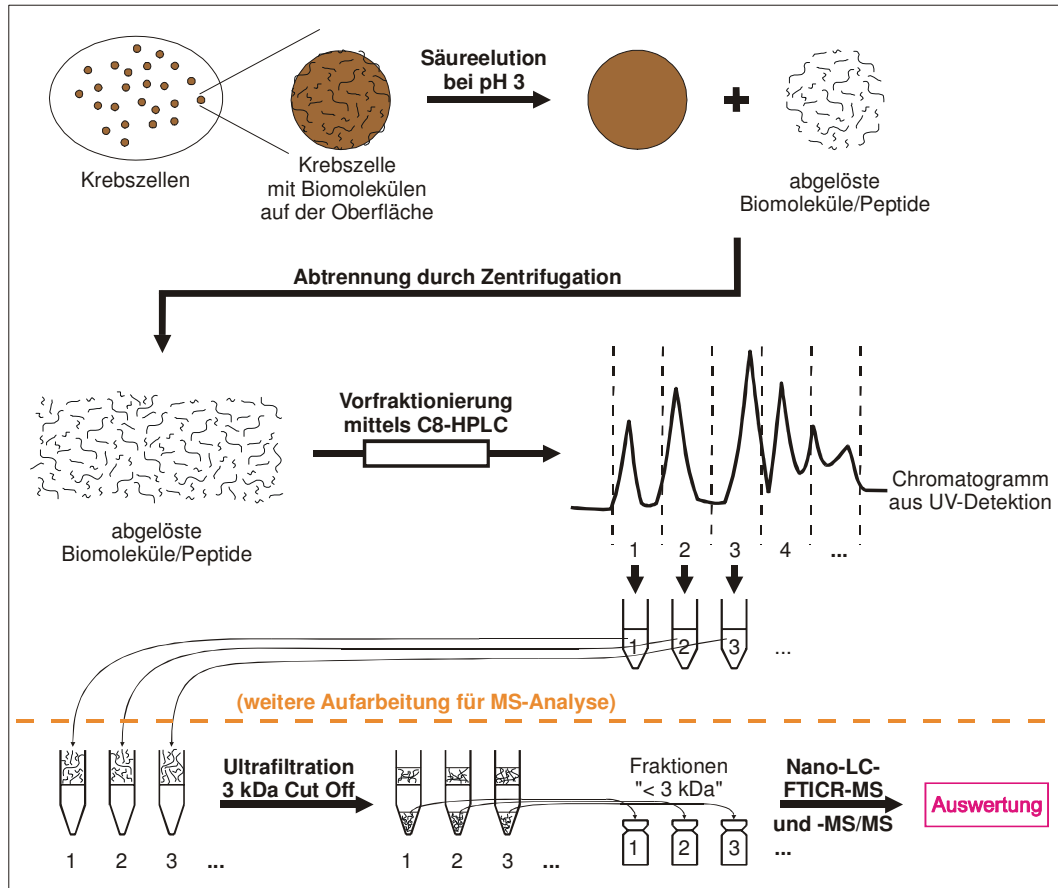
1. je 400  $\mu$ l 0.1 % FA in MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v)
2. je 400  $\mu$ l 0.1 % FA<sub>(aq)</sub>

Anschließend wurden nach Auftauen bei Raumtemperatur jeweils 100  $\mu$ l der erhaltenen Fraktionen zur Ultrafiltration (12000 g, 30 min) verwendet und noch zweimal mit der gleichen Lösung wie aus dem ersten Vorkonditionierungsschritt nachgewaschen. Die resultierenden Filtrate mit den jeweiligen niedermolekularen Anteilen wurden dann vereinigt und wieder auf 50  $\mu$ l eingengt. Später wurden davon jeweils 5  $\mu$ l für jede Analyse mittels HPLC-ESI-MS/MS („Dep MS/MS“ Tab. 3-5) eingesetzt und dreimal vermessen.

In dieser ersten massenspektrometrischen Analyse mit Kapillar-LC-Kopplung (*Summit*-Anlage) an das *LCQ Deca XP* erwiesen sich die Proben noch als zu komplex. Des Weiteren war hier keine Datenvalidierung möglich (Kap. 4.2.2.2).

Daher wurden weitere Untersuchungen am *LTQ FT* durchgeführt, um die hohe Massengenauigkeit für eine Validierung nutzen zu können („Dep MS/MS“ Tab. 3-6 und Tab. 3-7). Die chromatographische Trennung wurde hier mit 3 µl Probenmenge an der Nano-LC (*Ultimate-Anlage*) durchgeführt (ebenfalls Dreifachmessung).

Das nachfolgende Schema veranschaulicht den Ablauf der Methode:



**Abb. 3-6:** Fließschema zur unspezifischen Probenaufarbeitung.

Durch Säureelution bei pH 3 werden Biomoleküle und Peptide von der Oberfläche der Krebszellen abgelöst und anschließend durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt. Danach erfolgt eine Vorfractionierung in 5-min-Schritten mithilfe der Umkehrphasen-HPLC. Nach Ultrafiltration bei 3 kDa werden die resultierenden niedermolekularen Fraktionen mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICRMS/MS vermessen und ausgewertet.

### 3.3.3 Datenbankrecherchen

Für die erste Datenbankrecherche der Peptidsequenzen und zugehörigen Ursursprogsproteine wurde hauptsächlich das Programm *TurboSEQUEST* genutzt. Es beinhaltet einen Suchalgorithmus zur Proteinidentifizierung in Proteingemischen über Fragmentationenspektren und ist Bestandteil des Programmpakets *BioWorks* der Firma Thermo Scientific GmbH (Bremen, D).

Die automatische Datenbanksuche wurde mit den *BioWorks*-Softwareversionen 2.8 bis 3.2 durchgeführt. Insbesondere wurden die *BioWorks*-Versionen 3.1 und 3.2 mit wenig stringenten Parametern (Tab. 3-9) für die Auswertungen der MS- und MS/MS-Daten benutzt.

Die zuletzt verwendete *BioWorks*-Version 3.2 SR 1 beinhaltet gegenüber den Vorgängerversionen folgende für die Arbeit relevante Verbesserungen:

- Berücksichtigung der hochpräzise gemessenen Massen bei der DB-Suche (jedoch nur für Vorläuferionen auch im ppm-Bereich; Fragmentationen bis 0.02 u)
- Verknüpfung zusammengehöriger Datensätze aus unterschiedlichen Messungen für die Ermittlung und Darstellung gemeinsamer Ergebnistreffers (*MultiConsensus*-Funktion), z.B. für verschiedene LC-MS-Läufe einer aliquotierten Probe oder unterschiedlicher Fraktionen gleichen Probenursprungs
- zusätzliche Möglichkeit der Anzeige nur eines Ergebnistreffers bei mehreren identischen Peptidsequenzvorschlägen (*Different Peptides*)
- zusätzlicher wahrscheinlichkeitsbasierter Algorithmus zur Bestimmung der Rate für falsch positiver Peptidtreffer („*Peptide Probability*“)

#### Datenbank für *TurboSEQUEST*

Für die automatische Datenbanksuche durch *TurboSEQUEST* wurde eine indizierte, nicht redundante Proteindatenbank verwendet. Dazu wurde die „nr.fasta“ Datenbank in der aktualisierten Fassung vom 18.06.2005 von der Homepage des National Center for Biotechnology Information NCBI geladen (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/>) und es wurden anschließend mithilfe des Programms *Fasta Database Utilities* von *BioWorks* nur Proteine mit Schlüsselwörtern wie „human“ oder „homo sapiens“ in einer neuen, schließlich verwendeten Datenbank zusammengefasst.

Die folgende Tabelle listet die Einstellungen für die vorgenommenen Datenbanksuchen auf.

Parameter 1 (Version 3.1)	Beschreibung
➤ auf <u>Peptidebene</u>	
Vorläuferionenmasse, Massenfehlertoleranz („Precursor Mass“, „Precursor Ion Tolerance“)	<b>500 – 3500 Da</b> und <b>+/- 0.01 u (FT-MS)</b> bzw. <b>+/- 0.5 u (IT-MS)</b>
Massenfehlertoleranz der Fragmentionen („Fragment Ion Tolerance“)	<b>+/- 0.5 u</b> (Programm berücksichtigte keine besser/kleiner eingegebenen Werte)
Kreuzkorrelation („XC“)	(gibt an, wie gut ein Spektrum zu einem kalkulierten, idealen Spektrum passt) <b>&gt; 0.5</b>
Delta Cn („ΔCn“)	(dient als Maß für die Ähnlichkeit der Ergebnistreffer untereinander) <b>&gt; 0.1</b>
Parameter 2 (Version 3.2)	Beschreibung
➤ auf <u>Peptidebene</u>	
Vorläuferionenmasse, Massenfehlertoleranz („Precursor Mass“, „Precursor Mass Accuracy“)	<b>600 – 3500 Da</b> und <b>+/- 3 ppm (FT-MS)</b> bzw. <b>+/- 0.5 u (für Vergleich mit LCQ Deca XP)</b>
Massenfehlertoleranz der Fragmentionen („Fragment Ion Tolerance“)	<b>+/- 0.02 u * (FT-MS)</b> bzw. <b>+/- 0.5 u (für Vergleich mit LCQ Deca XP)</b> (* Suchalgorithmus unterstützte keine besseren Werte)
verschiedene Peptide („Different Peptides“)	Es werden <b>nur verschiedene Peptidtreffer</b> angezeigt. Bei Duplikaten bzw. mehrfach vorgeschlagenen Treffern wird nur die Peptidsequenz mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (zu einem Protein) berücksichtigt.
Peptidwahrscheinlichkeit („Peptide Probability“)	„Wahrscheinlichkeitswert“ zur Abschätzung der Anzahl an falsch positiven Ergebnistreffern; wird nach statistischen Erwartungswerten berechnet, die sich auf alle Peptidvorschläge im gesamten zu analysierenden Datensatz beziehen. Vorgegebener Schwellenwert: <b><math>10^{-3}</math> = 1:1000</b> (= ein <b>falsch positiver Treffer</b> aus 1000 Vorschlägen)
➤ auf <u>Proteinebene</u> (bei allen <i>BioWorks</i> -Versionen gleich)	
Molekulargewicht	<b>1000 – 300 000 Da</b>

**Tab. 3-9:** (Vor-)Filterparameter für die *TurboSEQUEST*-DB-Suche

### De novo-Sequenzierungsprogramm

Für die Verifizierung der Peptidsequenzen anhand der hochpräzise gemessenen MS- und MS/MS-Daten wurde das Programm *PeptideComposer* in der Version 1.0 verwendet (www.peptidecomposer.com), welches von Prof. Dr. Bernhard Spengler für das kompositionsbasierte *de novo*-Sequenzierungsverfahren CBS (engl.: composition based sequencing) entwickelt wurde.

### Weitere Datenbanken

Für weitere Recherchen zur Identifizierung der Ursprungsproteine der ermittelten Peptidsequenzen wurden Proteindatenbanken (UniProt = Universal Protein Resource [Apweiler et al. **2004**; Bairoch et al. **2005**], SwissProt, TrEMBL = Translated EMBL [Bairoch & Apweiler **1996**]) bzw. DNA-Datenbanken (EMBL = European Molecular Biology Laboratory [Hamm & Cameron **1986**]) genutzt.

Gesucht wurde unter anderem mit dem *Peptide Search Service* (Kap. 3.3.1), welches unter anderem unter

<http://www.mann.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html>

kostenlos verfügbar ist und EMBL-Daten vom European Bioinformatics Institute (EBI) enthält.

Das Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) beherbergt die Server des ExPASy (Expert Protein Analysis System) [Gasteiger et al. **2003**], welche ebenfalls kostenlos Informationen für die Proteomforschung bereitstellen: <http://www.expasy.org>

Hier konnte z.B. die UniProt-Datenbank (zuletzt verwendet im April 2007) für die Ergebnisevaluierung der Resultate aus Kapitel 4.3.1.3 genutzt werden.

Für die Vorhersage der Bindungswahrscheinlichkeit eines identifizierten Peptids an das Bindungsmotiv eines MHC-Komplexes eines bekannten HLA-Typs wurde das frei zugängliche Programm *Syfpethi* (<http://www.syfpeithi.de>) [Rammensee et al. **1999**] benutzt.



---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Charakterisierung von MHC-I bindenden Peptiden stellt aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Ausgangsmenge und der großen Anzahl möglicher Peptide, die in einer Probe auftreten können, eine besondere Herausforderung dar. Die Aufklärung der Primärstrukturen dieser Peptide ist häufig nur mithilfe der Massenspektrometrie und einer nachfolgenden *de novo*-Sequenzanalyse möglich.

Daher wurden zu Beginn dieser Arbeit zunächst einige wichtige instrumentelle Parameter systematisch anhand eines Referenzpeptides untersucht, um optimale massenspektrometrische Bedingungen für die *de novo*-Sequenzierung zu finden.

Außerdem wurden ein klassisches Verfahren auf Basis der Immunaффinitätschromatographie zur Ermittlung von MHC-I bindenden Peptiden aus Proben einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie durchgeführt und die Vor- und Nachteile dieser Vorgehensweise diskutiert.

Anhand dieser Ergebnisse konnten anschließend die Probenaufarbeitungsschritte und Datenanalyseverfahren für eine neue Methode modifiziert und angepasst werden, um eine schnelle und einfachere Durchführung mit validierten Ergebnissen zu erhalten.

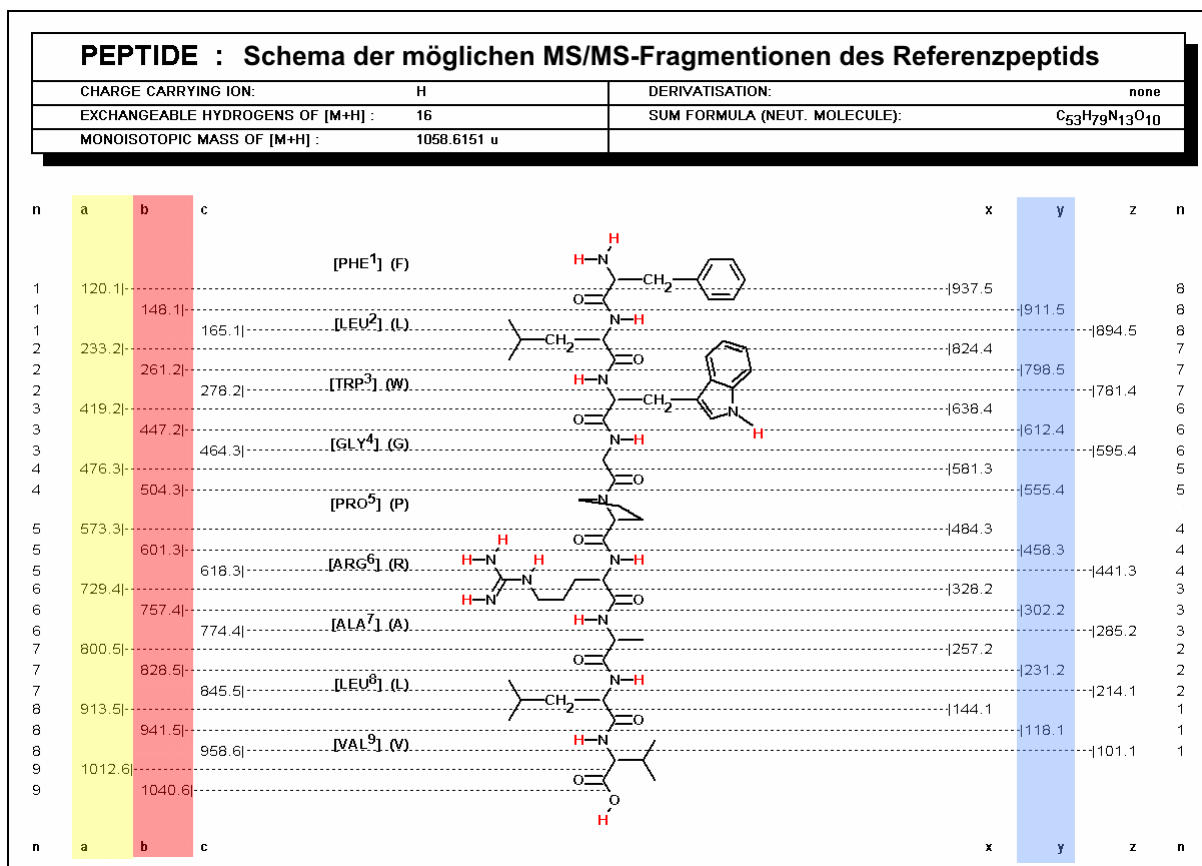
Zur Anwendung auf reale Fragestellungen wurde die neu entwickelte Methode dann für die Untersuchung von zwei Nierenzellkarzinom-Zelllinien und zum Schluss noch einmal an Proben aus der Immunaффinitätschromatographie eingesetzt.

#### 4.1 Vergleich von Parametern für die MS/MS-Aufnahme

Die massenspektrometrische Datenauswertung und Identifizierung der Peptide erfolgt aufgrund der genannten Vorteile (Kap. 2.3) über die Interpretation der Fragmentionenspektren. Daher wurden zunächst für die Aufnahme der MS/MS-Spektren wichtige instrumentelle Parameter untersucht, um optimale Bedingungen für die Analyse zu finden:

- Vergleich von unterschiedlichen Ionisationstechniken und Ladungszuständen,
- Unterschiede bei IT-MS<sup>2</sup> und TOF/TOF-MS,
- MS<sup>n</sup>-Option und verschiedene Kollisionsenergien,
- Massenauflösung und –Genauigkeit.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde ein Referenzpeptid verwendet, welches einem bekannten krebsspezifischen Protein, dem Melanom Antigen 3 (vom engl.: *melanoma antigen-encoding gene 3*, MAGE 3) [Ding et al. 1994; Gaugler et al. 1994; van der Bruggen et al. 1994], entstammt. Dieses Peptid wurde eingesetzt um die erhaltenen Spektren und Ergebnisse direkt miteinander vergleichen zu können.



**Abb. 4-1:** Fragmentierungsschema des MAGE 3-Peptids mit der Sequenz FLWGPRALV aus dem [M+H]<sup>+</sup>-Ion.

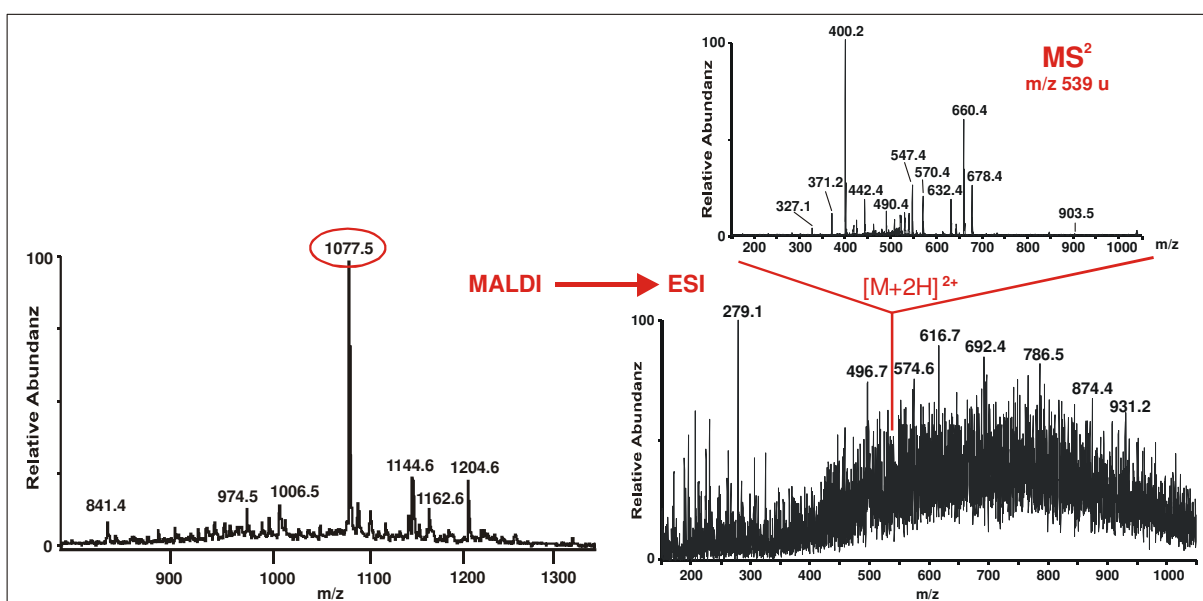
Bei der angegebenen kalkulierten monoisotopischen Masse handelt es sich hier um die des [M+H]-Moleküls und berücksichtigt die Masse eines Elektrons (etwa 0.5 mmu). Die Kleinbuchstaben a, b, c, x, y, z kennzeichnen die jeweiligen Fragmentionentypen, die gestrichelte Linie die Bindungsbruchstelle im Peptid und die dazugehörige, berechnete Fragmentionenmasse. „n“ gibt die Anzahl der übrig gebliebenen Aminosäurereste des jeweiligen Fragmentes wieder, an dem auch die Ladung verbleibt (Schema modifiziert; aus dem Programm *The PSD-MALDI Peptide Sequencer (PepSeq)* Version 7.01 von Frank Lützenkirchen 1998).

#### 4.1.1 Vergleich verschiedener Ionisationstechniken (MALDI, ESI, Ladungszustände)

Die Ionisationstechniken MALDI und ESI gehören zu den so genannten „sanften“ Ionisierungsmethoden, weil sie Biomoleküle fragmentierungsarm in die Gasphase überführen und ionisieren. Beide Techniken finden heute eine breite und dominierende Anwendung in der Massenspektrometrie und Proteomforschung.

Der genaue mechanistische Ablauf der Ionisationsprozesse für beide Techniken ist nicht vollständig geklärt. Anhand experimenteller Beobachtungen gibt es Hinweise, dass die Ionisierung bei MALDI und ESI auf grundlegend verschiedenen Prozessen beruht, wie z.B. Gasphasenreaktionen von Analytmolekülen mit Matrixionen oder Desolvatisierung von Analytmolekülen. Daher scheint es nicht verwunderlich, dass aus derselben zu untersuchenden Probe (z.B. einer HPLC-Fraktion aus der spezifischen MHC-Peptid-aufreinigung) bei Verwendung dieser beiden Ionisationstechniken unterschiedliche Massenspektren resultieren können. Folglich können sich die erhaltenen Datensätze unterscheiden und in der Information ergänzen, d.h. sie sind komplementär.

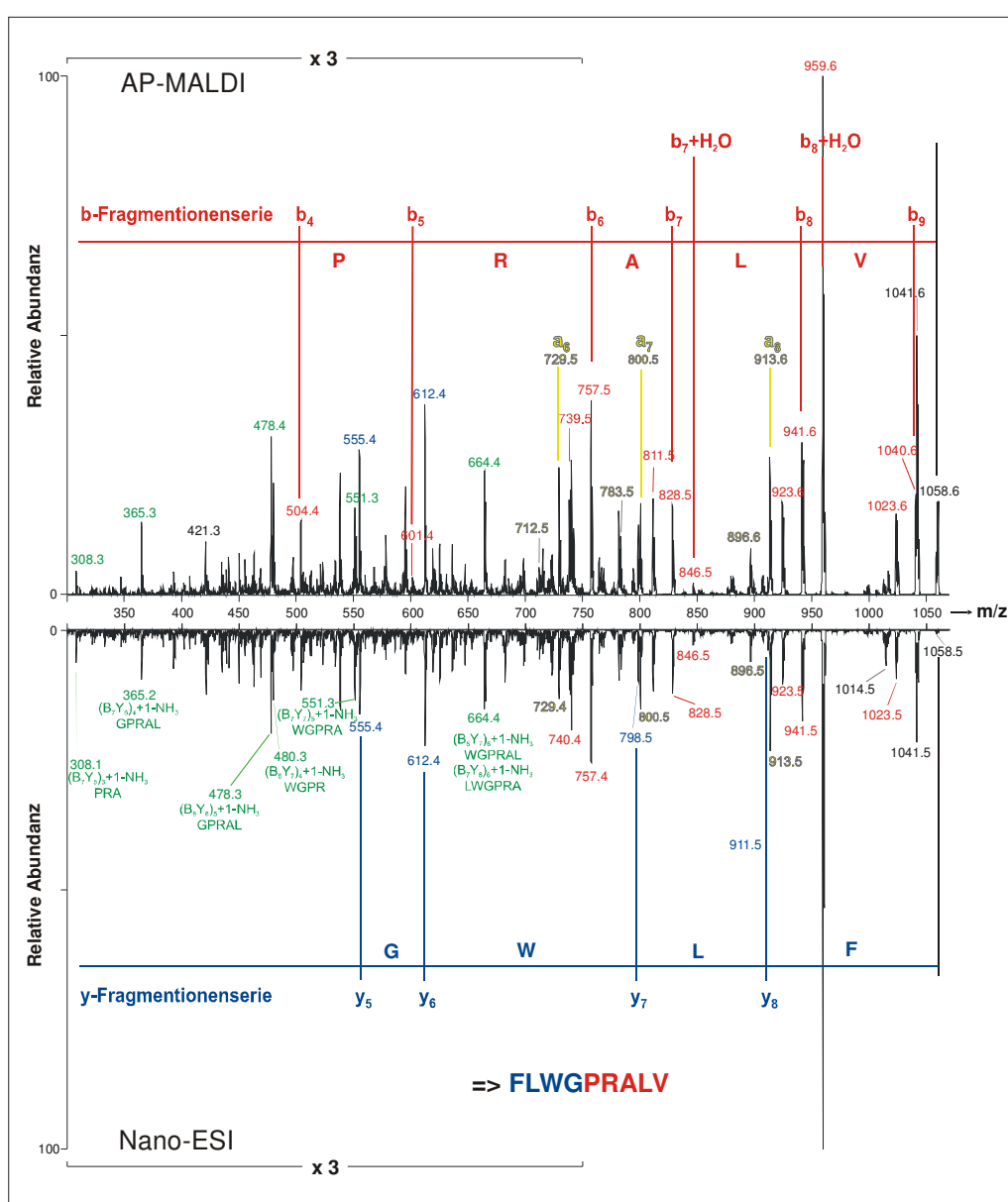
Abb. 4-2 demonstriert die Vorteile bei Verwendung beider Ionisationstechniken. Das MALDI-Massenspektrum links zeigt ein dominierendes Signal bei  $m/z$  1077.5 u, während das ESI-Spektrum von der gleichen Probe unten rechts stark verrauscht ist. Wird nun aufgrund der Kenntnisse aus der MALDI-MS-Aufnahme bei ESI gezielt die doppelt geladene Spezies  $[M+2H]^{2+}$  ( $m/z = 539$  u) isoliert und fragmentiert, so wird im ESI-MS/MS-Modus ein auswertbares Fragmentationsspektrum dieses ausgewählten Vorläuferions erhalten, obwohl das Signal im Vorläuferionenspektrum nicht erkennbar ist.



**Abb. 4-2:** MALDI- (links) bzw. ESI-Übersichtsmassenspektrum (rechts unten) derselben Probe und erfolgreiche ESI-MS/MS-Aufnahme durch gezielte Auswahl des zweifach positiven Vorläuferions (rechts oben). Die MALDI-Messung wurde am *ALADIM II* durchgeführt, die ESI-Messung am *Finnigan LCQ Deca XP*. Das MALDI-Spektrum kann zur Vorauswahl eines interessanten Massenbereichs aus dem stark verrauschten ESI-Spektrum der gleichen HPLC-Fraktion herangezogen werden.

#### 4.1.1.1 Einfach geladene Spezies in der Ionenfalle

In einigen Fällen, abhängig von Struktur und Instrumentenparametern, ist es möglich, sowohl bei MALDI als auch bei ESI gleiche Vorläuferionen von derselben Substanz zu beobachten. In diesen Fällen handelt es sich meist um einfach geladene Ionen, da beim MALDI-Prozess fast ausschließlich  $[M+H]^+$ -Ionen gebildet werden. In Ionenfallen-Massenspektrometern können in den MS/MS-Spektren der einfach geladenen Vorläuferionen, die aus dem MALDI- oder ESI-Ionenbildungsprozess (auch Nano-ESI bzw. NSI) stammen, keine Unterschiede in den Fragmentationenspektren festgestellt werden (Abb. 4-3). Die Ionen fragmentieren hier in gleicher Weise, weil mögliche unterschiedliche Anfangsenergien der Vorläuferionen bei der Fragmentierung in diesem Analyserortyp keine wesentliche Rolle spielen.



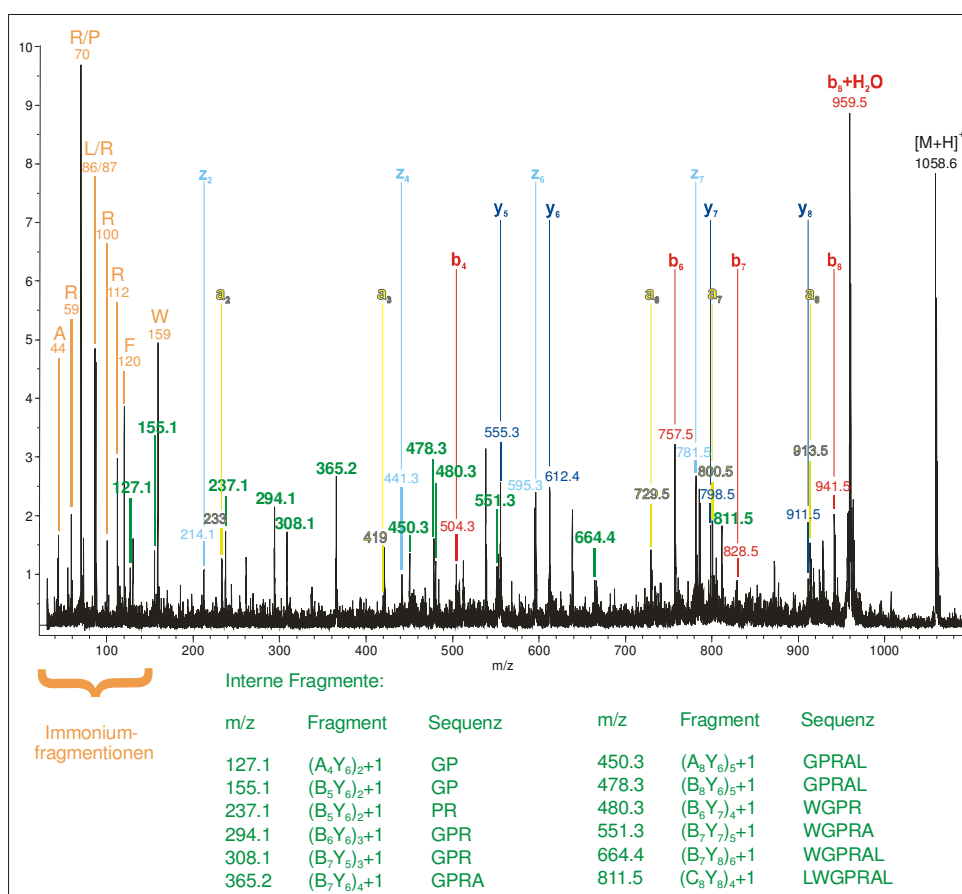
**Abb. 4-3:** MS/MS-Aufnahmen des einfach geladenen Referenzpeptids FLWGPRALV gemessen am LCQ Deca XP (oben: AP-MALDI; unten: Nano-ESI). Rote Zahlen geben die beobachteten Fragmentenmassen der b-Ionen, gelbe die der a-Ionen, blaue die der y-Ionen und grüne die der internen Fragmente wieder (teilweise inklusive Abspaltung oder Addition von Ammoniak bzw. Wasser). Zur Veranschaulichung der aus den MS/MS-Spektren ablesbaren Peptidsequenz sind die komplementären b- und y-Ionenserien eingezeichnet.

In beiden MS/MS-Spektren des Referenzpeptides kann die komplette Sequenzinformation abgelesen werden, wobei eine Massendifferenz von 28 u auf die Abspaltung von CO und somit auf eine a- und b-Fragmentationenserie schließen lässt. Gleichzeitig kann so von der y-Serie unterschieden werden, die die komplementäre Sequenzinformation enthält.

Durch das Auftreten einer Vielzahl interner Fragmente, die aus bereits gebildeten Fragmenten durch weitere Bindungsbrüche entstehen, werden beide Fragmentationenspektren sehr komplex. MS/MS-Spektren von unbekanntem Substanzen lassen sich aufgrund der vielen Fragmentationensignale oft schwer interpretieren.

### Vergleich von IT-MS<sup>2</sup> mit TOF/TOF-MS

Vergleicht man nun die in Abb. 4-3 dargestellten mit der Ionenfalle aufgenommenen Fragmentationenspektren des Referenzpeptides mit dem MALDI-TOF/TOF-Spektrum in Abb. 4-4, so erkennt man zwei wesentliche Unterschiede. In Abb. 4-4 treten im Gegensatz zu den Ionenfallenspektren im unteren Massenbereich Immoniumionen auf, die bei der normalen IT-MS/MS-Aufnahme aufgrund der Stabilitätsbedingungen in der Ionenfalle (Lösungen der Mathieschen Gleichungen) nicht beobachtet werden können. Bei höhermolekularen Verbindungen fehlen deshalb auch niedermolekulare b- und y-Ionen im IT-MS/MS.



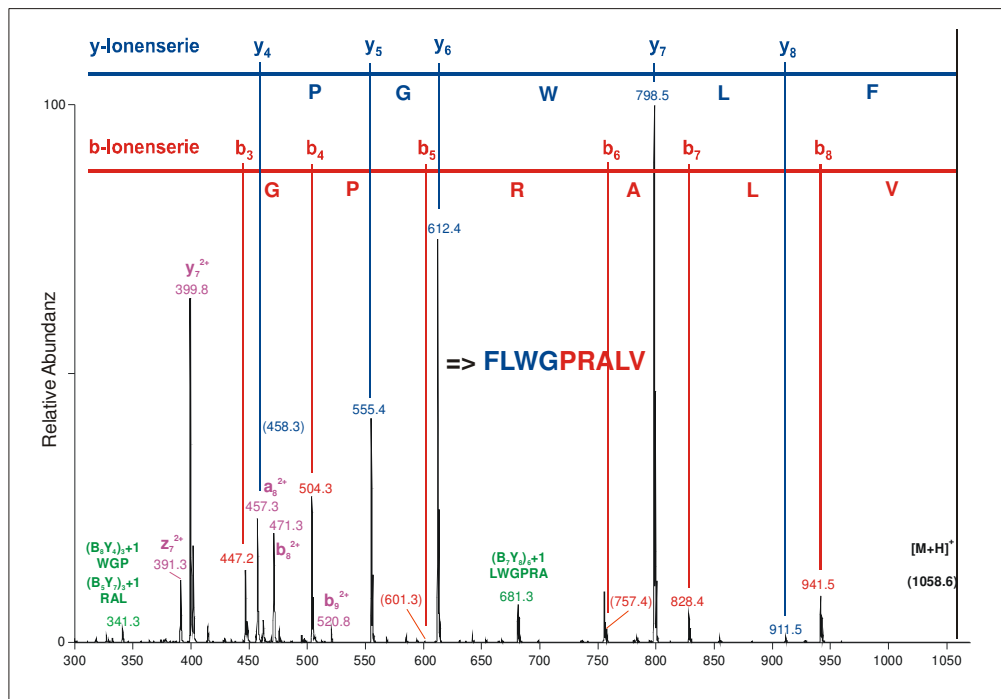
**Abb. 4-4:** MALDI-LIFT-MS<sup>2</sup>-Spektrum vom einfach geladenen MAGE 3-Peptid.

Zusätzlich zu den bereits erwähnten a- (gelb), b- (rot), y- (blau) und internen (grün) Fragmentationen treten bei Hochenergie-Kollisionen im Flugzeitmassenspektrometer einige weitere auf, wie z.B. z-Ionen (hellblau) und Immoniumionen (orange).

Zusätzlich zu den erwähnten Ionensignalen treten bei Hochenergie-Kollisionen wie hier bei der LIFT-Technik im *Ultraflex TOF/TOF* auch noch weitere Ionenserien (z.B. z-Ionen), Fragmentierungen von Seitenketten und viele weitere interne Fragmente auf. Diese können einerseits eine ermittelte Sequenz durch die hohe Informationsabdeckung bestätigen, andererseits eine *de novo*-Sequenzierung aufgrund der Fülle an Ionensignalen verkomplizieren.

#### 4.1.1.2 Zweifach geladene Spezies in der Ionenfalle

Im Gegensatz zu Ionenfallenspektren einfach geladener Ionen sieht ein Fragmentionenspektrum eines zweifach geladenen ESI-Vorläuferions viel übersichtlicher aus (Abb. 4-5). Es kann anhand der bekannten Fragmente die komplette Sequenz abgelesen werden. Ein Nachteil stellt das gleichzeitige Auftreten von einfach und mehrfach geladenen Fragmenten im unteren Massenbereich dar, da es unter Umständen zu Signalüberlagerungen dieser Ladungszustände kommen kann. Zudem werden in der Regel wenige a-Ionen beobachtet, so dass eine Zuordnung des Fragmentionentyps aufgrund unzureichender Unterscheidung von b- oder y-Ionen problematischer als bei MS/MS-Spektren von einfach geladenen Vorläuferionen sein kann. Trotzdem lässt eine MS/MS-Analyse des  $[M+2H]^{2+}$  oftmals eine leichtere Interpretation des Spektrums zu, weil hier viel weniger interne Fragmente entstehen.

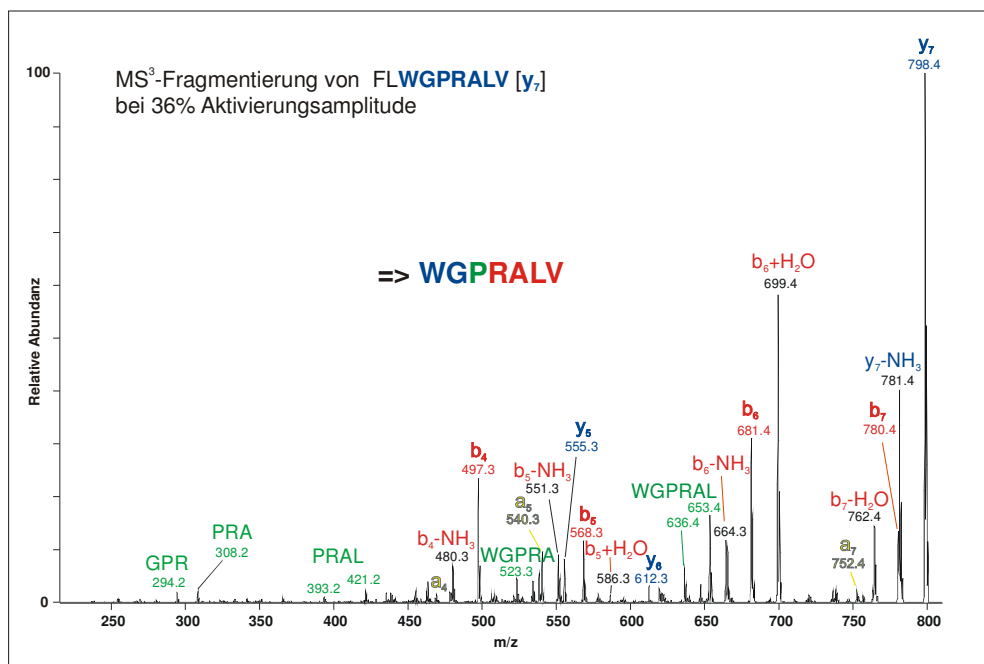


**Abb. 4-5:** Fragmentionenspektrum des zweifach geladenen Referenzpeptids FLWGPRALV aufgenommen mit NSI am *Finnigan LCQ Deca XP* (blau: y-Ionen; rot: b-Ionen; grün: interne Fragmente; rosa: doppelt geladene Fragmentionen). Ein Fragmentionenspektrum aus einem zweifach geladenen Vorläuferion kann die komplette Sequenzinformation aus b- und y-Ionen enthalten und lässt sich aufgrund der geringeren Anzahl an internen Fragmenten einfacher interpretieren als ein MS/MS-Spektrum aus einem einfach geladenen Vorläuferion.

### 4.1.2 MS<sup>n</sup>-Option und Kollisionsenergie

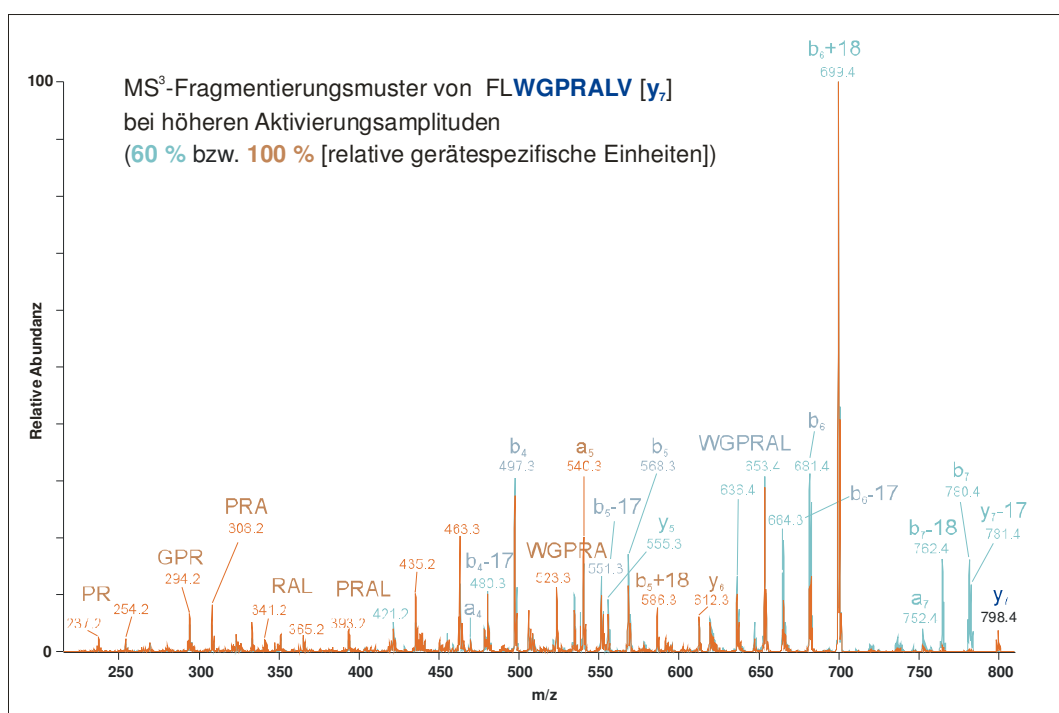
Nur in Ionenfallen-Massenspektrometern besteht die Möglichkeit, ohne zusätzliche Analysatoren Fragmentationenspektren höherer Dimensionen (MS<sup>n</sup>) von nur einem Ausgangsmolekül zu erzeugen. In Ionenfallen können gezielt und sukzessiv Fragmente der zuvor gebildeten Fragmente abhängig von der Ionenausbeute des jeweiligen Vorläuferions produziert und anschließend gemessen werden. Durch diese struktur-abhängigen Fragmentierungen werden noch genauere Aussagen über den Aufbau der untersuchten Substanzen erzielt. Richtige Anwendung der MS<sup>n</sup>-Option kann so zur Ermittlung und Zuordnung benachbarter Aminosäuren (AA, engl.: *amino acid*) oder anderer Strukturen führen.

Im Beispiel des MAGE 3-Peptids mit der Sequenz FLWGPRALV kann durch MS<sup>3</sup>-Analyse ein Fragmentationenspektrum des einfach geladenen  $\gamma_7$ -Ions erzeugt werden (Abb. 4-6), welches dem MS/MS-Spektrum gleicht, das aus dem um zwei AA verkürzten Peptid mit Sequenz WGPRALV gebildet wurde.



**Abb. 4-6:** Fragmentationenspektrum vom  $\gamma_7$ -Ion (MS<sup>3</sup>-Spektrum) des Referenzpeptids gemessen mit NSI am *Finnigan LCQ Deca XP* (blau:  $\gamma$ -Ionen; rot: b-Ionen; gelb: a-Ion; grün: interne Fragmentationen). Mit der MS<sup>3</sup>-Option in Ionenfallen-Massenspektrometern können Strukturinformationen auch von Teilsequenzstücken eines Peptids näher untersucht werden, die vorher im MS/MS-Experiment gezielt ausgewählt und isoliert und für das MS<sup>3</sup> zur Fragmentierung angeregt worden sind.

Ein weiterer Vergleich der Fragmentationenspektren, aufgenommen bei unterschiedlichen Kollisionsenergien, zeigt (Abb. 4-7), dass mit ansteigender Aktivierungsamplitude eine Zunahme kleinerer Fragmentationen auf Kosten der höhermolekularen, intensiveren Ionensignale erfolgt. Die verstärkte Bildung dieser Fragmente beruht auf der Tatsache, dass mit steigender Anregungsenergie mehr Kollisionen in der Zelle stattfinden können, die die weitere Fragmentierung der Fragmentationen fördern. Hierdurch wird jedoch die Komplexität der erhaltenen Spektren gesteigert. Die Interpretation der zusätzlich gebildeten internen Fragmente gestaltet sich bei unbekanntem Verbindungen meist sehr schwierig, so dass dadurch der Informationsgehalt in der Regel nicht erhöht wird.



**Abb. 4-7:** Fragmentationenspektren vom  $y_7$ -Ion des MAGE 3-Peptids FLWGPRALV erzeugt mit unterschiedlichen Aktivierungsamplituden (Kollisionsenergien) am *Finnigan LCQ Deca XP*.

Mit zunehmenden Kollisionsenergien werden verstärkt kleinere Fragmentationen auf Kosten der höhermolekularen gebildet. Die beiden, überlagert dargestellten  $MS^3$ -Spektren resultierten aus der Fragmentierung, die mit einer Aktivierungsamplitude von 60 % (hellblau) bzw. 100 % (orange) erzeugt wurden.

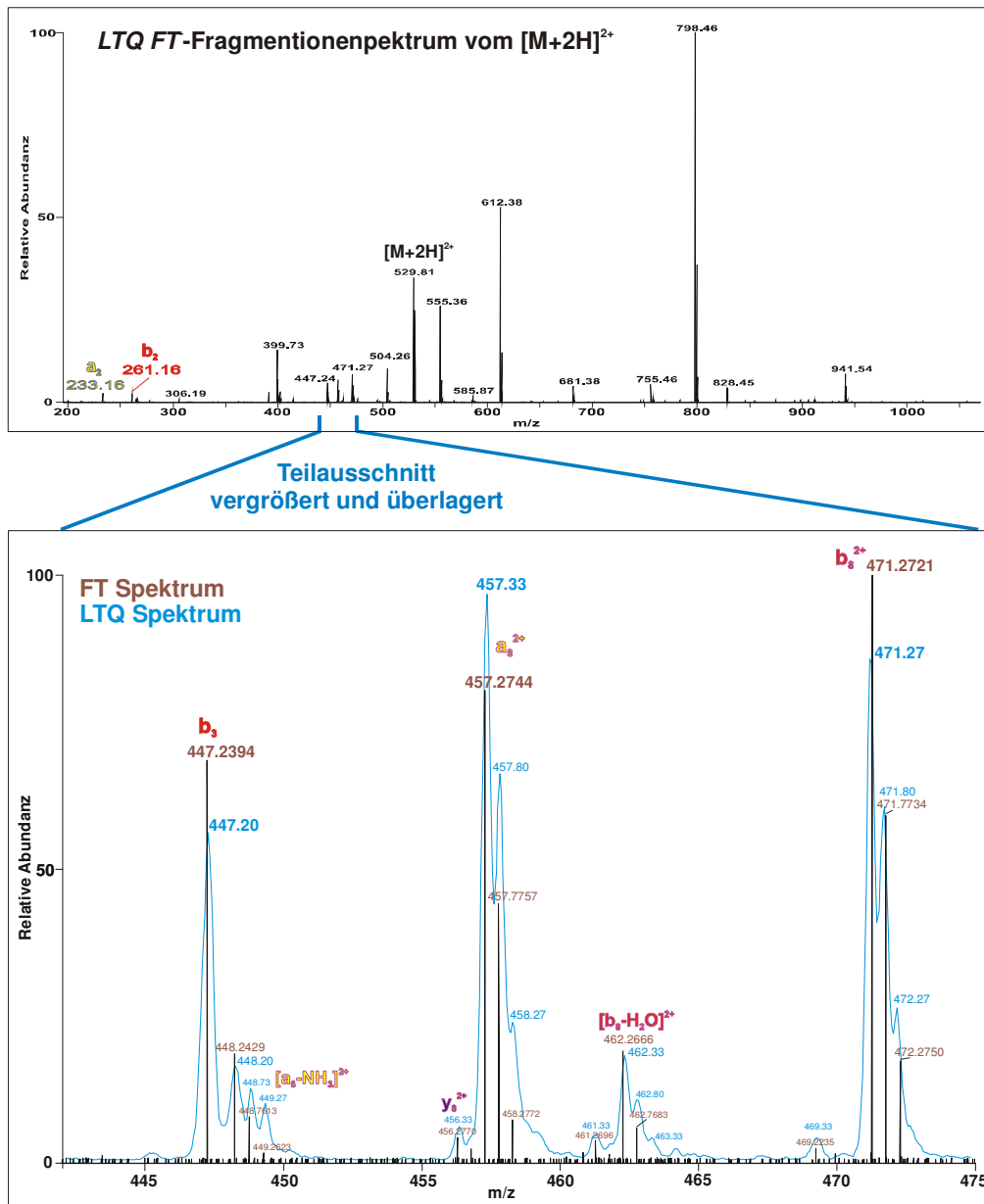
Gute  $MS^n$ -Aufnahmen werden erhalten, wenn die Kollisionsenergie so gewählt wird, dass ein Vorläuferion durch Anlegen einer geeigneten Aktivierungsamplitude im resultierenden Spektrum gerade noch zu sehen ist.

Da diese Optimierung der Aktivierungsamplitude bei jeder Kalibrierung automatisch durch die mitgelieferte MS-Gerätesoftware erfolgt, ist eine manuelle Einstellung des Wertes in der Regel nicht nötig.



### Vorteile des Finnigan LTQ FT

Abb. 4-8 zeigt das Fragmentationenspektrum des zweifach positiv geladenen Referenzpeptids aufgenommen mit dem *Finnigan LTQ FT*. Durch die Verwendung der Linearen Ionenfalle mit der geräumigeren Fallenform wird eine größere Ionenkapazität und damit verbunden eine höhere Empfindlichkeit erreicht (Kap. 2.1.2.3). Dadurch kann die untere Massengrenze gegenüber dem *Finnigan LCQ Deca XP* zusätzlich ausgeweitet werden und es werden auch kleinere Fragmente wie  $a_2$ - bzw.  $b_2$ -Ionen detektiert (Abb. 4-8 oben).



**Abb. 4-8:** Fragmentationenspektrum des doppelt geladenen Referenzpeptids gemessen mit NSI am *Finnigan LTQ FT*. Oben ist der gesamte Massenbereich aus dem MS/MS-Spektrum abgebildet, unten nur ein vergrößerter Teilausschnitt daraus. Zur Veranschaulichung der Unterschiede in der Massenauflösung zwischen LTQ- (hellblau) und FT-Teil (braun) des Hybridmassenspektrometers sind in der unteren Grafik die mit den verschiedenen Analyserarten aufgenommenen Spektren mit dem gleichen Massenbereich überlagert worden.

### 4.1.3 Auflösung und Massengenauigkeit

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Auswertung von Massenspektren ist das Auflösungsvermögen eines Massenspektrometers, damit nahe beieinander liegende Ionensignale unterschieden und richtig zugeordnet werden können.

Zur Verdeutlichung dieser Unterschiede ist der vergrößerte Teilausschnitt des gleichen Massenbereiches, gemessen einmal im *LTO* als auch im *FT-(ICR)-*Analysator des Hybridmassenspektrometers, überlagert worden (Abb. 4-8 unten). Das Auflösungsvermögen bei  $m/z$  450 u liegt hier bei der *Ion Trap* um  $R = 1000$ , bei der FTICR-Technik um  $R = 450000$ , so dass im letzteren Analysatortyp sogar Ladungszustände von Ionen mit hohen  $m/z$ -Werten (hier nicht dargestellt) und in vielen Fällen auch überlagerte Ionensignale anhand der getrennten Isotope unterscheidbar sind.

Die FTICR-Technik des *Finnigan LTO FT* gestattet zudem eine präzise Zuordnung der Massen mit Genauigkeiten von unter 2 ppm, so dass mit der Bestimmung der exakten Massen nur sehr wenige Aminosäuren aufgeklärt werden müssen, um die ganze Zusammensetzung an Aminosäuren (engl.: *amino acid composition*, AAC) in kleineren Peptiden zu bestimmen [Spengler 2004].

Als Beispiel werden Massengenauigkeiten für einige Fragmentionen aus Spektrum Abb. 4-8 berechnet, um die Leistungsfähigkeit dieser Technik zu demonstrieren. Zusätzlich ist die Massenauflösung für das jeweilige Fragmention angegeben, die vom Programm *Xcalibur* aus dem Spektrum mittels Halbwertsbreitenmethode ermittelt wurde:

Fragmention	m/z beobachtet	m/z berechnet	$\Delta(m/z)$ { = $(m/z)_{\text{beob}}$ - $(m/z)_{\text{ber}}$ }	Massengenauigkeit { $\Delta(m/z) / (m/z)_{\text{ber}}$ }	Massenauflösung (von <i>Xcalibur</i> berechnet)
	für monoisotopische Masse				
<b><math>b_3^+</math></b>	447.2394 u	447.2391 u	+ 0.3 mmu	<b>+ 0.7 ppm</b>	<b>447239</b>
<b><math>a_8^{2+}</math></b>	457.2744 u	457.2740 u	+ 0.4 mmu	<b>+ 0.9 ppm</b>	<b>381062</b>
<b><math>b_8^{2+}</math></b>	471.2721 u	471.2715 u	+ 0.6 mmu	<b>+ 1.3 ppm</b>	<b>386289</b>

**Tab. 4-1:** Vergleich der Massengenauigkeit und –auflösung am Beispiel einiger Fragmentionen aus Abb. 4-8

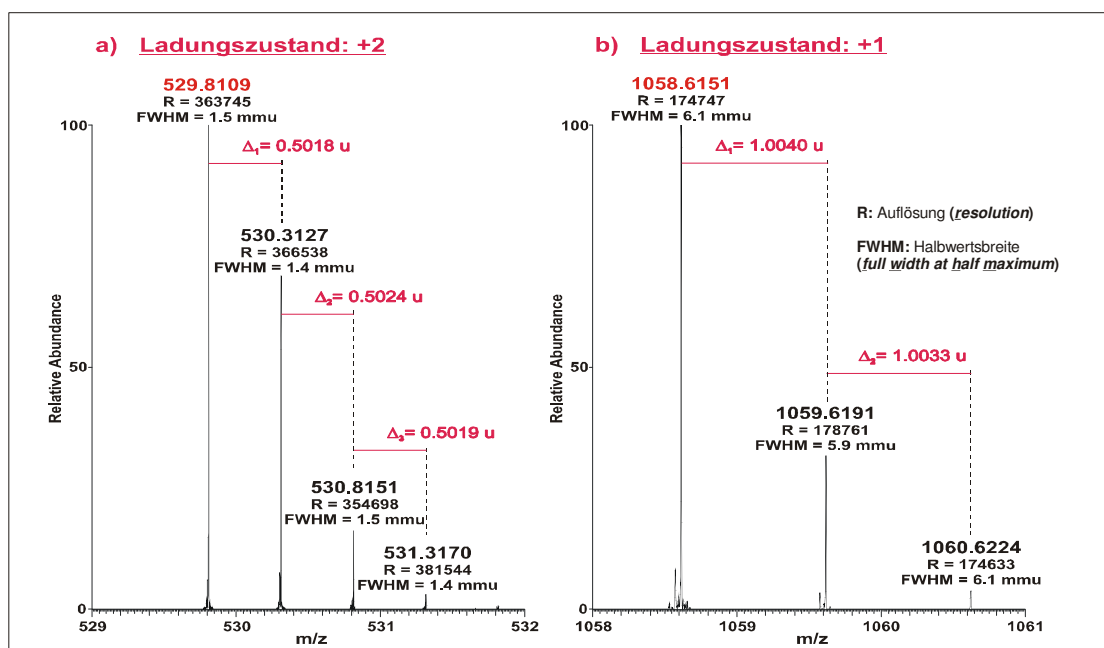
Bei der ESI kommt es zur bevorzugten Ausbildung mehrfach geladener Ionen, abhängig von der Anzahl protonierbarer Positionen in einer Verbindung. Da im Massenspektrometer nicht Massen, sondern Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse  $m/z$  bestimmt werden können, muss für die Ermittlung der Masse noch die Ladungszahl  $z$  anhand des Ladungszustandes der untersuchten Substanz festgestellt werden. Diese Bestimmung wird durch die Auswertung von Isotopenmustern ermöglicht, welche durch chemisch gleiche Verbindungen verursacht werden, die sich aus verschiedenen Isotopen der Atome gleicher Ordnungszahl zusammensetzen. Bei Biomolekülen werden diese Isotopenmuster vorwiegend durch die Kohlenstoffisotope  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  bestimmt, wobei eine Massendifferenz zwischen den Isotopen von  $\Delta m (^{13}\text{C} - ^{12}\text{C}) = 1.00335$  u auf eine Einfachladung deutet (Isotopenmassen wurden bezogen aus <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Compositions/index.html>).

Mehrfach geladene Moleküle besitzen deshalb Isotopenmuster mit kleineren beobachteten

Massendifferenzen  $\Delta(m/z)_{\text{beob}} = \frac{\Delta m(^{13}\text{C} - ^{12}\text{C})}{z}$ , so dass sich hieraus die Ladungszahl mit

$$z = \frac{\Delta m(^{13}\text{C} - ^{12}\text{C})}{\Delta(m/z)_{\text{beob}}} \text{ ermitteln lässt (Abb. 4-9).}$$

Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung des Ladungszustandes besteht in der Bestimmung der Massendifferenzen zwischen den Ionensignalen verschieden geladener, jedoch benachbarter Ionenspezies desselben Analyten.



**Abb. 4-9:** Ausgewählte Bereiche aus dem FT-Massenspektrum des Referenzpeptids gemessen mit NSI am Finnigan LTQ FT. Links ist das doppelt, rechts ist das einfach geladene Quasimolekülion ( $[M+2H]^{2+}$  bzw.  $[M+H]^+$ ) mit ihren typischen Isotopenmustern ausgewählt worden. Zur Verdeutlichung sind einige Kennzahlen wie z.B. die erreichte Massenauflösung und die Massendifferenz zwischen den Isotopen angegeben, die aus dem Massenspektrum ablesbar sind.

Quasimolekülion	m/z beobachtet	m/z berechnet	$\Delta(m/z)$ { = (m/z) <sub>beob</sub> - (m/z) <sub>ber</sub> }	Massengenauigkeit { $\Delta(m/z) / (m/z)_{\text{ber}}$ }	Massenauflösung (von Xcalibur berechnet)
	für monoisotopische Masse				
$[M+2H]^{2+}$	529.8109 u	529.8110 u	- 0.1 mmu	- 0.2 ppm	363745
$[M+H]^+$	1058.6151 u	1058.6146 u	+ 0.5 mmu	+ 0.5 ppm	174747

**Tab. 4-2:** Vergleich der Massengenauigkeit und –auflösung am Beispiel der Quasimolekülionen mit unterschiedlichen Ladungszuständen

Die Benutzung höchstauflösender Massenspektrometer mit hoher Massengenauigkeit ist für die exakte und schnelle Bestimmung unbekannter Moleküle (*de novo*-Sequenzierung) unabdingbar.

Eine nähere Betrachtung zu diesem Aspekt wird in den nachfolgenden Kapiteln anhand der dort erlangten Ergebnisse dargestellt.

#### 4.1.4 Schlussfolgerung aus dem Parametervergleich

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der instrumentellen Parameter zeigen, dass die erhaltenen MS- und MS/MS-Daten maßgeblich von der Ionisierungstechnik und dem verwendeten Analyserortyp und dessen Einstellungsmöglichkeiten abhängen.

- Obwohl sich die resultierenden MS-Datensätze wie z.B. aus der Ionisation mit MALDI und ESI oftmals gut ergänzen, ist eine Ausnutzung aller einstellbaren Parameter aufgrund der meist zu geringen Probenmenge nicht realisierbar.
- Für die Interpretation der beobachteten Fragmentationensignale spielen b- und y-Ionenserien die entscheidende Rolle, so dass die Analyse der MS/MS-Spektren von zweifach geladenen Vorläuferionen deutlich einfacher ist. Hier ergeben sich aufgrund der geringeren zusätzlichen internen Fragmentierungen weniger komplizierte Spektren als bei einfach geladenen Vorläuferionen, wie sie bei MALDI fast ausschließlich gebildet werden. Daher wird in den nachfolgenden Durchführungen vor allem ESI als Ionisationstechnik benutzt.
- Die MS/MS-Analyse mittels Flugzeitmassenspektrometrie hat den Vorteil, dass auch die Aminosäure-spezifischen Immoniumfragmente erfasst werden, die in vielen Fällen bei Ionenfallengeräten nicht beobachtet werden können. Durch hochenergetische Kollisionen in einer separaten Stoßzelle können weitere Sequenzinformationen wie zusätzliche interne Fragmentierungen oder Seitenkettenfragmentierungen erhalten werden, die zur Bestätigung einer bekannten oder bereits ermittelten Peptidsequenz beitragen können. Eine *de novo*-Sequenzierung wird hier jedoch durch die vielen Ionensignale verkompliziert.
- Durch sukzessive MS<sup>n</sup>-Fragmentierung, wie es in Ionenfallengeräten auch ohne zusätzlichen Analysator möglich ist, können zuvor fehlende strukturelevante Informationen ergänzt und benachbarte Aminosäuren bestimmt werden.
- Die Aufnahme von MS/MS-Spektren bei verschiedenen Aktivierungsamplituden bringt keinen Interpretationsnutzen, da mit ansteigender Amplitude vor allem viele kleinere zusätzliche Fragmente gebildet werden, die nicht den bekannten Fragmentationenserien angehören und so nur die Komplexität der Spektren erhöhen. Daher reicht bei jeder LCQ- bzw. LTQ-Kalibrierung der automatisch ermittelte Wert für die Aktivierungsamplitude aus.

Als entscheidendes instrumentelles Kriterium hat sich die höchstaflösende MS bewährt:

- Mit Hilfe eines sehr hohen Auflösungsvermögens können Ladungszustände auch von Ionen großer Masse bestimmt und gleichzeitig nahe beieinander liegende Signale, bei denen der Abstand nur wenige mmu beträgt, unterschieden werden.
- Mit der Bestimmung der exakten Masse müssen nur wenige Aminosäuren (eins bis vier AA) bestimmt werden, um für eine z.B. nonamere Peptidsequenz die vollständige Zusammensetzung an Aminosäuren zu ermitteln.

Da das hochauflösende *Finnigan LTQ FT* zu Beginn der hier beschriebenen Arbeiten noch nicht zur Verfügung stand, wurden die nachfolgenden, massenspektrometrischen Analysen zunächst an der 3D-Ionenfalle *Finnigan LCQ Deca XP* durchgeführt.

## 4.2 Klassische Analyseverfahren zur Bestimmung von Peptiden und Proteinen auf der Oberfläche von Nierenkrebszellen

Für die Bestimmung der MHC-I bindenden Peptide auf Nierenkrebszellen wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

Zum einen sollte ein klassisches Verfahren mit hochspezifischer Probenaufarbeitung, zum anderen ein neuer, unspezifischer Ansatz mit einfacherem und schnellerem Ablauf untersucht werden.

### 4.2.1 Klassische Methode mithilfe IT-MS/MS-Analyse und *de novo*-Sequenzierung (Probenmaterial: MHC-Klasse I Antigene aus spezifischer Aufreinigung)

Zunächst wurden einige der durch Immunaффinitätschromatographie (IAC) aufgereinigten Proben offline mit Nano-Elektrosprayionisation (NSI) oder mit MALDI bei Atmosphärendruck (AP-MALDI) am *Finnigan LCQ Deca XP* vermessen. Die erhaltenen MS- und MS/MS-Aufnahmen wurden anschließend mit Hilfe der *de novo*-Sequenzierung und dem automatischen DB-Suchprogramm *TurboSEQUENT* ausgewertet. Bei den manuell ermittelten Peptidsequenzen erfolgte eine weitere Analyse in Datenbanken, die zur Überprüfung der bestimmten Sequenzen und/oder der Ermittlung von fehlenden Sequenzstücken dienen sollte. Außerdem konnte hierbei das jeweilige Ursprungprotein identifiziert werden. Danach wurden die erarbeiteten Peptidvorschläge mit Hilfe des Programms *Syfeithi* überprüft, ob sie mit der bei der Affinitätsaufarbeitung verwendeten, bekannten Motivstruktur übereinstimmten. Zur Absicherung der ermittelten Peptidsequenzen wurden Referenzpeptide synthetisiert und deren MS/MS-Spektren mit den Originalspektren verglichen.

Im nachfolgenden Kapitel wird an Beispielen von MHC-I bindenden Peptiden die Vorgehensweise für die Primärstrukturanalyse mittels *de novo*-Sequenzierung beschrieben und auf die erhaltenen Ergebnisse eingegangen.

#### 4.2.1.1 De novo-Sequenzierung

Prinzipiell wird bei einer *de novo*-Sequenzierung zuerst geprüft, ob es sich bei dem vorliegenden MS/MS-Spektrum um das eines Peptids handelt. Da die bereits erwähnten Immoniumionen aufgrund der Einschränkung im unteren Massenbereich bei Ionenfallen nicht beobachtet werden (Kap. 4.1.1.1, Vergleich mit TOF/TOF-MS), erfolgt die Überprüfung hier nur durch das Auffinden von Aminosäure-spezifischen Massendifferenzen (Inkrementmassen).

Für die Primärstrukturanalyse wird davon ausgegangen, dass es sich bei den MHC-I bindenden Peptiden im Allgemeinen um eine lineare Peptidstruktur ohne posttranslationale Modifikationen handelt, so dass die Variationsmöglichkeiten bei der Interpretation dieser Peptidspektren wesentlich eingeschränkt werden. Bei dieser Strukturanalyse wird zunächst versucht, eine Sequenz im MS/MS-Spektrum beginnend von der beobachteten Masse des ausgewählten Vorläuferions, der Quasimolekülionmasse  $[M+H]^+$ , zu finden. Dabei kann die Abfolge der Inkrementmassen direkt vom  $[M+H]^+$  aus abgesucht werden ( $\gamma$ -Ionenserie) oder erst nach Abspaltung eines Wassermoleküls ( $b$ -Ionenserie).

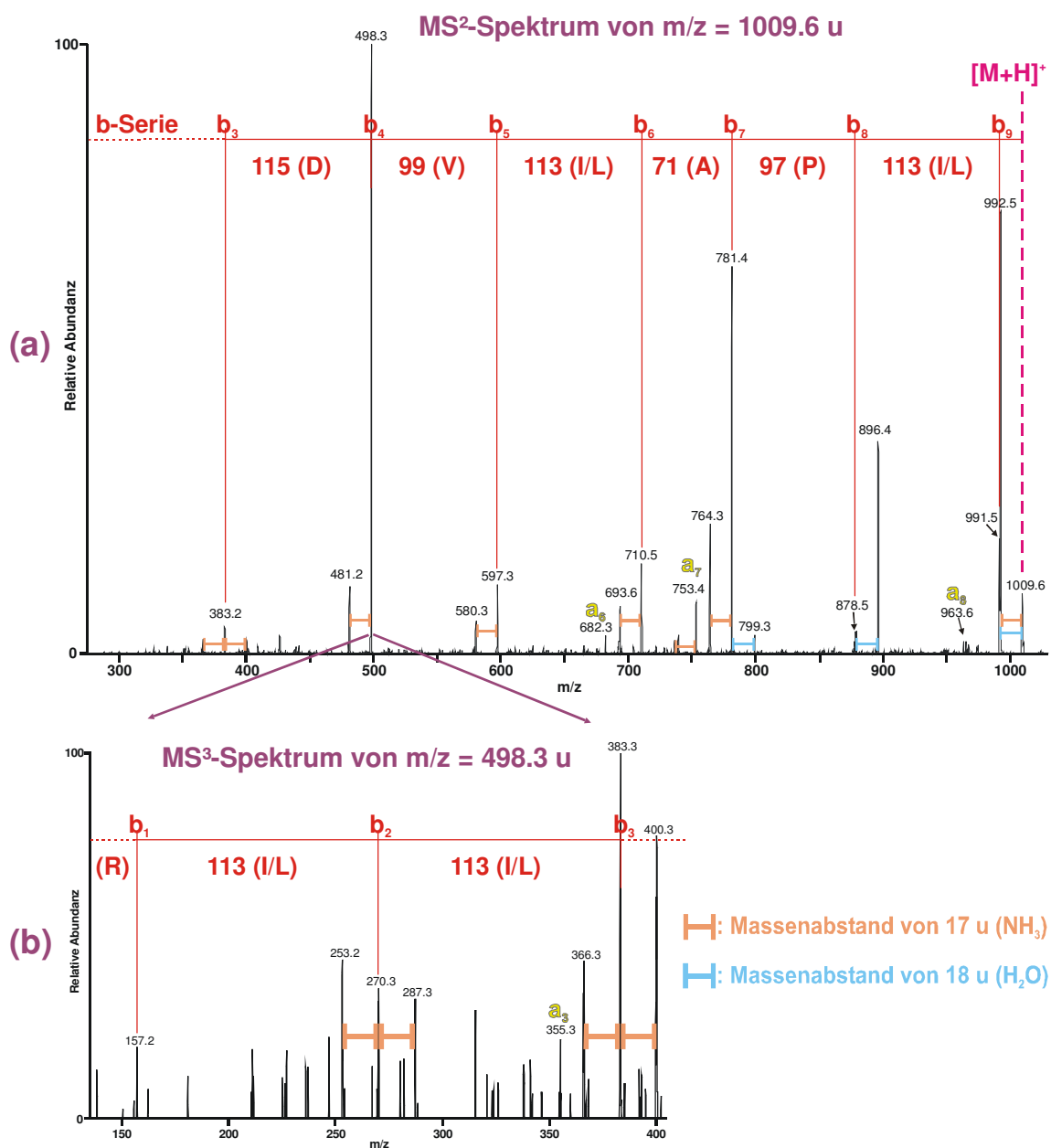
Ein generelles Problem bei der MS-Analyse von Peptidfragmenten ist, dass Leucin (L) und Isoleucin (I) aufgrund ihrer gleichen Summenformel bei niederenergetischer CID massenspektrometrisch nicht unterscheidbar sind.

Eine Differenzierung dieser isobaren (massengleichen) Aminosäuren kann erst durch Hochenergiestöße und dadurch induzierte Seitenkettenfragmentierungen erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit dieses Problem bei der Strukturaufklärung zu lösen, besteht in einem Vergleich mit den Proteinsequenzen aus Protein- oder DNA-Datenbanken.

Das ausgewählte Beispiel in Abb. 4-10 zeigt Fragmentationenspektren aus der Fraktion 31, die in der *LCQ Deca XP*-Ionenfalle nach manueller Vorläuferionenauswahl der Masse mit  $m/z = 1009.6$  u (Spektrum a,  $MS^2$ ) und des dort resultierenden Fragmentes mit  $m/z = 498.3$  u (Spektrum b,  $MS^3$ ) erhalten worden sind.

Im MS/MS-Spektrum (a) fällt zunächst auf, dass neben dem  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 1009.6$  u ein sehr intensives Ionensignal bei der Masse mit  $m/z = 992.5$  u auftritt. Diese Massendifferenz von  $\Delta m = 17$  u lässt sich durch eine Abspaltung von Ammoniak erklären und weist somit auf ein Peptid mit mindestens einer zusätzlichen Aminogruppe an den Seitenketten hin. Diese Beobachtung wird durch die weiteren  $NH_3$ -Abspaltungen im selben Spektrum bekräftigt und lässt den Schluss zu, dass das Peptid eine Aminosäure wie K, N, Q oder R enthält.

Das nächste Fragmentationensignal bei  $m/z = 991.5$  u muss durch Abspaltung eines Wassermoleküls entstanden sein und wird daher als erstes  $b$ -Ion identifiziert. Von dort ausgehend wird das nächste potentielle  $b$ -Ion bei  $m/z = 878.5$  u beobachtet, welches im Abstand eines **Isoleucins bzw. Leucins** (113 u) vorliegt, so dass das benachbarte Signal bei  $m/z = 896.4$  u als „ $b+18$ “-Fragment zugeordnet wird. Das darauf folgende  $b$ -Ion wird im Abstand eines **Prolins** mit 97 u bei  $m/z = 781.4$  u gefunden und wird außerdem durch das Vorhandensein eines  $a$ -Ions im Abstand von 28 u bei  $m/z = 753.4$  u bestätigt. Die benachbarten Signale dieses  $b$ -Ions bei  $m/z = 764.3$  u und  $799.3$  u werden durch Abspaltung eines Ammoniakmoleküls bzw. Anlagerung eines Wassermoleküls erklärt.



**Abb. 4-10:** Fragmentationenspektrum aus Vorläuferion m/z = 1009.6 u (a) in Fraktion 31 und Ausschnitt aus dem MS<sup>3</sup>-Spektrum von m/z = 498.3 u (b); aufgenommen mit AP-MALDI an der 3D-Ionenfalle LCQ Deca XP.

In die Massenspektren sind rot die b-Ionen und die aus den Inkrementmassen abgeleiteten, zugeordneten Aminosäuren eingezeichnet. Außerdem sind einige beobachtete a-Ionen (gelb) und die Massenabstände von 17 u (= Masse von NH<sub>3</sub>; hellorange) und 18 u (= Masse von Wasser; hellblau) eingetragen worden.



Auch die weiteren Signale bei  $m/z = 710.5$  u (zusätzliches a-Ion bei  $682.3$  u),  $597.3$  u,  $498.3$  u und  $383.2$  u werden als potentielle b-Ionen mit ihren „b-17“-Fragmenten ( $m/z = 693.6$  u,  $580.3$  u,  $481.2$  u und  $366.2$  u) zugeordnet, so dass ein **Alanin** (71 u), ein weiteres **Isoleucin oder Leucin**, ein **Valin** (99 u) und eine **Asparaginsäure** (115 u) der gesuchten Sequenz hinzugefügt werden.

Da dem MS/MS-Spektrum nun keine weiteren Sequenzinformationen entnommen werden können, werden die fehlenden Informationen aus dem zusätzlich aufgenommenen MS<sup>3</sup>-Spektrum des hoch abundanten Fragmentationensignals bei  $m/z = 498.3$  u entnommen (Abb. 4-10, b). Dabei wird dem bereits interpretierten b-Ion bei  $m/z = 383.3$  u das zugehörige a-Ion bei  $m/z = 355.3$  u zugeordnet. Mit den Signalen bei  $m/z = 270.3$  u und  $157.2$  u werden die fehlenden b-Ionen ermittelt, so dass zwei weitere **Isoleucine / Leucine** und ein **Arginin** bestimmt werden, die die Peptidsequenz zu R(I/L)(I/L)DV(I/L)AP(I/L) komplettieren.

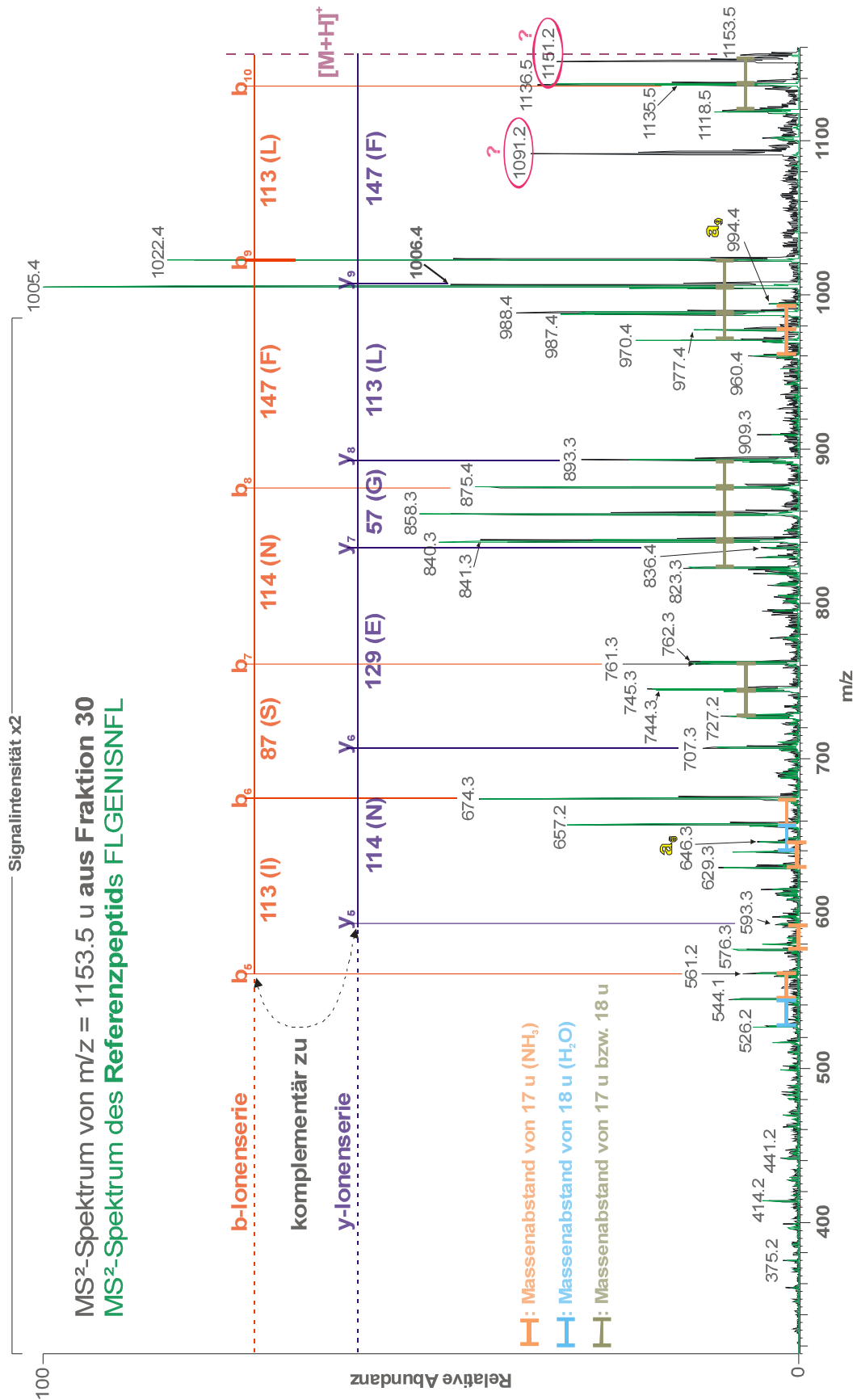
Durch das N-terminale Arginin können schließlich die Ursache für die vielen Ammoniak-Abspaltungen, das bevorzugte Auftreten der b-Ionenserie und das Fehlen der y-Ionenserie erklärt werden, da das ladungsgebende Proton in diesem Fall am basischen Arginin-Rest angelagert wird.

Eine anschließende Suche nach dem Ursprungprotein mit Hilfe des Programms *PeptideSearch* über die Peptidsequenzsuche ergibt nur einen Ergebnistreffer, der die vorgeschlagene Peptidsequenz als Teilsequenz „RLLDVLAPL“ aus der kurzen Isoform der alpha1-Kette des Kollagenproteins Typ XVIII (UniProtKB-Datenbankeintrag: P39060-2; AA-Position: 14-22) identifiziert.

#### 4.2.1.2 Schwierigkeiten bei der de novo-Sequenzierung

Das im vorigen Abschnitt ausgewählte Beispiel war vergleichsweise einfach zu interpretieren, obwohl nur niedrigaufgelöste Ionenfallenspektren zur Verfügung standen. Es werden jedoch in den meisten Fällen wesentlich kompliziertere Fragmentationenspektren erhalten, die die Interpretation erheblich erschweren. Am Beispiel des nächsten MS/MS-Spektrums (Abb. 4-11) aus der Fraktion 30 wird gezeigt, worin einige dieser Schwierigkeiten bei der *de novo*-Sequenzierung aus niedrigaufgelösten Massenspektren liegen können:

- Massenabstände von 17 u bzw. 18 u weisen auf eine zusätzliche Abspaltung oder Anlagerung von Ammoniak bzw. Wasser an einem beobachteten Fragment hin. Dieses kann zu möglichen Verwechslungen bei der Interpretation der resultierenden Inkrementmassen führen (Tab. 4-3).
- Isobare oder massenähnliche Inkremente von AA oder AAC führen bei fehlenden Zwischenfragmenten zu mehrdeutigen Auslegungen (Tab. 4-4).
- Überlagerungen von Fragmentationensignalen erschweren eine eindeutige Zuordnung der Fragmente. Im vorliegenden MS/MS-Spektrum kann z.B. das Ion bei  $m/z = 1006.4$  u als Überlagerung aus dem Signal des zweiten Isotopenpeaks des „ $b_9-NH_3$ “-Ions und dem monoisotopischen Peak des  $y_9$ -Ions interpretiert werden (berechnete Masse bei 1006.47 u bzw. 1006.52 u). Diese Annahme wird durch die ungewöhnlich hohe Intensität dieses betrachteten Isotopenpeaks und durch den MS/MS-Spektrenabgleich mit dem synthetischen Referenzpeptid bestätigt.
- Es können deutlich erkennbare Ionensignale im MS/MS-Spektrum auftreten, die keinem bisher bekannten Fragment eines Sequenzvorschlags zuordenbar sind, weil sie aus unbekanntem internen Fragmentierungsprozessen oder Umlagerungen stammen. (Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im vorliegenden Beispiel die bekannten internen Fragmente nicht eingezeichnet.)
- Es können Überlagerungen von MS/MS-Spektren aufgrund ungenügender Massen-selektivität bei der Auswahl der Vorläuferionen für die Aufnahme der Fragmentationenspektren auftreten. Dadurch können Vorläuferionen gleicher oder sehr ähnlicher Masse durch Kofragmentierungen zu Fehlinterpretationen im resultierenden Fragmentationenspektrum führen. Im vorliegenden Beispiel stammen die prominenten Signale bei  $m/z = 1091.2$  u und  $1151.2$  u nicht vom untersuchten Peptid ab. Sie konnten aber bei der Aufnahme des MS/MS-Spektrums des Vorläuferions mit  $m/z = 1151.3$  u in mehreren benachbarten Fraktionen wiedergefunden werden. Die hier nicht gezeigten Daten dieser MS/MS-Spektren belegen, dass nur drei prominente Fragmentationen bei  $m/z = 1091.1$  u,  $1031.1$  u und  $845.3$  u in den Spektren auftreten (beide letztgenannten Ionen mit relativen Intensitäten  $< 10\%$ ).



**Abb. 4-11:** NSI-MS/MS-Spektrum des Vorläuferions mit m/z = 1153.5 u aus Fraktion 30 (schwarz) überlagert mit dem des synthetischen Referenzpeptids FLGENISNFL (grün), aufgenommen am LCQ Deca XP.

Die aus den Inkrementmassen abgeleiteten, zugeordneten Aminosäuren geben die komplette Peptidsequenz wieder (deutlich erkennbar: die Massen bei m/z = 1091.2 u und 1151.2 u stammen nicht vom ausgewählten Vorläuferion).

In den folgenden Tabellen sind beispielhaft einige berechnete Inkrementmassen angegeben, die bei der Interpretation der Fragmentationsspektren zu Verwechslungen führen können, wenn die Massenauflösung zu gering ist:

AA	Inkrement / u	massenähnliches Inkrement / u	dazugehörige AA inklusive Abspaltung (-) bzw. Anlagerung (+)
P	97.05	97.02	D – H <sub>2</sub> O
		<u>97.02</u>	<u>N – NH<sub>3</sub></u>
<u>L</u>	<u>113.08</u>	113.05	M – H <sub>2</sub> O
<u>N</u>	<u>114.04</u>	114.03	M – NH <sub>3</sub>
D	115.03	<u>115.06</u>	<u>P + H<sub>2</sub>O</u>
<u>E</u>	<u>129.04</u>	<u>129.06</u>	<u>F – H<sub>2</sub>O</u>
M	131.06	<u>131.09</u>	<u>L + H<sub>2</sub>O</u>
<u>F</u>	<u>147.07</u>	147.05	E + H <sub>2</sub> O

**Tab. 4-3:** Mögliche Verwechslung von Inkrementmassen verschiedener AA, die formal aus einer zusätzlichen Abspaltung oder Anlagerung von Wasser bzw. Ammoniak an einem beobachteten Peptidfragment stammen können.

AAC	Isobare AA bzw. AAC (gleiche Elementarzusammensetzung)	Inkrement / u	massenähnliche AA bzw. AAC	Inkrement / u
GG	<u>N</u>	<u>114.04</u>	-	-
AG	Q	128.06	K	128.09
TG	SA	158.07	-	-
<u>LG</u>	VA	<u>170.10</u>	-	-
QG	NA	185.08	GK	185.12
<u>EG</u>	DA	<u>186.06</u>	W bzw. VS	186.08 bzw. 186.10
<u>LS</u>	TV	<u>200.11</u>	CP bzw. AE	200.06 bzw. 200.08

**Tab. 4-4:** Beispiele für isobare AAC- Inkremente, die eine *de novo*-Sequenzierung verkomplizieren, vor allem wenn Zwischenfragmente nicht erfasst werden.

zu Tab. 4-3 und Tab. 4-4:

- Unterstrichen sind die tatsächlich beobachteten Inkremente in den vorliegenden Beispielen.
- Zur übersichtlicheren Darstellung wird hier nur L in den Tabellen angegeben und auf die Schreibweise (l/L) verzichtet.

Diese häufigen Beobachtungen lassen sich mit den standardmäßig verwendeten Massenspektrometern wie z.B. einer Quadrupolionenfalle oft nicht eindeutig lösen. Das Problem liegt hier bei der niedrigen Auflösung und Massengenauigkeit des verwendeten Massenanalysators, so dass die experimentell beobachteten Massensignale in den vorliegenden Spektren mit Abweichungen von bis zu 0.3 u (abhängig von der Gesamtzahl der Ionen und den resultierenden Raumladungseffekten in der Ionenfalle) zur kalkulierten interpretierten Masse berücksichtigt werden müssen. Aus der Tab. 4-3 wird beim Vergleich der massenähnlichen Inkremente ersichtlich, dass solche Fehlinterpretationen wie z.B. bei den Aminosäuren Q und K erst bei einer Differenzierungsmöglichkeit von besser als einer Nachkommastelle vermieden werden. Diese Eigenschaft wird durch die Verwendung von höher auflösenden Massenspektrometern wie z.B. bei FTICR-MS erreicht.

Des Weiteren kann aus vielen MS/MS-Spektren keine eindeutige Sequenzabfolge ermittelt werden, da teilweise wichtige Fragmentationensignale vor allem im unteren Massenbereich fehlen. Für die Interpretation der Fragmentationenspektren ergeben sich daraus Schwierigkeiten durch das Fehlen der Immoniumionen und für den Bereich des N-terminalen Peptidendes, wenn kein komplementäres  $\gamma$ -Ion zugeordnet werden kann. In den meisten Fällen sind aufgrund der zu geringen Signalintensitäten keine zusätzlichen MS<sup>3</sup>-Aufnahmen möglich, so dass einer vorgeschlagenen Sequenz nur Kompositionen aus zwei oder mehr AA mit unbestimmter Reihenfolge zuordenbar sind. Zusätzlich unterscheiden sich in vielen Fällen die in Frage kommenden Kompositionen nicht in ihrer elementaren Zusammensetzung (Tab. 4-4).

Die ermittelten Sequenzen können daher nur durch Abgleich mit Datenbankeinträgen und mit synthetischen Referenzpeptiden eindeutig bestätigt werden. Außerdem bietet sich durch diese Vorgehensweise die Möglichkeit, zuvor nicht interpretierte Fragmentationensignale dem vorgeschlagenen Peptid sicher zuzuordnen.

#### 4.2.1.3 Resultate der Primärstrukturaufklärung von MHC-I bindenden Peptiden nach IAC-Aufreinigung und anschließender IT-MS/MS-Analyse

Wie die massenspektrometrische Analyse des eluierten Peptidpools von RCC A498-Zellen nach Immunaффinitätschromatographie zeigte, war es mit dem analytischen System und der *de novo*-Sequenzierung möglich, die Sequenz einiger MHC-I spezifischer Liganden eindeutig zu identifizieren und über eine Recherche in Proteindatenbanken auch auf die entsprechenden Ursprungsproteine zurückzuführen.

Da es Unterschiede in der Eindeutigkeit der Identifizierung der Peptide gab, wurden sie noch in zwei Identifizierungsgruppen (ID) unterteilt:

Gruppe A: eindeutige Identifizierung nach Strukturvorschlag und Datenbankabgleich (Übereinstimmung auch mit MS/MS-Spektrum des synthetisierten Referenzpeptids)

Gruppe B: keine eindeutige Identifizierung nur anhand des Strukturvorschlages und DB-Suche; eindeutig erst nach Ausschluss möglicher Variationen in den Anfangssequenzen durch Vergleich mit synthetisierten Referenzpeptiden (siehe Beispiel in Abb. 4-12)

Die identifizierten Liganden sind in Tab. 4-5 aufgeführt, wobei zum Vergleich auch das bereits untersuchte Proteinfragment MAGE 3 (AA 271-279) (Kap. 4.1) als typisches Beispiel für ein MHC-I bindendes Peptid angegeben wird.

ID#	[M+H] <sup>+</sup>	Peptidsequenz	HPLC-Fraktion	Syfeithi-Score *1	Ursursungsprotein (AA-Position)	UniProtKB accession
<b>- Beispiel für typisches MHC-I bindendes Peptid</b> (für HLA-A*0201: max. 36)						
-	1058.6	FLWGPRLV <sup>1,2</sup>	-	HLA-A*0201: 27	MAGE-3 antigen, MAGE3 (271-279)	P43357
<b>- Ergebnisse aus Analyse mit IT-MS/MS von RCC A498-Proben</b>						
A1	1009.6	<u>RLLDVLAPL</u> <sup>2†</sup>	31	HLA-A*0201: 29	Isoform Collagen alpha-1(XVIII) chain [Precursor], COL18A1 (14-22)	P39060-2
A2	1153.6	<u>FLGENISNFL</u> <sup>3</sup>	30	HLA-A*0201: 24	Apolipoprotein-L1 [Precursor], APOL1 (257-266)	O14791
B1	834.5	<u>SVASTITGV</u> <sup>4</sup>	15	HLA-A*0201: 23	Adipophilin, ADRP, ADFP (129-137)	Q99541
B2	903.5	<u>GLATDVQTV</u> <sup>2†</sup>	14	HLA-A*0201: 29	Proteasome subunit beta type 3, PSMB3 (55-63)	P49720
B3	913.6	<u>GLLGTLVQL</u> <sup>5</sup>	32	HLA-A*0201: 31	Catenin beta-1, CTNNB1 (400-408)	P35222
B4	954.6	<u>SLLPAIVEL</u> <sup>6</sup>	32	HLA-A*0201: 34	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform, PPP2R1A (403-411)	P30153

**Tab. 4-5:** Beispiel für ein typisches MHC-I bindendes Peptid und Ergebnisse aus der *de novo*-Sequenzierung anhand der LCQ Deca XP-Daten von RCC A498.

- unterstrichen: MS/MS-Spektreninterpretation und Strukturbestätigung durch Abgleich der MS/MS-Spektren der jeweiligen, synthetisch hergestellten Referenzpeptide

- Zahl, fett: hohe MHC-Liganden-Wahrscheinlichkeit mit ermittelten Score-Werten >25 \*2

\*1 (für HLA-B\*08 aufgrund der hier ermittelten durchweg sehr kleinen Score-Werte <20 nicht angegeben)

\*2 (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Stefan Stevanovic)

- Referenzen zu den identifizierten MHC-I bindenden Peptiden laut Syfeithi-Homepage (letzter Stand vom 24.05.2006):

<sup>1</sup> [Zhou et al. 2005]

<sup>2</sup> [Krüger et al. 2005]

<sup>3</sup> [Flad et al. 1998]

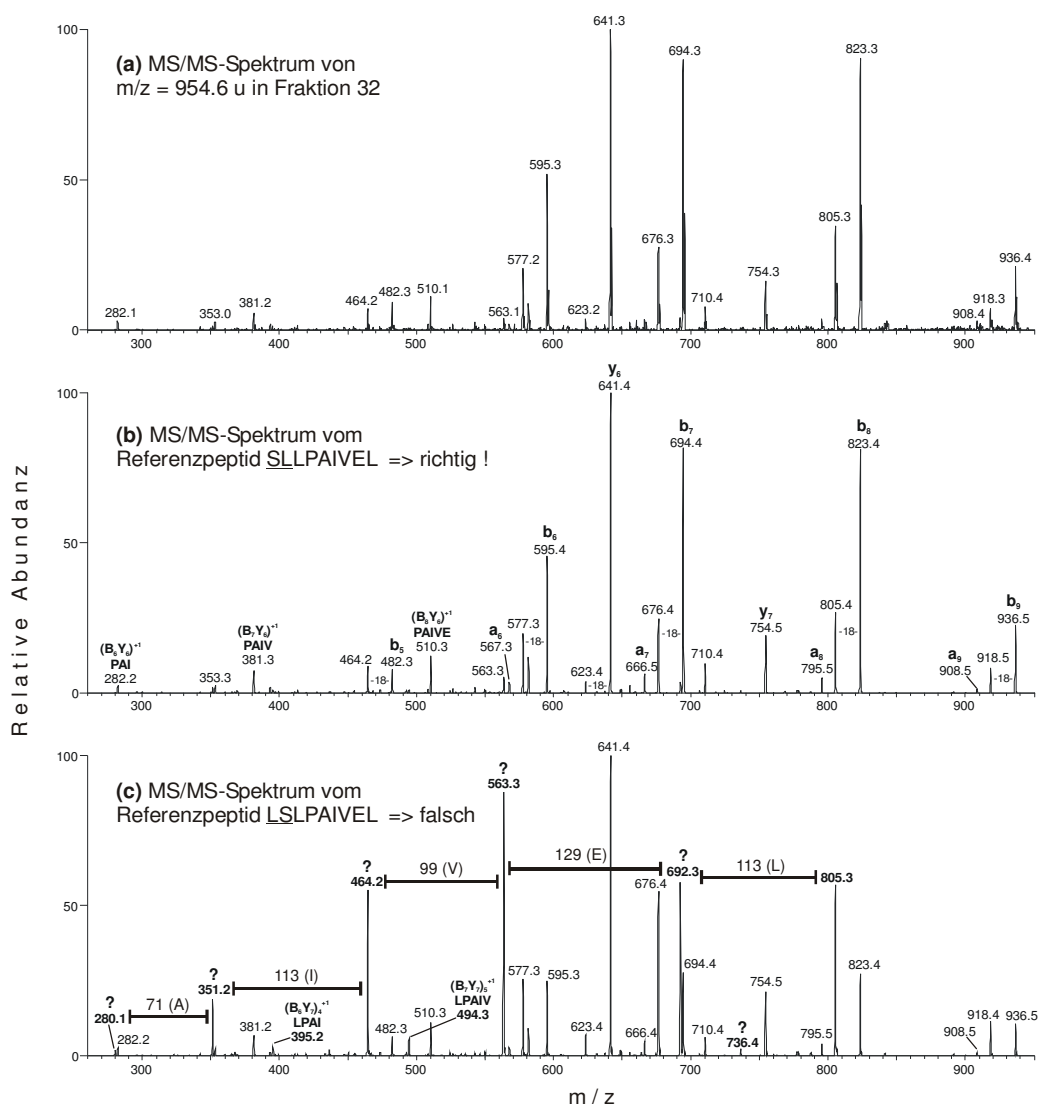
<sup>4</sup> [Weinschenk et al. 2002]

<sup>5</sup> [Barnea et al. 2002]

<sup>6</sup> [Hunt et al. 1992b]

† zwar zitiert, aber nicht im Artikel enthalten

Die Bestimmung der Peptide aus der Identifizierungsgruppe B erwies sich als schwieriger, da Fragmentationensignale fehlten, die die genaue Ermittlung der ersten beiden AA in der Sequenz bestätigen würden (Kap. 4.2.1.2). Obwohl die vorgeschlagenen Sequenzen in Datenbanken zu finden waren, wurden zur Überprüfung Referenzpeptide hergestellt, um die genaue Sequenz der beiden ersten AA dieser MHC-Peptide bestimmen zu können und mögliche Fehler in DB-Einträgen (z.B. durch unbekannte Prozessierungsschritte bzw. Mutationen verursachte Isoformen) auszuschließen. Abb. 4-12 zeigt die MS/MS-Spektren von  $m/z = 954.6$  u aus Fraktion 32 im Vergleich zu den Referenzpeptiden mit invertierter Anfangssequenz. Dieses Beispiel demonstriert, dass ein einfacher Abgleich der Fragmentationmuster schon ausreichend für eine Sequenzbestätigung sein kann.



**Abb. 4-12:** NSI-Ionenfallen-Fragmentationenspektrum des Vorläuferions mit  $m/z = 954.6$  u (a) aus Fraktion 32 und die NSI-IT-MS/MS-Spektren der Referenzpeptide (b) bzw. (c) zur Bestätigung der Sequenz. In den beiden unteren Spektren werden die aus der Sequenz abgeleiteten, zugeordneten Fragmentationen angegeben. Im MS/MS-Spektrum (c) werden Ionensignale beobachtet, die nicht im untersuchten Fragmentationenspektrum aus Fraktion 32 auftauchen. Hier sind zusätzlich die aus den Inkrementmassen abgeleiteten, zugeordneten Aminosäuren eingezeichnet worden.

Die Analyse der spezifisch aufgereinigten RCC A498-Proben war eine große Herausforderung, da die erhaltene Probenmenge aus der IAC sehr gering war. Diese Tatsache spiegelte sich bei einem Großteil der aufgenommenen Massenspektren in den schlechten Signal-Rausch-Verhältnissen wider. In diesen Fällen zeigten die MS/MS-Spektren eine zu geringe Anzahl von Fragmentationensignalen, so dass keine erfolgreiche Interpretation dieser Spektren vorgenommen werden konnte.

Des Weiteren fiel bei der Auswertung der Massenspektren auf, dass bei der Elektrosprayionisation fast ausschließlich einfach geladene Ionenspezies erhalten wurden, was wahrscheinlich auf die kurze Kettenlänge und die Aminosäurezusammensetzung dieser untersuchten Peptidklasse zurückzuführen ist. Diese kleinen, intrazellulär gebildeten Proteinfragmente besitzen in der Regel keine zusätzlichen basischen Gruppen in den Seitenketten, so dass sich keine zusätzlichen Protonen für die Ausbildung eines höheren Ladungszustandes daran anlagern können. Daher wurden hauptsächlich von einfach geladenen Vorläuferionen MS/MS-Spektren aufgenommen, die oft viele interne Fragmente aufweisen und dadurch ihre Interpretation erschweren (siehe Kap. 4.1.1.1).

Trotz dieser Schwierigkeiten konnten letztlich sechs Peptidsequenzen mithilfe der aufgenommenen IT-MS/MS-Daten und *de novo*-Sequenzierung bestimmt, mit synthetisch hergestellten Referenzpeptiden verglichen und eindeutig verifiziert werden. Alle identifizierten Peptide konnten in der Literatur (siehe Fußnote zu Tab. 4-5) als MHC-I bindende Peptide gefunden und bestätigt werden, wobei mehrere davon bereits von uns identifiziert worden waren [Mildred-Scheel-Abschlussbericht **2003**], bevor sie in der Literatur von anderen Gruppen erwähnt wurden.

Eine weitere Bestätigung dieser Ergebnisse konnte mit dem Programm *Syfeithi* durchgeführt werden, welches abhängig vom berechneten *Score*-Wert eine bestimmte Bindungswahrscheinlichkeit für einen ausgewählten HLA-Typ voraussagt. Für das Referenzbeispiel FLWGPRALV beträgt der *Syfeithi-Score*-Wert 27 und stimmt somit gut mit der Aussage überein, dass ab einem Wert von etwa 25 ein vorgeschlagenes Peptid als Ligand für das HLA-A\*0201 in Frage kommt. Die erhaltenen Werte sind jedoch nur als Hilfsmittel zu sehen, da auch kleinere *Score*-Werte nicht zum Ausschluss für ein echtes MHC-Peptid führen müssen. Diese Beobachtung kann auch bei den untersuchten sechs Peptidsequenzen gemacht werden, da ein Drittel der identifizierten Liganden den genannten Mindest-*Score*-Wert nicht erreichen.



Das vorliegende Ergebnis stellt aufgrund der sehr spezifischen Aufarbeitung einen direkten Nachweis von auf HLA-A\*0201 präsentierten Peptidliganden auf RCC A498-Zellen dar. Daher ist jeder der identifizierten Liganden potentiell von Interesse für eine Immuntherapie oder kann als möglicher Kandidat für einen Tumormarker des Nierenkarzinoms gesehen werden (siehe Kap. 2.4). Die identifizierten MHC-I bindenden Peptide können in Gruppen von Ursprungproteinen zugeordnet werden, die entweder eine breite oder sehr spezifische zelluläre Expression zeigen oder bereits als tumorspezifisch gelten.

So wurde unter anderem für die identifizierten HLA-A\*0201 restringierten Peptide RLLDVLAPL und GLATDVQTV gezeigt, dass sie aus der kurzen Isoform der alpha1-Kette des Kollagens Typ XVIII [Saarela et al. **1998**] (AA 14-22) bzw. aus der Proteasom-Untereinheit des Betatyps 3 [Nothwang et al. **1994**; Kristensen et al. **1995**] (AA 55-63) präsentiert werden. Beide Proteine sind im menschlichen Organismus verbreitet, wobei Kollagene zu den extrazellulären Matrixstrukturproteinen [Kjaer **2004**] zählen und Proteasome zelluläre, multikatalytische Proteinasekomplexe sind [Adams **2003**].

Die anderen aufgeklärten Peptidsequenzen stammen von den folgenden Proteinen ab, die bereits als tumorspezifisch gelten oder normalerweise nicht oder nur in geringer Menge in Nierenzellen vorkommen.

#### SVASTITGV aus Adipophilin (ADRP, ADFP; AA 129-137)

Adipophilin, auch bekannt als ADRP bzw. ADFP (engl.: *adipose differentiation-related protein*), wurde zunächst nur spezifisch in Fettzellen vermutet. Es konnte später aber auch auf der Oberfläche von Lipidtropfen in einigen anderen Zelltypen [Heid et al. **1996**; Heid et al. **1998**] wie auch in Nierenzellen oder auch in menschlichen Tumorzelllinien gefunden werden [Rae et al. **2000**]. Adipophilin wird in normalem, gesundem Gewebe nur wenig exprimiert. Jedoch wird es in einigen malignen RCC Proben, wie hier bestätigt, überexprimiert [Rae et al. **2000**; Weinschenk et al. **2002**]. Daher sind sowohl dieses Protein als auch das gefundene MHC-I bindende Peptidstück SVASTITGV interessante Kandidaten für Krebsvakzine [Schmidt et al. **2004**; Wierucky et al. **2006**].

#### FLGENISNFL aus Apolipoprotein L (ApoL; AA 257-266)

Apolipoproteine spielen eine wichtige Rolle beim Lipidmetabolismus und werden insbesondere in der Leber und im Dünndarm produziert, wo auch die Lipoproteine synthetisiert werden. Daneben konnte ApoL noch im Gehirn, in der Lunge, Bauchspeicheldrüse, Prostata, Milz, Plazenta und im vaskulären Endothelium nachgewiesen werden. Die Funktion von ApoL konnte jedoch noch nicht geklärt werden [Duchateau et al. **1997**; Duchateau et al. **2000**], scheint aber in koronaren Arterienerkrankungen eine Rolle zu spielen [Albert et al. **2005**]. Vier Proteine können zu dieser neuen Familiengruppe gezählt werden, wobei es keine Homologie mit bisher bekannten Apolipoproteinen gibt [Duchateau et al. **2001**].

GLLGTLVQL aus Beta-Catenin (CTNNB; AA 400-408)

Catenine (aus dem lat. *catena*: Kette) sind eine Gruppe von Proteinen, die zuerst als Verbindungsproteine zwischen Zelladhäsionsmolekülen und dem Zellcytoskelett bei bestimmten Zell-Zellverbindungen, den Adherens junctions beschrieben wurden. Beim klassischen Cadherin-Catenin-Komplex verbinden Beta-Catenin und Alpha-Catenin ein Cadherin-Molekül mit dem Aktincytoskelett [Takeichi **1991**; Tsukita et al. **1992**]. Neben der Beteiligung an der Zelladhäsion konnte später gezeigt werden, dass Beta-Catenin auch an Signaltransduktionswegen beteiligt ist, durch den die Zellen auf äußere Signale reagieren und ihre Proliferation regulieren können [Hülsken et al. **1994**; Hinck et al. **1994**]. Diese multifunktionale Eigenschaft ist vermutlich auch die Ursache von erhöhten Beta-Catenin-Konzentrationen in bestimmten Tumoren wie z.B. bei hepatozellulären, kolorektalen oder Prostata-Karzinomen [Bläker et al. **1999**; Cheshire et al. **2002**; Chen et al. **2002**; Shibata et al. **2003**].

SLLPAIVEL aus Serin/Threonin-spezifischer Proteinphosphatase 2A (PP2A; AA 403-411)

Proteinphosphatasen sind Enzyme, die die von Kinasen auf ein Protein übertragenen Phosphatreste (hier an den Aminosäureresten Serin und Threonin) entfernen. Die dynamische Regulation dieser Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist eine wichtige Komponente bei der Signaltransduktion z.B. im Metabolismus oder bei der Muskelkontraktibilität. Die betroffenen Enzyme oder Transkriptionsfaktoren werden hierbei in ihrer Aktivität moduliert [Cohen **1989**; Hemmings et al. **1990**; Hunter **1995**]. Untersuchungen an verschiedenen Tumor- und Normalzellen gaben Hinweise darauf, dass das PP2A die Zellbeweglichkeit einschränken und so die Invasion der Tumorzellen beeinflussen kann [Young et al. **2001a**; Young et al. **2002**].

#### 4.2.1.4 Automatische Datenbank-Suche (spezifisch aufgereinigte A498-Proben)

Im vorangegangenen Abschnitt wurde verdeutlicht, dass eine Primärstrukturanalyse von MHC-I bindenden Peptiden mittels *de novo*-Sequenzierung viel Zeit und Erfahrung erfordert.

Aus diesem Grund wurden dieselben massenspektrometrischen Daten auch für eine automatische Datenbanksuche mittels *TurboSEQUENT* verwendet, was zunächst eine hohe Geschwindigkeit bei der Identifizierung von Peptiden und Proteinen auch aus hoch komplexen Proben verspricht. Da für die hier untersuchten MS-Daten weder das spaltende Enzym noch die Größe des Ursprungsproteins bekannt ist und bei der automatischen DB-Suche nur die übliche Fehlertoleranz bei Ionenfallengeräten von 0.5 u angegeben werden kann, wurden vom DB-Suchprogramm eine Vielzahl an Peptidsequenzen für ein gegebenes MS/MS-Spektrum vorgeschlagen.

Die Identifizierung der Peptide erwies sich danach als sehr schwierig, da die Vorschläge maßgeblich von den gewählten Filterparametern abhängen. Trotz systematischer Variation verschiedenster Parameter war es kaum möglich, eines der bereits zuvor mit *de novo*-Sequenzierung identifizierten und später verifizierten Peptide zuverlässig in den Bestenlisten wiederzufinden. Es resultierten stark fehlerbehaftete Aufstellungen von Ergebnistreffern, die höchstens als Kandidatenlisten mit fragwürdiger Aussage betrachtet werden können (Daten nicht gezeigt).

Ein Grund für das erfolglose Abschneiden der automatischen DB-Suche liegt in den bereits erwähnten schlechten Signal-Rausch-Verhältnissen und den fehlenden Fragmentationssignalen in den Massenspektren (Kap. 4.2.1.3).

Des Weiteren ist die Proteinsequenzabdeckung als häufig angewendetes Filterkriterium nicht sinnvoll. Es handelt sich bei den gesuchten MHC-I bindenden Antigenen meist nicht um mehrere Peptide aus nur einem bzw. wenigen Ursprungsproteinen. Im Gegenteil wird eine große Zahl an verschiedenen MHC-I bindenden Peptiden aus der Gesamtheit der gebildeten Proteine einer Zelle durch das Proteasom produziert und als MHC-I-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert (Kap. 2.4). Folglich können nur die repräsentativen bzw. in ausreichend großer Stückzahl vorkommenden MHC-I bindenden Peptide mit der Methode erfasst werden.

Weitere Ergebnisse zu den durchgeführten automatischen DB-Suchen und Lösungen für die angesprochenen Schwierigkeiten werden in den nachfolgenden Kapiteln 4.2.2.2 und 4.3 aufgezeigt und besprochen.

#### 4.2.2 Vereinfachte Probenaufarbeitung von Peptiden aus unspezifischer Aufreinigung mittels Säureelution und Größenausschluss

Die im vorangegangenen Kapitel (3.3.2) geschilderte Aufreinigung mittels IAC ist sehr aufwändig. Zum einen müssen die benötigten Antikörper erst in ausreichender Menge (mg-Bereich) hergestellt oder kommerziell bezogen werden, zum anderen ist die mehrstufige Aufreinigung arbeitsintensiv und die resultierende Ausbeute gering.

Daher wurde versucht, den aufwändigen Schritt mit der Immunaффinitätschromatographie zu umgehen und die MHC-Peptide nur durch einfache saure Elution von der Zelloberfläche zu erhalten [Storkus et al. **1993**; Clark et al. **2001**]. Ziel dieser Probenaufreinigungsmethode war es,

- auf die Verwendung monoklonaler Antikörper zu verzichten,
- dadurch die arbeitsintensiven Aufarbeitungsschritte und damit zusammenhängenden Verluste zu reduzieren,
- eine viel größere Probenmenge für die anschließende Analyse zu erhalten und somit auch die Anzahl der zu erwartenden Peptide zu erhöhen
- und durch zusätzlich identifizierte Ursprungproteine eine weitere Charakterisierung der Krebszellen zu ermöglichen.

##### 4.2.2.1 Weitere Vorteile der vereinfachten Probenaufarbeitung

###### Mehr Probenausgangsmaterial macht Mehrfachanalyse mit online-Kopplung möglich

Durch die Vereinfachung der Probenaufarbeitung wird eine größere Analysenmenge für die nachfolgenden Untersuchungen erreicht. So konnte ein deutlich erkennbarer Rückstand nach Lösemittelentzug in den Mikroreaktionsgefäßen der HPLC-vorfraktionierten Proben beobachtet werden, der bei den mit IAC-aufgereinigten Proben nicht festzustellen war. Aufgrund der sehr geringen Ausgangsmenge bei den letztgenannten Proben wurden diese zum damaligen Zeitpunkt nur offline mittels NSI oder MALDI in das Massenspektrometer gebracht und analysiert. Für eine direkte online-Kopplung von HPLC mit ESI-MS war zu wenig Material vorhanden, welches nach nur einem LC/MS-Lauf aufgebraucht gewesen wäre. Durch die größere Analytmenge bestand nun die Möglichkeit der Kopplung einer Kapillar-HPLC mit der ESI-MS und schneller, automatischer MS-Datengenerierung. Der wesentliche Vorteil liegt darin, dass bei dieser Hochdurchsatzmethode auch die zunächst im ersten HPLC-Lauf nicht erfassten Peptide durch weitere Injektionen der zuvor aliquotierten Menge (Mehrfachanalyse) aufgedeckt oder bereits registrierte Kandidaten bestätigt werden können. Hierzu wurden die untersuchten Fraktionen jeweils dreimal mittels Kapillar-HPLC/ESI-IT-MS/MS vermessen.

### Reduzierung der Komplexität

MHC-I bindende Peptide besitzen aufgrund ihrer (zumeist) nonameren Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht zwischen rund 800 u und 1200 u. Daher ist es sinnvoll, Peptide und Proteine mit einem höheren Molekulargewicht vor der eigentlichen Analyse aus den Fraktionen zu entfernen. Dazu wurden Ultrafilter mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa verwendet. Wegen des nun fehlenden hochmolekularen Anteils in der Probe können außerdem weniger Moleküle koeluieren und es werden dadurch Effekte wie Signalunterdrückung bzw. auch Überlagerung von Signalen verschiedener, simultan erfasster Ionen, vor allem jener mit höheren Ladungszuständen, minimiert.

So wird eine Reduzierung der Fülle und Komplexität der generierten Daten erreicht und mehr Zeit und Aufmerksamkeit für die Datenakquisition der interessierenden Peptide gewonnen.

#### 4.2.2.2 Automatische DB-Suche (unspezifisch aufgereinigte A498-Proben)

Aus der Datenbank-Suche mit *TurboSEQUENT* (Parameter 1 in Tab. 3-9) resultierte eine hohe Anzahl an Ergebnistreffern (> 500 Kandidaten bei redundanten\* Einträgen), die aus den aufgenommenen Fragmentationsspektren für jede Messreihe (etwa 250 einzelne bzw. 150 - 200 gemittelte, aufsummierte MS/MS-Spektren) ermittelt worden sind.

Diese großen Ergebnislisten stellen auch hier bei genauerer Betrachtung einen fragwürdigen Inhalt dar. Anhand manueller Überprüfung einiger Peptidkandidaten mithilfe der *de novo*-Sequenzierung konnten nur wenige vorgeschlagene Peptidsequenzen und somit zugehörige Proteine bestätigt werden. Etwa zwei Drittel der jeweils 20 bestgelisteten Kandidaten einiger Messreihen stimmten nicht mit den zugeordneten MS/MS-Spektren überein oder konnten nicht eindeutig bestätigt werden. Diese Beobachtungen deuten daher auf eine generell hohe Rate an falsch positiven Ergebnistreffern bei solchen automatischen, wahrscheinlichkeitsbasierten Datenanalysen hin, die zudem wesentlich von den eingestellten, benutzerdefinierten Parametern abhängen und damit die Interpretationsvariabilität stark beeinflussen (s.u. und Kap. 5).

Selbst relativ stark verrauschte Massenspektren führen wie schon bei den spezifisch aufgereinigten Proben beobachtet (Kap. 4.2.1.4) zu Ergebnistreffern, die die Zuordnung der vorgeschlagenen Peptidsequenzen bereits bei einfacher Sichtung in Frage stellt.

\* Redundante Einträge entstehen hier z.B. durch MS/MS-Spektren des gleichen Vorläuferions, die nicht gemeinsam gemittelt und damit als verschiedene Fragmentationsspektren gewertet worden sind.

Im Anhang 6.1 sind die Top 20-Kandidatenlisten für die drei Messreihen der Fraktion 5 aufgeführt. Nicht bestätigte Kandidaten werden durchgestrichen dargestellt. Da die bestätigten Proteine erst durch die verbesserte Datenauswertemethode in Kapitel 4.3 verifiziert wurden und dort besprochen werden, wird hier auf eine nähere Betrachtung der identifizierten Peptide und deren Ursprungsproteine verzichtet.

Kritische Punkte bei der Erstellung der Ergebnistrefferverlisten sind die eingestellten Suchparameter, die von den bekannten Eckdaten des Experiments abhängen und z.B. die typischen Eigenschaften des verwendeten Massenanalysators (Massengenauigkeit bzw. Massenfehlertoleranz bei der DB-Suche), des schneidenden Enzyms (Spaltungsstelle, erwartete Peptidgröße) oder des Ursprungsproteins (Molekulargewicht) berücksichtigen.

Zusätzlich können für weitere Eingrenzungen der erhaltenen Kandidatenlisten spezielle Filterparameter (z.B. Delta Cn) benutzt werden, die aber in der Regel zu voneinander abweichende Bestenlisten führen. Ursache hierfür ist, dass jede gewählte Einstellung, d.h. ein vom Anwender definierter Schwellenwert zu einem Parameter, zu einem jeweils neu kalkulierten *Score*-Wert für jeden innerhalb der Filtergrenzen möglichen Kandidaten führt. Somit entsteht abhängig vom gewählten Sortierungskriterium eine neue Rangfolge (*Ranking*) für die Vorschläge, wobei ein hoher *Score*-Wert eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Übereinstimmung und somit angenommene Richtigkeit eines vorgeschlagenen Treffers bedeutet. Die Kalkulationen für den *Score*-Wert berücksichtigen jedoch nur Vergleichswerte wie z.B. der Übereinstimmungsgrad (Kreuzkorrelation) der bekannten Fragmentationensignale theoretisch zu erwartender b- oder y-Ionen des jeweiligen Peptidvorschlages zu den beobachteten Massensignalen. Die Trennleistung zwischen richtigen und falschen Treffern ist dabei abhängig von dem jeweiligen Datensatz und nicht absolut begründet.

Erst durch verschiedene zeitintensive, empirische und benutzerspezifische Einstellungen im Suchprogramm können die falschen Kandidaten, so genannte falsch positive Treffer, minimiert werden [Elias et al. 2005]. Durch zu stringente Parameter werden jedoch auch zunehmend richtige Ergebnisse herausgefiltert, die zu falsch negativen Ergebnissen führen. Daher ist bei komplexen Proben ohne vorherige aufwändige experimentelle Optimierung eine manuelle zeitintensive Überprüfung der vorgeschlagenen, automatisch erstellten Ergebnisse nötig, um scheinbar richtige Kandidaten zu bestätigen oder falsche zu entlarven.

Wie im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, ist eine wirkliche Kontrollmöglichkeit zur Verifizierung dieser Ergebnisse aus den aufgenommenen MS-Daten jedoch nicht ohne aufwändige Synthetisierung der sequenzidentischen Referenzpeptide möglich. Bei den herkömmlich benutzten Standardverfahren zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen in komplexen Proben werden noch vorwiegend niedriger auflösende Massenspektrometer verwendet, die keine hohe Massengenauigkeit bieten.

Ihr Einsatz scheint aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse nur für wenige analytische Fragestellungen ausreichend vertrauenswürdig zu sein. Vor allem wenn z.B. viele wesentliche, wie oben beschriebene Einschränkungskriterien aus dem Experiment bekannt sind und somit die zu erwartende Kandidatenliste von vornherein stark vereinfacht ist, zeigt eine solche DB-Suche Erfolg bei der Bestimmung der Peptidsequenzen. Zudem müssen die eingesetzten Suchalgorithmen oftmals erst für solche Untersuchungen empirisch optimiert werden. Die automatisch durchgeführten DB-Suchen werden jedoch, wie in der Literatur häufig zu finden, unkritisch und mit (meist vom Programm vordefinierten) Standardeinstellungen eingesetzt. Ihre Ergebnisse werden von den meisten Anwendern nicht hinterfragt, sondern als wahr angenommen, wenn sie von einer vermeintlich leistungsfähigen kommerziellen Software geliefert werden. Ein Umdenken dieser Praxis ist unerlässlich für überprüfbare, validierte Ergebnisse und wird erst jetzt durch die kürzlich vorgestellten Leitfäden für die mithilfe der Massenspektrometrie erzielten Proteinidentifizierungen [Taylor & Goodlet 2005; Wilkins et al. 2006] verdeutlicht (siehe Ausblick in Kap. 5).

#### 4.2.3 Schlussfolgerung für die Peptididentifizierung mittels IT-MS/MS-Analyse

Mithilfe der klassischen Methode konnten aus den untersuchten RCC A498-Proben sechs MHC-I bindende Peptide mittels *de novo*-Sequenzierung ihrer Fragmentationsspektren identifiziert werden, die durch Abgleich mit den synthetisch hergestellten, sequenzidentischen Referenzpeptiden verifiziert wurden. Vier dieser Peptide stammen dabei von Ursursungsproteinen ab, die entweder schon als tumorspezifisch gelten oder von denen bekannt ist, dass sie nicht oder nur wenig in gesunden Nierenzellen exprimiert werden.

Aufgrund der sehr spezifischen Aufreinigung der Ausgangsproben mithilfe der Immunitätschromatographie konnte sichergestellt werden, dass bei der anschließenden MS-Analyse fast ausschließlich MHC-I bindende Peptide in den HPLC-Fractionen erfasst und untersucht wurden.

Bei ihrer Analyse fiel auf, dass auch bei der ESI-Massenspektrometrie dieser Substanzklasse vorwiegend einfach geladene Molekülonen erhalten werden. Diese Beobachtung kann auf die strukturelle Beschaffenheit der untersuchten Substanzen zurückgeführt werden, da MHC-I bindende Peptide typischerweise aus nur neun Aminosäuren bestehen und aus diesem Grund eine geringe Wahrscheinlichkeit für die Bildung mehrfach geladener Ionen besitzen.

Die meisten MS/MS-Spektren waren sehr komplex und führten nur teilweise und unter großem Zeitaufwand (1-2 Wochen pro Peptidanalyse) zu den entsprechenden Peptidsequenzen. Eine ebenfalls durchgeführte automatische Datenbanksuche blieb hier erfolglos, da sich nur große Ergebnistreffervereinigungen mit fragwürdigem, nicht verifizierbarem Inhalt ergaben. Die Auswertung der Spektren wurde vor allem auch durch die schlechten Signal-Rausch-Verhältnisse aufgrund der erhaltenen sehr geringen Peptidmenge (Kap. 4.2.1.3) und durch die mehrdeutigen Interpretationsmöglichkeiten der beobachteten Ionensignale in den Fragmentationenspektren (Kap. 4.2.1.2) erschwert.

Die Erkenntnisse aus der klassischen Methode für die Identifizierung von MHC-I bindenden Peptiden werden abschließend in Tab. 4-6 zusammengefasst.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sehr spezifische Aufarbeitung liefert fast ausschließlich MHC-I bindende Peptide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sehr aufwändige Probenaufarbeitung liefert wenig Probenmaterial (z.B. kaum Mehrfachanalyse möglich)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Verwendung einfacher Ionenfallen-Massenspektrometer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Lange Auswertezeiten aufgrund sehr komplexer Proben und Massenspektren: große Erfahrung bei der <i>de novo</i>-Sequenzierung der MS/MS-Spektren erforderlich</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hohe falsch positive Ergebnistrefferrate bei automatischer DB-Suche</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Keine Verifizierungsmöglichkeit anhand bestehender MS- und MS/MS-Daten</li> </ul>

**Tab. 4-6:** Vor- und Nachteile der klassischen Methode mit Immunaffinitätschromatographie (IAC)

Durch die neue Probenaufarbeitung der renalen Humankarzinomzelllinie mittels Säureelution und Ultrafiltration konnten die aufwändigen Schritte bei gleichzeitig erhöhter Ausbeute minimiert und die untersuchten Proben für eine automatisierte Mehrfachanalyse durch HPLC/ESI-MS zugänglich gemacht werden (Kap. 4.2.2.1). Für die Auswertung muss allerdings beachtet werden, dass aufgrund der fehlenden Spezifität nicht nur MHC bindende Peptide, sondern alle Biomoleküle erfasst werden können, die von der Zelloberfläche durch den verwendeten Säurepuffer eluiert werden. Durch den zusätzlichen Größenausschluss bei 3 kDa konnte aber der zu untersuchende Massenbereich auf die niedermolekularen Fraktionen eingeschränkt werden, so dass die Komplexität der Probe erheblich reduziert und mehr Zeit für die Datenaufnahme der interessierenden Peptide gewonnen wurde. Bei der anschließenden Analyse der unspezifisch aufgereinigten Proben wurde aufgrund der resultierenden großen MS- und MS/MS-Datenmenge eine automatische Datenbanksuche durchgeführt. Die meisten der daraus erhaltenen Ergebnisse konnten jedoch bei genauerer Überprüfung der Fragmentationenspektren zu den zugeordneten Peptidsequenzen nicht bestätigt werden. Ihre Anzahl in den Top 20-Kandidatenlisten lag bei etwa zwei Drittel falsch positiver Treffer (Kap. 4.2.2.2).



Beide Ansätze zu den Untersuchungen der RCC A498-Proben lieferten keine zufriedenstellenden Resultate für die durchgeführten automatischen DB-Suchen mit *TurboSEQUEST*. In den meisten Fällen wurden durch das verwendete DB-Suchprogramm mehrere Peptidsequenzen für ein und dasselbe MS/MS-Spektrum vorgeschlagen, so dass eine stark fehlerbehaftete Aufstellung von Ergebnistreffern resultierte. Als Hauptgründe dafür können Fehlzusammenordnungen, verursacht durch die gerätebedingten, relativ großzügig gewählten Massenfehlertoleranzen von 0.5 u bei der DB-Suche, und die relativ stark verrauschten Massenspektren genannt werden.

Die anschließende Bestimmung der Rangfolge der vorgeschlagenen Kandidaten in den Ergebnislisten mussten durch verschiedene einzelne benutzer- und experimentspezifische Parameter definiert werden, die jedoch keine Validierung der Ergebnisse anhand der Daten zuließ.

Die wesentliche Schwachstelle der herkömmlichen Auswertemethode liegt folglich im Fehlen einer wirklichen Kontrollmöglichkeit zur Verifizierung der vorgeschlagenen Ergebnisse aus den massenspektrometrischen Daten.

Wie bereits in Kapitel 4.1.3 dargestellt wurde, besitzen hochauflösende Massenspektrometer wie das FTICR-MS-Gerät eine hervorragende Massengenauigkeit und Massenauflösung. Vor allem die hohe Massengenauigkeit stellt ein wichtiges Kriterium für die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse dar, weil die Anzahl der möglichen Elementarzusammensetzungen für eine ermittelte Masse sehr stark eingeschränkt werden kann. Da durch eine automatische DB-Suche auch große Datensätze schnell bearbeitet werden können, soll im nachfolgenden Kapitel auf die Verknüpfung von hoher Massengenauigkeit und computergestützter Datenbankanalyse eingegangen werden, die letztlich zu der neu entwickelten Methode mit verifizierbaren Ergebnissen geführt hat.

### 4.3 Neue validierte Methoden für die massenspektrometrische Proteomanalytik mithilfe hochpräzise gemessener MS- und MS/MS-Daten

Die Resultate, die sich aus dem Vergleich der instrumentellen Parameter und aus den sehr zeitintensiven manuellen Spektreninterpretationen ergaben, lassen den Schluss zu, dass bei Nutzung hoher Massenauflösung und -Genauigkeit eine deutliche Verbesserung der Spektrenauswertung mit eindeutigen Identifizierungen erreicht werden kann.

Daher wurden die unspezifisch aufgereinigten RCC A498-Proben nochmals mithilfe des Hybridmassenspektrometers *Finnigan LTQ FT* untersucht und die erhaltenen hochpräzisen MS- und MS/MS-Daten für die anschließende Auswertung benutzt. Die Strukturaufklärung der Peptide wurde dabei durch ein neu entwickeltes *de novo*-Sequenzierungsverfahren unterstützt, welches auf kombinatorischen Kalkulationen der hochgenau gemessenen Massen von Vorläufer- bzw. Fragmentationen und ihren daraus errechenbaren möglichen Zusammensetzungen aus berücksichtigten Aminosäuren basiert [Spengler 2004].

Zur Absicherung der Ergebnisse aus der neuen Methode wurde eine weitere RCC-Zelllinie (BN30) auf gleiche Weise unspezifisch mittels Säureelution und Größenausschluss aufgearbeitet und mithilfe der Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICRMS/MS und der neuen Datenvalidierungstechnik analysiert.

Am Ende des Kapitels werden die Ergebnisse zusammengefasst und diskutiert.

### 4.3.1 Validierte Ergebnisse aus den unspezifisch aufgereinigten RCC-Proben mithilfe von verifizierbaren FTICR-MS- und FTICR-MS/MS-Daten

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten zeigen, dass das klassische Standardverfahren zur Identifizierung von Peptiden bzw. Proteinen viel Zeit und Erfahrung erfordert. Auch die erhaltenen Resultate aus der automatischen DB-Suche erweisen sich nach genauerer Überprüfung als sehr fragwürdig und fehlerbehaftet, da keine wirkliche Ergebnisvalidierung anhand der Daten möglich ist. Die Interpretation der erhaltenen Massenspektren der komplexen Proben bleibt schwierig, da hierbei das 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer *Finnigan LCQ Deca XP* verwendet wurde, welches eine Massengenauigkeit von lediglich etwa 0.3 u besitzt.

Auf der anderen Seite stellen hochpräzise gemessene Peptidmassen ein wesentliches Kriterium für eine Vereinfachung der Strukturaufklärung dar, weil allein dadurch die Anzahl der in Frage kommenden Kandidaten erheblich eingeschränkt werden kann. Nach Einführung des neuen *Finnigan LTQ FT* an unserem Institut wurden die unspezifisch aufgereinigten RCC-Proben daher erneut analysiert, so dass nun erstmals auch akkurat gemessene Massen (Genauigkeiten im ppm-Bereich) für die Auswertung zur Verfügung standen.

Im folgenden Abschnitt wird genauer auf die neue Validierungsmethode eingegangen, die für die Auswertung der vermessenen RCC-Proben angewendet wurde [Thieu et al. **2006**].

#### 4.3.1.1 Vorgehensweise bei der Datenverifizierung und Ergebnisvalidierung

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte neue Methode basiert auf der Aufnahme von hochpräzise gemessenen MS- und MS/MS-Daten, die für eine Verifizierbarkeit der Ergebnisse erforderlich ist und mit FTICR-Massenspektrometern erreicht werden kann. Anschließend werden mit diesen Daten Kandidatenlisten automatisch mithilfe des DB-Suchprogramms *TurboSEQUENT* erstellt (Parameter 1 in Tab. 3-9).

Im Anschluss werden die vorgeschlagenen Peptidsequenzen dann anhand der akkurat gemessenen MS- und MS/MS-Daten verifiziert (Beispiel in Abb. 4-13), da in der Regel für Massenfehlertoleranzen im unteren ppm-Bereich nur noch sehr wenige Kombinationen von möglichen Aminosäuren existieren [Zubarev et al. **1996**; Lehmann et al. **2000**; Schlosser & Lehmann **2002**]. Grundlage für diesen Verifizierungsansatz war ein neu entwickeltes *de novo*-Sequenzierungsverfahren, das als „kompositionsbasierte Sequenzierung, CBS“ (engl.: *composition based sequencing*) [Spengler **2004**] eingeführt wurde und im Programm *PeptideComposer* Anwendung findet.

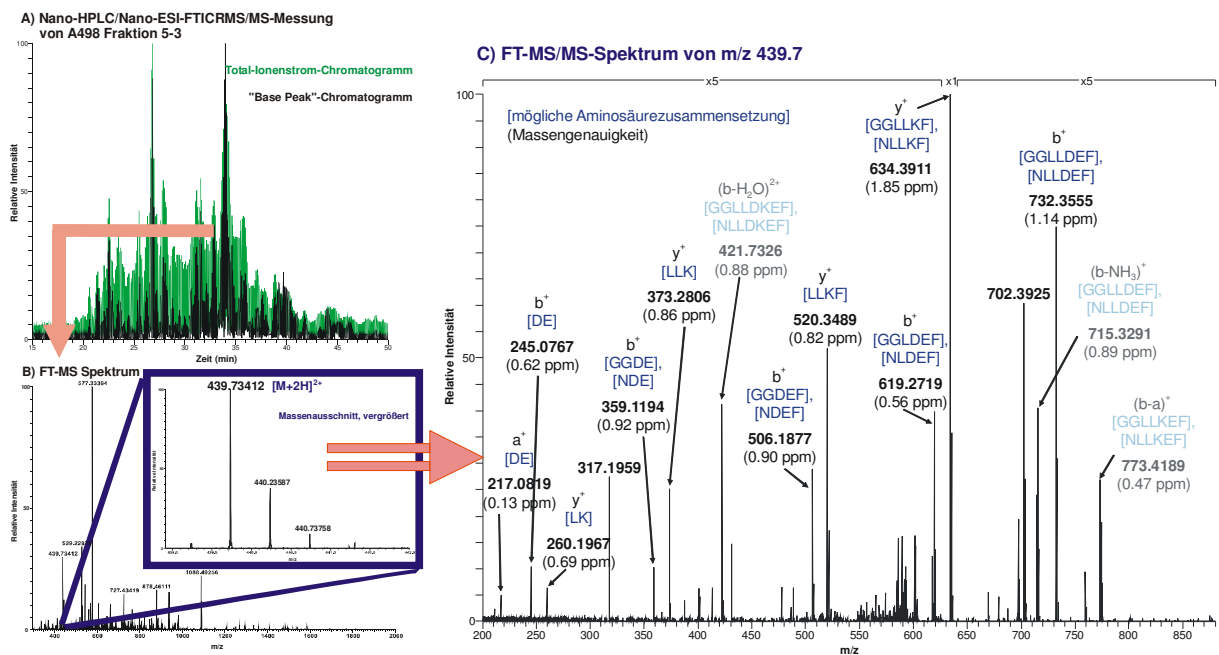
Dieses neue Sequenzierungsverfahren basiert auf kombinatorischen Berechnungen, die die hochgenau gemessenen Massen von Peptidvorläuferion und seinen Fragmentionen berücksichtigen und daraus die möglichen individuellen Zusammensetzungen aus in die Kalkulationen einbezogenen Aminosäuren berechnen.

Für die Auswertung dieser Massenspektren eignet sich somit die CBS-Methode hervorragend, um eine schnelle, verlässliche und unabhängige Validierung der Ergebnisse auch ohne Vorkenntnisse über Peptidursprung oder Fragmentierungsregeln durchführen zu können.

### Prinzip der MS-Datengenerierung mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICR-MS/MS mit Verifizierung der ermittelten Peptidsequenz durch CBS

Das nachfolgende Beispiel (Abb. 4-13) veranschaulicht den Ablauf der Datengenerierung mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICR-MS/MS.

Ein aliquotierter Teil der erhaltenen niedermolekularen Fraktion aus der C8-HPLC-Fraktion 5 der säureeluierten RCC A498-Probe (unspezifische Aufreinigung mittels Säureelution und Größenausschluss bei 3 kDa, Kap. 3.3.2) wurde mithilfe der *UltimatePlus*-HPLC-Anlage nochmals weiter aufgetrennt und über online-Kopplung mit Nano-Elektrosprayionisation am *LTQ FT* vermessen (Abb. 4-13, A). Dabei wurden im datenabhängigen MS/MS-Modus (Parameter in Tab. 3-6 bzw. Tab. 3-7) sowohl MS-Übersichtsspektren als auch Fragmentionenspektren im FT-Teil aufgenommen (Abb. 4-13, B und C).



**Abb. 4-13:** Prinzip der MS-Datengenerierung anhand eines Beispiels aus Fraktion 5-3 ( $[M+2H]^{2+} = 439.7341$  u) der säureeluierten A498-Probe

A) Chromatogramme aus der Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICRMS/MS-Messung

B) ausgewähltes FTICR-MS-Übersichtsspektrum mit vergrößertem Teilausschnitt

C) resultierendes Fragmentionenspektrum des zuvor ausgewählten Vorläuferions (zur Veranschaulichung: mit Beschriftung der zugeordneten Fragmentionen)

Bei der anschließenden wie oben beschriebenen DB-Suche mit *TurboSEQUENT* wurden für die Masse 878.46 u ( $[M+H]^+$ ) zwei isobare Kandidaten vorgeschlagen:

Peptidsequenz	Kreuzkorrelation	Delta Cn
DENFILK	1.92	0.07 *
QDDFLLK	1.78	0.16

\* ursprünglich aufgrund des Filters („ $\Delta Cn > 0.1$ “) nicht enthalten, jedoch nachträglich durch CBS als falsch negativer Treffer erkannt (s.u.)

**Tab. 4-7:** Vorschläge aus der DB-Suche für 878.46 u

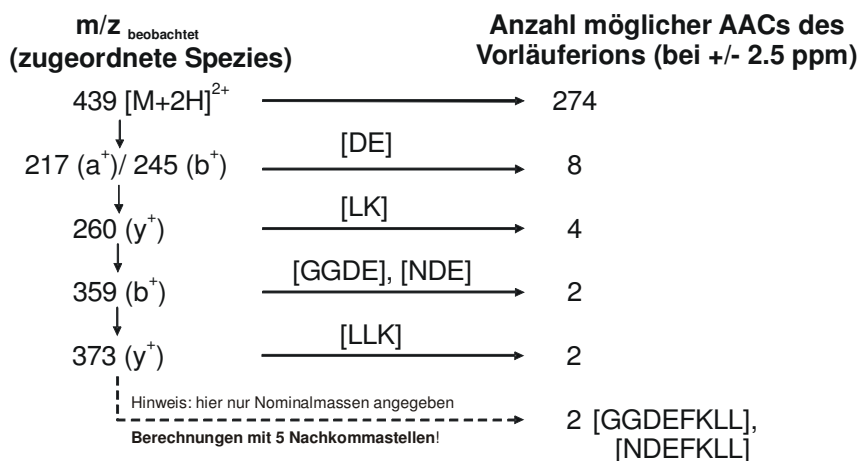
Aus Tab. 4-7 wird ersichtlich, dass sich die angegebenen, vom Suchprogramm berechneten Werte der beiden Kandidaten sowohl für die Kreuzkorrelations- als auch Delta Cn-Werte kaum unterscheiden. Der Delta Cn-Wert ist eine von *SEQUENT* berechnete Kennziffer, die sich auf die Differenz der ermittelten, auf 1 normalisierten Kreuzkorrelations-Werte zwischen dem besten und zweitbesten Ergebnistreffer bezieht. Der Delta Cn-Wert soll als Maß zur Bestimmung der Ähnlichkeiten zwischen den Ergebnistreffern dienen.

Außerdem waren auch die Werte für die anderen ermittelten, hier nicht gezeigten Filterparameter für beide vorgeschlagenen Peptide identisch.

Der zweite Peptidsequenzvorschlag wäre nun aufgrund der Filtereinstellung im DB-Suchprogramm der einzige und beste Ergebnistreffer. Durch die Überprüfung mit CBS konnte diese Aussage jedoch revidiert und die vorgeschlagene Peptidsequenz „QDDFLLK“ als falsch positives Ergebnis erkannt werden. Zum besseren Verständnis wird die CBS-Methode nachfolgend anhand des gezeigten Beispiels erläutert.

#### Vorgehensweise bei der kompositionsbasierten *de novo*-Sequenzierung CBS

Zuerst werden für das Vorläuferion innerhalb der angegebenen Massengenauigkeit alle möglichen Kombinationen an Aminosäurezusammensetzungen (AACs) für das experimentell ermittelte Molekulargewicht berechnet (Tab. 4-8). Danach werden diese Berechnungen für die Fragmentationen unter Berücksichtigung der bekannten Fragmentionentypen wiederholt. Hierbei wird beginnend mit dem kleinsten zu den nächstgrößeren Fragmentationen fortgefahren, so dass die Anzahl der AACs schrittweise reduziert wird.



**Tab. 4-8:** CBS-Methode veranschaulicht am Beispiel zu Abb. 4-13 (Teil 1)

Anschließend wird die Peptidsequenz durch Vergleich von beobachteten und theoretischen Fragmentenmassen bestimmt, die aus Sequenzpermutationen der übrig gebliebenen AACs resultieren:

Score	Peptidsequenz	Anzahl der zuordenbaren Ionen
1.6153	DENFLLK	33
1.3837	DEFNLLK	31
1.3365	DEGGFLLK	31
...		

**Tab. 4-9:** CBS-Methode veranschaulicht am Beispiel zu Abb. 4-13 (Teil 2)

Als Resultat dieser Bestimmung können alle zugeordneten Fragmentenmassen mit den berechneten Abweichungen zu den theoretischen Werten angezeigt werden, die hier zur Veranschaulichung im MS/MS-Spektrum den Ionensignalen zugewiesen worden sind (Abb. 4-13, C). So konnte im Beispiel das untersuchte Peptid letztlich als Teilsequenz von Cyclophilin A (DENFILK; AA 84-90) identifiziert werden, welches sich rückblickend auf das automatisch erhaltene Resultat (Tab. 4-7) als falsch negatives Ergebnis des *Turbo-SEQUEST*-Algorithmus herausgestellt hatte.

Modifizierte Vorgehensweise auf der Basis der kompositionsbasierten *de novo*-Sequenzierung: der „akkurate Peptid-Fragmentenmassen-Fingerabdruck“

Da in den aufgenommenen FTICR-MS/MS-Spektren oftmals keine Fragmentensignale im unteren  $m/z$ -Bereich beobachtet werden konnten (siehe dazu Kap. 4.3.1.3), wurde die Prozedur zur CBS-Methode bei diesen Spektren modifiziert. Es wurde stattdessen wie bei der herkömmlichen *de novo*-Sequenzierung verfahren (Kap. 4.2.1.1 und 4.2.1.2), bei der mit der Vorläuferionenmasse begonnen wird. Sukzessiv wurden dann Inkrementmassen identifiziert und diese den in Frage kommenden Fragmentensignalen zugeordnet, wenn sie innerhalb der angegebenen Massenfehlertoleranz im unteren ppm-Bereich in den MS/MS-Spektren beobachtet wurden. Wie bei der ursprünglichen CBS-Methode konnten dann die Peptidsequenzen durch anschließende Permutation der hierbei ermittelten Aminosäuren bzw. Teilsequenzstücke bestimmt werden. In Analogie zum PFF nutzt dieses Analyseverfahren einen „akkuraten Peptidfragmentierungsfingerabdruck“ oder genauer einen „akkuraten Peptid-Fragmentenmassen-Fingerabdruck“ (= APFF).

Auf diese Weise konnten für die bei der DB-Suche falsch zugeordneten oder nicht zuordenbaren MS/MS-Spektren die richtigen Peptidsequenzen aufgeklärt werden, wobei das zugehörige Ursprungsprotein zum Teil erst in einer weiteren Suche in Datenbanken identifiziert werden konnte (Kap. 3.3.3).

### Zusammenfassung des vollständigen Ablaufs für die neue Methode

Die neu entwickelte Methode kann in drei grundlegende Abschnitte unterteilt werden (Abb. 4-14):

(1) Probenaufarbeitung (siehe Kap. 3.3.2):

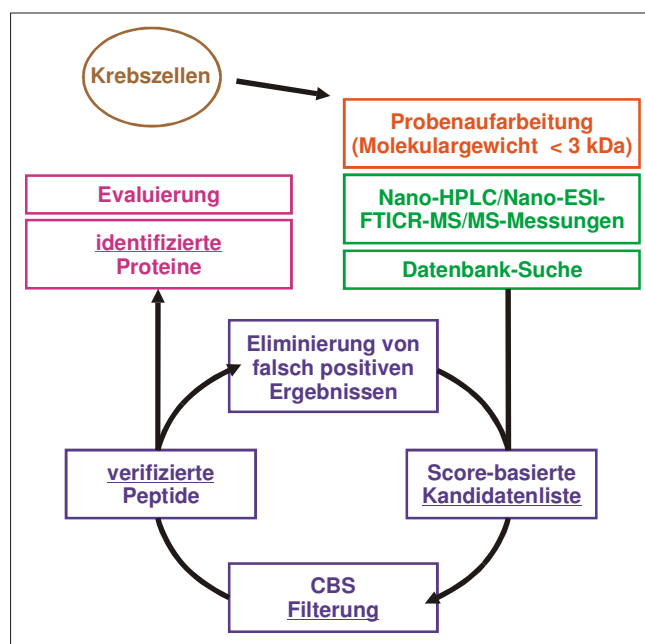
- a) Krebszellen wurden mit Citratpuffer behandelt, um Peptide von der Oberfläche der Zelle abzulösen (Säureelution bei pH 3).
- b) Mittels C8-HPLC und UV-Detektion wurden die säureeluierten Proben vorfraktioniert
- c) und durch Zentrifugalfilter mit Größenausschluss bei 3 kDa ultrafiltriert.

(2) Datengenerierung:

- a) Der niedermolekulare Anteil jeder einzelnen HPLC-Fraktion wurde mittels Nano-HPLC/ Nano-ESI-FTICR-MS/MS untersucht (Kap. 3.2.2, Parameter in Tab. 3-6 bzw. Tab. 3-7).
- b) Mithilfe des automatischen DB-Suchprogramms *TurboSEQUENT* wurden Peptid-/ Protein-Kandidatenlisten erstellt (Kap. 3.3.3, Parameter 1 in Tab. 3-9).

(3) Datenverifizierung und Ergebnisvalidierung:

- a) Auf der Basis exakter Vorläufer- und Fragmentenmassen wurden die Kandidaten beginnend beim kleinsten Vorläuferion mittels CBS Datenbank-unabhängig überprüft.
- b) Die bestätigten Peptide und zugehörigen Proteine wurden mit der DB-Kandidatenliste abgeglichen.
- c) Falsch positive Peptid- sowie Proteinidentifizierungen wurden eliminiert, so dass durch diesen iterativen Verifizierungszyklus validierte Ergebnisse resultierten, deren biologische Relevanz für die untersuchten Krebszelllinien weiter evaluiert werden musste.



**Abb. 4-14:** Ablaufschema zur neuen Methode mit Datenvalidierung

#### 4.3.1.2 Erste Resultate aus unspezifisch aufgereinigten RCC A498-Proben mithilfe der neuen Methode

Mit der oben beschriebenen neuen Methode [Thieu et al. **2006**] konnten mehrere Peptide und zugehörige Ursprungsproteine höchst zuverlässig für die Nierenkarzinomzellen der A498-Linie identifiziert werden (Kap. 4.3.1.3)\*<sup>1</sup>. Aufgrund der hohen Anzahl der generierten Fragmentationenspektren (800 - 1000 einzelne bzw. ca. 250 - 300 gemittelte MS/MS-Spektren) und der daraus resultierenden Ergebnistreffer für jede Messreihe (> 1000 Kandidaten bei redundanten\*<sup>2</sup> Einträgen) konnte nur ein Teil der Daten überprüft werden, so dass sich die validierten Ergebnisse zunächst nur auf wenige untersuchte Fraktionen bezogen (hauptsächlich aus C8-Fraktion 5, Beispiellisten in Anhang 6.2). Die Verifizierung anhand der hochgenau gemessenen MS- und MS/MS-Daten mittels CBS-Methode wurde zudem durch Eingabe in *PeptideComposer* nach dem im Beispiel beschriebenen (Abb. 4-13, Tab. 4-8) oder modifizierten Prinzip durchgeführt.

\*<sup>1</sup> Angesichts der größtenteils übereinstimmenden Ergebnisse mit der später angewendeten, modifizierten Validierungsmethode wurde hier zunächst auf die Auflistung und Diskussion der identifizierten Peptide bzw. Ursprungsproteine verzichtet.

\*<sup>2</sup> Redundante Einträge entstehen hier z.B. durch MS/MS-Spektren des gleichen Vorläuferions, die nicht gemeinsam gemittelt und damit als verschiedene Fragmentationenspektren gewertet worden sind.

#### Verbesserte Vorauswahl der Ergebnistreffer bei der DB-Suche

Durch eine weitere Aktualisierung des verwendeten Programms in *BioWorks* Version 3.2 konnten nun bei der DB-Suche Massenfehlertoleranzen für Vorläuferionen von nicht mehr minimal 0.01 u, sondern jetzt auch im unteren ppm-Bereich berücksichtigt werden, so dass hierdurch eine signifikante Verbesserung in der Vorauswahl der Kandidaten getroffen werden konnte.

Aufgrund dieser und weiterer Verbesserungen im DB-Suchprogramm wurde die Vorgehensweise der neuen Validierungsmethode nachfolgend abgewandelt, um den beschriebenen Verifizierungszyklus zu beschleunigen. Die veränderte Vorgehensweise wird im späteren Abschnitt näher erläutert.

Zunächst soll im Folgenden noch einmal anhand einiger Beispiele genauer gezeigt werden, welche Bedeutung die Massengenauigkeit für die Ergebnisauswahl einer einfachen Datenbanksuche hat.

Dazu wurden drei monoisotopische Peptidmassen ausgewählt, die in den Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICRMS-Messungen der RCC-Proben auftraten, und mit verschiedenen Massenfehlertoleranzen im unteren ppm-Bereich für die DB-Suche in die Suchmaske von *MS-Tag Simple* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/mstagfd.htm>) eingegeben.



Als Datenbank wurde SwissProt in der Version vom 17.10.2006 mit der Spezies „Homo Sapiens“ ausgewählt. Dabei wurden nur Proteine mit einem Molekulargewicht von 1 - 20 kDa zugelassen, ohne zusätzliche Angabe von weiter einschränkenden Parametern wie Spaltzym oder Modifikation. Die Begrenzung des Molekulargewichts auf 20 kDa wurde gewählt, um die maximal mögliche Zahl der Ergebniseinträge (200 Einträge) nicht wesentlich zu überschreiten (siehe Tab. 4-10). In den untersuchten Proben sind jedoch auch Spaltpeptide von wesentlich größeren Ursprungproteinen zu erwarten, so dass in realen Suchvorgängen mit einer erheblich größeren Anzahl an Ergebnistreffern gerechnet werden muss. Normalerweise wurden bei einer DB-Suche auch Proteine mit Molekulargewichten von bis zu 300 kDa berücksichtigt.

beobachtete monoisotopische Masse mit Ladungszustand (bzw. umgerechnet auf $[M+H]^+$ )	aus RCC-Probe	Anzahl der Ergebnistreffers in der DB-Suche bei einer Massenfehlertoleranz von			
		+/- 0.01 u	+/- 10 ppm	+/- 5 ppm	+/- 2 ppm
808.3827 <sup>+1</sup>	BN30	> 200 (70 %)*	> 200 (80 %)*	124	75
513.7819 <sup>+2</sup> (1026.5565 <sup>+1</sup> )	A498	> 200 (55 %)*	194	64	49
657.3380 <sup>+2</sup> (1313.6687 <sup>+1</sup> )	A498 + BN30	> 200 (50 %)*	> 200 (70 %)*	142	66

**Tab. 4-10:** Vergleich der DB-Trefferanzahl bei Angabe unterschiedlicher Massenfehlertoleranzen bzw. MS-Genauigkeiten  
\* (in Klammern: Fortschritt der DB-Suche, bei dem sie aufgrund der zu hohen Trefferanzahl >200 abgebrochen wurde; d.h. je kleiner die Prozentangabe, desto größer ist die mögliche Anzahl der Ergebnistreffers)

Die Ergebnisse in Tab. 4-10 machen deutlich, dass die Vorschläge für eine Peptidmasse stark von den angegebenen Massenfehlertoleranzen bei der DB-Suche abhängen und die Auswahl der möglichen Kandidaten aufgrund einer höheren MS-Genauigkeit wesentlich reduziert wird. Im gezeigten Beispiel verringert sich die Anzahl der Ergebnistreffers auf etwa ein Drittel oder weniger bei Verbesserung der angegebenen MS-Genauigkeit von +/- 10 ppm auf +/- 2 ppm.

#### Modifizierte Vorgehensweise aufgrund der Verbesserungen bei der DB-Suche

Angesichts der vorangegangenen Erkenntnisse und der noch immer sehr großen Datenmenge aus den Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICRMS/MS-Messungen erschien es sinnvoll, zunächst auf die zeitintensive Überprüfung aller Kandidaten beginnend vom kleinsten Vorläuferion zu verzichten. Dank der neuen einstellbaren Filterparameter war nun eine stark verbesserte Vorauswahl der Kandidaten gegeben („*Peptide Mass Accuracy* +/- 3 ppm“, „*Peptide Probability* 10<sup>-3</sup>“; Parameter 2 in Tab. 3-9), so dass die Auswertung unmittelbar mit den besten Kandidaten aus der automatischen DB-Suche begonnen wurde.

Die DB-Suche wurde hier bis auf die zwei erwähnten Filterparameter wenig stringent gehalten, damit durch die Vorauswahl in der Ergebnistrefferverzeichnis möglichst keine potentiell richtigen Kandidaten herausgefiltert werden sollten. Außerdem wurden bei der Auflistung zusätzlich alle vorgeschlagenen Peptidsequenzen eines Proteins ungeachtet ihrer „schlechteren“ Werte bis „0.5“ im „*Peptide Probability*“-Wert angezeigt, wenn bereits ein zum Protein zugeordnetes Peptid den Schwellenwert von „ $10^{-3}$ “ erreicht hatte, so dass auch diese „falsch negativen“ Peptidvorschläge berücksichtigt wurden.

Zusätzlich konnte jetzt bei der DB-Suche auch eine so genannte *MultiConsensus*-Funktion angewendet werden, welches die Peptid- und Proteinkandidatenlisten aus mehreren Probenläufen verknüpft und so eine kombinierte Ergebnisliste aus den DB-Suchergebnissen der einzelnen Läufe ermöglichte. Dadurch stieg der Wert für die Vertrauenswürdigkeit einiger Ergebnisse (kleinere „*Peptide Probability*“) aufgrund einer erhöhten Proteinsequenzabdeckung zusammengehörender Proteinfragmente und ließ so eine weitere Eingrenzung der zugeordneten Peptidvorschläge zu den Fragmentationenspektren zu.

Zur eigentlichen Absicherung wurden die erhaltenen Ergebnisse dann wie zuvor auch anhand der hochpräzise gemessenen MS- und MS/MS-Daten mithilfe einer, allerdings vereinfachten, CBS-Methode verifiziert. Im einfachsten Falle reichte die Eingabe einer Massenliste in das Programm *PeptideComposer*. Die Verifizierung einer vorgeschlagenen Peptidsequenz erfolgte in derselben Weise durch Übereinstimmung der beobachteten mit den kalkulierten Massen von Vorläufer- und Fragmentationen im unteren ppm-Bereich.

Bei falschen oder fehlenden Peptidkandidaten musste die vollständige CBS-Methode angewendet werden.

In Anhang 6.3 und 6.4 sind die aus der oben beschriebenen DB-Suche resultierenden, noch nicht überprüften Kandidatenlisten aus den Analysen der unspezifisch aufgereinigten RCC A498-Proben bzw. der Vergleichsproben aus BN30 dargestellt. Aus diesen Ergebnislisten konnten folgende validierte Ergebnisse abgeleitet werden (Tab. 4-11).

4.3.1.3 Ergebnisse aus der unspezifischen Aufreinigung von RCC A498 und BN30**Tab. 4-11:** Ergebnisse aus der neuen Methode mithilfe CBS und DB-Suche (aus beiden RCC-Linien A498 + BN30)

Peptidsequenz: **schwarz:** nur in A498; **orange:** nur in BN30; **grün:** in beiden Zelllinien; **blau:** nur in A498 durch CBS ohne SEQUEST-Vorschlag ermittelt  
unterstrichen: bereits zuvor mit dem ursprünglichen, zeitintensiveren Verfahren ermittelte Ergebnisse (Kap. 4.3.1.2).

#	Ursprungprotein UniProtKB accession	AA-Position	Peptidsequenz	[M+H] <sup>+</sup> (beobachtet)	Beobachtete Massenabweichung (Ladungszustand)
1	Aldo-keto reductase family 1 member B1 (AKR1B1) Q5U031	13-17	<u>MPILG</u>	530.3002	- 0.8 ppm (+1)
		9-17	NGAKMPILG	900.4962	- 1.0 ppm (+1)
2	Aldo-keto reductase family 1 member B10 (AKR1B10) O60218	309-314	<u>DYPFDA</u>	727.2921	- 1.7 ppm (+1)
		75-83	IVSKLWPTF	1090.6314	+ 1.7 ppm (+2)
3	Aldo-keto reductase family 1 member C2 (AKR1C2) P52895	236-241	<u>LEDPVL</u>	685.3760	- 0.9 ppm (+1)
4	Alpha-enolase, Enolase 1 (ENO1) P06733	169-174	MILPVG	629.3685	- 1.0 ppm (+1)
		143-150	VILPVPAF	855.5316	- 2.6 ppm (+1)
		284-291	<u>IKDYPVVS</u>	920.5075	- 1.3 ppm (+2)
		25-32	<u>FTSKGLFR</u>	955.5347	- 1.3 ppm (+2)
		143-151	VILPVPAFN	969.5769	+ 0.1 ppm (+1)
		142-150	EVILPVPAF	984.5757	- 0.8 ppm (+1)
		7-13	IHAREIFD	1000.5197	- 1.4 ppm (+2)
		169-178	MILPVGAANF	1032.5551	- 0.4 ppm (+1)
		14-24	<u>SRGNPTVEVDL</u>	1186.6054	- 0.7 ppm (+2)
		33-45	<u>AAVPSGASTGIYE</u>	1222.5933	- 1.4 ppm (+2)
5	beta-Actin (ACTB) P60709	96-104	<u>VAPEEHPVL</u>	990.5240	- 1.5 ppm (+2)
		95-104	<u>RVAPEEHPVL</u>	1146.6251	- 1.3 ppm (+2)
6	Biliverdin reductase B (BLVRB), Flavin reductase P30043	2-10	AVKkiaIFG	946.6068	- 1.7 ppm (+1)
7	Calmodulin (CaM) P62158	142-149	FVQMMTAK	955.4756	+ 1.7 ppm (+2)
		125-139	<u>MIREADIDGDGQVNY</u>	1695.7673	+ 1.8 ppm (+2)
8	Cyclophilin A, Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase A (PPIA) P62937	2-7	<u>VNPTVE</u>	676.3656	- 1.3 ppm (+1)
		2-8	<u>VNPTVFF</u>	823.4343	- 0.7 ppm (+1)
		11-18	<u>AVDGEPLG</u>	757.3718	- 1.1 ppm (+1)
		53-59	FHRIIPG	839.4876	- 1.2 ppm (+2)
		10-18	<u>IAVDGEPLG</u>	870.4556	- 1.3 ppm (+1)
		85-91	<u>DENFILK</u>	878.4610	- 1.0 ppm (+2)
		10-19	<u>IAVDGEPLGR</u>	1026.5565	- 1.3 ppm (+2)

8	(Fortsetzung) Cyclophilin A, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIA) P62937	102-112	NAGPNTNGSQF	1106.4849	- 1.2 ppm (+1)
		89-99	<u>ILKHTGPGILS</u>	1135.6819	- 1.3 ppm (+2)
		9-19	<u>DIAVDGEPLGR</u>	1141.5833	- 1.3 ppm (+2)
		131-140	KVKEGMNIVE	1146.6178	- 0.8 ppm (+2)
		38-49	ALSTGEKGFQYK	1257.6458	- 1.2 ppm (+2)
		100-112	<u>MANAGPNTNGSQF</u>	1308.5622	- 1.2 ppm (+2)
9	Cystatin-B (CSTB), Stefin-B P04080	54-60	FIKVHVG	799.4815	- 1.3 ppm (+2)
10	Diazepam-binding inhibitor (DBI), Acyl-CoA-binding protein (ACBP) P07108	39-49	<u>DINTERPGMLD</u>	1260.5876	- 1.0 ppm (+2)
11	Dynactin-1 (DCTN1), 150 kDa dynein-associated polypeptide Q14203	654-659	<u>AGLVYS</u>	609.3237	- 0.9 ppm (+1)
12	Dynein light chain 2A, cytoplasmic Q9NP97	89-96	<u>IVIQNPTE</u>	913.4992	+ 0.3 ppm (+1)
13	Elongation factor 1-alpha 1 (EEF1A1) P68104	427-432	DYPPLG	661.3186	- 0.9 ppm (+1)
		252-265	DVYKIGGIGTVPVG	1374.7644	+ 1.2 ppm (+2)
14	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA) P04075	77-81	<u>VILFH</u>	628.3811	- 1.0 ppm (+1)
		300-307	<u>FSYGRALQ</u>	941.4829	- 1.1 ppm (+2)
		216-224	ALSDHHIYL	1068.5458	- 1.3 ppm (+2)
		272-284	<u>SGGQSEEEASINL</u>	1320.5903	- 0.8 ppm (+2)
		189-200	PEILPDGDHDLK	1348.6730	- 1.0 ppm (+2)
		323-334	AAQEYVKRALA	1348.7200	- 1.5 ppm (+2)
		33-45	ADESTGSIKRLQ	1375.7160	- 1.1 ppm (+2)
15	Galectin-1 (LGALS1) P09382	90-96	<u>ITFDQAN</u>	808.3827	- 1.1 ppm (+1)
		121-130	<u>MAADGDFKIK</u>	1095.5489	- 1.3 ppm (+2)
16	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) P04406	320-327	<u>YSNRVVDL</u>	965.5038	- 1.3 ppm (+2)
		23-32	FNSGKVDIVA	1049.5615	- 1.0 ppm (+2)
		2-12	<u>GKVKGVNGFG</u>	1061.6085	- 1.6 ppm (+2)
		21-31	RAAFNSGKVDI	1177.6307	- 1.4 ppm (+2)
		205-218	NIIPASTGAAKAVG	1269.7147	- 1.1 ppm (+2)
		316-326	NEFGYSNRVVD	1299.5949	- 1.1 ppm (+2)
17	Heat-shock protein beta-1 (HspB1), Heat shock 27 kDa protein (HSP27) P04792	35-41	LPRLPEE	853.4768	- 1.1 ppm (+2)
18	Histone H2A type 1-C / type 1-D Q93077 / P20671	45-51	<u>AGAPVYL</u>	690.3817	- 0.5 ppm (+1)

19	Histone H2A type 2-A / type 2-C Q6F113 / Q16777	46-52	<a href="#">AGAPVYM</a>	708.3380	- 0.7 ppm (+1)
20	Histone H2B type 1-D / type 2-F P58876 / Q5QNW6	40-47	<a href="#">VYVYKVLK</a>	1011.6223	- 1.4 ppm (+2)
		110-126	<a href="#">HAVSEGTKAVTKYTSSK</a>	1793.9445	- 3.0 ppm (+3)
21	Histone H3.1 P68431	63-71	<a href="#">IRKLPFQRL</a>	1170.7485	- 1.3 ppm (+3)
22	L-lactate dehydrogenase A chain (LDHA) P00338	326-332	<a href="#">IQKELQF</a>	905.5081	- 1.1 ppm (+2)
23	Macrophage migration inhibitory factor (MIF) Q6FHV0	41-47	<a href="#">HVVPDQL</a>	807.4353	- 0.8 ppm (+1)
		5-12	<a href="#">IVNTNVPR</a>	912.5254	- 0.8 ppm (+2)
		89-96	<a href="#">RISPRVY</a>	1005.5458	- 1.8 ppm (+2)
		4-21	<a href="#">FIVNTNVPRASVPDGFLS</a>	1933.0155	- 1.2 ppm (+2)
24	Peroxiredoxin-1 (PRDX1), Natural killer cell-enhancing factor A (NKEF-A) Q06830	121-129	<a href="#">ADEGISFRG</a>	951.4521	- 1.0 ppm (+2)
		132-140	<a href="#">IIDDKGILR</a>	1042.6242	- 1.3 ppm (+2)
		17-27	<a href="#">ATAVMPDGGQFK</a>	1164.5699	- 1.6 ppm (+2)
25	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), Cell migration-inducing gene 10 protein P00558	403-413	<a href="#">LEGKVLPGVDA</a>	1097.6190	- 1.0 ppm (+2)
26	Plasminogen activator inhibitor (PAI)1 RNA-binding protein (SERBP1) Q8NC51	2-10	<a href="#">PGLHQEGFG</a>	941.4491	+ 1.6 ppm (+2)
		21-29	<a href="#">FDDESDPFE</a>	1100.4082	+ 2.5 ppm (+1)
27	Profilin-1 (PFN1) P07737	87-108	<a href="#">RTKSTGGAPTENVTVTKDKTL</a>	2323.2656	+ 1.7 ppm (+3)
28	Protein DJ-1, (PARK7) Oncogene DJ1 Q99497	84-93	<a href="#">ESAAVKEILK</a>	1087.6341	- 1.6 ppm (+2)
		173-189	<a href="#">NGKEVAAQVKAPLVLKD</a>	1780.0340	+ 0.7 ppm (+3)
29	Ribosomal protein S19 (RPS19) P39019	2-13	<a href="#">PGVTVKDVNQQE</a>	1313.6687	+ 0.7 ppm (+2)
		2-14	<a href="#">PGVTVKDVNQQEF</a>	1460.7401	+ 1.4 ppm (+2)
		2-17	<a href="#">PGVTVKDVNQQEFVRA</a>	1786.9486	+ 2.2 ppm (+3)
30	60S ribosomal protein L29 (RPL29) P47914	34-41	<a href="#">GVDPKFLR</a>	931.5347	- 1.4 ppm (+2)
31	S100 calcium-binding protein A3 (S100A3) P33764	70-74	<a href="#">VDFVE</a>	608.2921	- 0.8 ppm (+1)
32	S100 calcium-binding protein A6 (S100A6), Calyculin P06703	83-90	<a href="#">LYNEALKG</a>	907.4873	- 1.1 ppm (+2)
		13-20	<a href="#">VAIFHKYS</a>	964.5240	- 1.1 ppm (+2)
		57-70	<a href="#">MEDLDRNKDQEVNF</a>	1752.7852	- 0.3 ppm (+3)

33	<b>S100 calcium-binding protein A10 (S100A10)</b> P60903	2-12	PSQMEHAMETM	1291.5099	- 1.3 ppm (+2)
34	<b>S100 calcium-binding protein A11 (S100A11), Calgizzarin</b> P31949	84-89	IGGLAM	561.3058	- 1.2 ppm (+1)
		18-22	IAVFO	577.3337	- 1.3 ppm (+1)
		40-45	LSFMNT	712.3328	- 0.8 ppm (+1)
		29-39	GYNYTLKTEF	1322.6279	+ 1.2 ppm (+2)
		94-105	SFLKAVPSQKRT	1361.7911	+ 0.9 ppm (+3)
35	<b>Splicing factor proline/glutamine-rich (SFPQ)</b> Q86VG2	391-400	FSQFGPIERA	1151.5860	- 1.4 ppm (+2)
36	<b>Transgelin-2 (TAGLN2), SM22-alpha homolog</b> P37802	194-199	MPRQIL	757.4378	- 1.5 ppm (+1)
		137-145	VARDDGLFS	979.4832	- 1.1 ppm (+2)
		176-191	LQMGTNRGASQAGMTG	1579.7294	- 1.3 ppm (+2)
37	<b>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL1)</b> P09936	165-174	FNNVDGHLIE	1207.5365	- 1.1 ppm (+2)
38	<b>UDP-glucose 6-dehydrogenase (UGDH)</b> O60701	145-154	DANTKPNLNL	1099.5728	- 1.2 ppm (+2)
		323-335	FNTVTDKKIALIG	1419.8222	+ 1.1 ppm (+2)
39	<b>Vimentin (VIM)</b> P08670	74-81	VPQVRLQ	881.5581	+ 1.6 ppm (+2)
		446-466	TVETRDGQVINETSQHDDLE	2423.1083	+ 0.5 ppm (+3)

Tab. 4-11 (Abschnitt 4/4)

Insgesamt konnten 39 Proteine durch ihre zugehörigen Peptidsequenzen (97 Peptide) höchst zuverlässig identifiziert werden, wovon 27 Proteine (42 Peptide) bereits zuvor mit dem zeitintensiveren Verfahren aufgeklärt wurden (Kap. 4.3.1.2, schlechtere Kandidaten-Vorauswahl in der Vorgängerversion des automatischen DB-Suchprogramms).

Dabei wurden die identifizierten Sequenzen bzw. Ursprungproteine zusätzlich in einer weiteren DB-Recherche auf Richtigkeit überprüft (s.u., Seite 89). Angesichts der großen Datenmenge (siehe Anhang 6.3 und 6.4) wurden nur jene Ergebnistreffer überprüft, welchen Proteinen zugeordnet waren, die nach dem Bewertungskriterium „*Peptide Probability*“ bereits eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für einen falsch positiven Treffer besaßen.

Peptidkandidaten, die noch nicht mithilfe der CBS-Methode überprüft wurden, aber bereits zu mit CBS verifizierten Peptiden zugeordneten Proteinen gehören, können ebenfalls zu den vertrauenswürdigen Peptididentifizierungen gerechnet werden.

Diese potentiell richtigen Peptidsequenzen sind in den Kandidatenlisten (s. Anhang), aber nicht in der hier gezeigten Tabelle enthalten.

Mit der neuen Methode wurden 18 Proteine in beiden Zelllinien gemeinsam identifiziert, die restlichen 21 Proteine nur in den A498-Proben.

Für die identifizierten Peptide bzw. beobachteten Vorläuferionenmassen konnten dabei Abweichungen zu den berechneten monoisotopischen Peptidmassen von typischerweise deutlich unter 2 ppm ermittelt werden, was sich mit der technischen Spezifikation für das verwendete Hybridmassenspektrometer *LTO FT* bei externer Kalibrierung deckt. Neben den akkurat gemessenen Fragmentationensignalen konnten dadurch oft eindeutige Zuordnungen mithilfe der neuen Verifizierungsmethode getroffen und viele Fehlinterpretationen sowohl von falsch positiven als auch falsch negativen Ergebnissen vermieden werden. Insbesondere mit dem zunächst verwendeten DB-Suchprogramm in der *BioWorks*-Version 3.1 konnten noch viele der ermittelten Ergebnistreffer bei der nachträglichen Überprüfung nicht bestätigt werden. Mit der *BioWorks*-Version 3.2 dagegen konnte eine erheblich bessere Vorauswahl der Kandidaten bei der DB-Suche getroffen werden (Kap. 3.3.3), was vor allem auf die verbesserte Berücksichtigung sehr kleiner Massenfehlertoleranzen im ppm-Bereich, die Verknüpfung der verschiedenen Messreihen und die Einführung des neuen Bewertungskriteriums „*Peptide Probability*“ zurückzuführen ist.

Viele falsch positive Ergebnisse aus den DB-Suchen wurden Isoformen zugeschrieben oder waren dem tatsächlichen, identifizierten Ursursungsprotein sehr ähnlich und zumindest in Teilsequenzen identisch.

Andere Fehlinterpretationen des DB-Suchprogramms konnten oft auch auf die noch recht verrauschten FTICR-MS/MS-Spektren zurückgeführt werden, die teilweise zu wenige reale Fragmentationensignale enthielten. Das DB-Suchprogramm benutzt für die Zuordnungen der MS/MS-Daten auch Rauschsignale oder so genannte höhere (> 1) Harmonische. Diese höheren Harmonischen spiegeln sich in nach der Fouriertransformation sichtbar werdenden zusätzlichen Massensignalen wider. Sie können von sehr intensiven Ionensignalen (bzw. von deren harmonischen Oberschwingungen als Vielfaches der Frequenzen) abgeleitet werden und tauchen häufig im Massenspektrum bei halbem m/z-Wert (= 2. Harmonische) in mehr als zehnfach geringerer Intensität auf. Hier würde eine bessere Rohdatenverarbeitung, die solche Signale automatisch z.B. an den Signalmustern oder wiederkehrenden Rauschsignalen erkennt und eliminiert, generell für die Datenauswertung von Vorteil sein.

Die Spektreninterpretation mittels der ursprünglich vorgestellten CBS-Methode [Spengler 2004] stellte sich für die beschriebene Anwendung in vielen Fällen als sehr zeitintensiv und nicht immer eindeutig heraus.

Zum einen fehlten Fragmentationensignale im unteren m/z-Bereich, was auf den langen Transferweg zwischen der linearen Ionenfalle und der FTICR-Messzelle zurückgeführt werden kann.

Zum anderen fehlten teilweise strukturell wichtige Fragmentierungen im übrigen m/z-Bereich, die für die eindeutige Erkennung der Reihenfolge der Aminosäuren unverzichtbar waren. Ursache für das Fehlen dieser Fragmentationensignale können spezielle Fragmentierungen an bevorzugten Bruchstellen, präferierte Ionenbildungsmechanismen oder die Unterdrückung anderer Fragmentationen sein. Ein solches Verhalten kann z.B. bei Anhäufung basischer Aminosäuren an bestimmten Sequenzstellen oder an so genannten *Hypercleavagesites* (oft nach Prolin) beobachtet werden.

Daher erwies sich der Weg, Kandidaten zunächst mittels schneller Vorauswahl durch ein automatisches DB-Suchprogramm anhand der hochgenau gemessenen Massen zu generieren und danach die besten Vorschläge mittels vereinfachter CBS-Methode zu verifizieren, als zeitsparende Vorgehensweise mit validierten Ergebnissen.

Einige Kandidaten, bei denen nur eine einzige sicher aufgeklärte Peptidsequenz einem Protein zugeordnet werden kann, werden normalerweise bei herkömmlichen DB-Suchen als unsichere Ergebnistreffer nicht einbezogen. Diese Einzel-Peptid-Proteinidentifikationen können hier jedoch berücksichtigt werden, da durch die angewendete Verifizierungsmethode nahezu keine falsch positiven Ergebnisse resultieren. Das Auftreten dieser generierten und später bestätigt zugeordneten Ionensignale kann daher nicht als „Zufallsprodukt“ gewertet werden.

Zudem wurden nur relativ kleine nicht-redundante Proteindatenbanken der Spezies „Homo Sapiens“ für die DB-Suche genutzt und auch nur Peptidsequenzen in die Ergebnisliste aufgenommen, die ausschließlich einem einzigen Protein zugeordnet werden konnten. Außerdem wurde jeder DB-Treffer (verifiziertes Peptid) nochmals mithilfe des *PeptideSearch-Services* und auf der ExPASy-Seite überprüft, so dass eine höhere Vertrauenswürdigkeit der in den Datenbanken verzeichneten Proteinsequenzen aufgrund der mehrfachen Bestätigung resultierte.



### Diskussion zu den identifizierten Peptiden bzw. zugehörigen Ursprungsproteinen

Die identifizierten Peptide stellen durchweg proteolytische Fragmente dar, die von Degradationsprozessen exprimierter Proteine abgeleitet werden können.

Die Proteine lassen sich dabei nach ihren Funktionen einteilen, so dass sie als Motor- und Strukturproteine (z.B. Aktin, Dynein, Profilin, Vimentin) oder Proteine zur Signaltransduktion (z.B. Calmodulin, Cyclophilin, Galectin, S100 Proteine) bzw. für den Stoffwechsel und Zellzyklus zuständig (z.B. Aldolase, Enolase, GAPDH, Histone, Ribosomalproteine) klassifiziert werden können. Einige Proteine können mehrere Aufgaben übernehmen, so dass sie bei verschiedenen Prozessen beteiligt sind. Zudem gibt es solche, deren Funktion noch unbekannt ist.

Obwohl die meisten der identifizierten Proteine von bekannten, ubiquitär vorkommenden so genannten „*housekeeping genes*“ abstammen, stellte sich bei vielen identifizierten Proteinen wie z.B. Aldolase A, alpha-Enolase, beta-Aktin, Biliverdin-Reduktase B, Calmodulin, Cyclophilin A, GAPDH, HSP27, LDHA, Peroxiredoxin und Vimentin in kürzlich durchgeführten Proteomanalysen heraus, dass sie in Nierenkrebszellen gegenüber Primärzelllinien hochreguliert sind [Craven et al. **2006**] oder auch in Nierenzellen erhöhte Werte aufweisen, die gegen oxidativen oder osmotischen Stress resistent sind [Dihazi et al. **2005**].

*Housekeeping*-Proteine sind für den „Haushalt“ einer jeden Zelle notwendig. Sie sind für Grundfunktionen des Betriebs und Erhalts der Zelle zuständig und kommen somit auch in gesunden Zellen vor.

Für Vimentin nimmt man an, dass es Unterschiede in der Expression der Subtypen bei verschiedenen Nierenkrebsarten gibt [Cheburkin et al. **2002**; Kellner et al. **2002**; Skinnider et al. **2005**]. Des Weiteren konnten Galectin-1, PGK1, S100 Proteine und UCHL1 bereits als Antigene bei Nierenzellkarzinomen identifiziert werden. Diese Proteine und damit auch die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Spaltpeptide sind somit potentielle Kandidaten als Biomarker zur Tumorentdeckung oder für neue immuntherapeutische Ansätze [Young et al. **2001b**; Amatschek et al. **2004**; Dihazi et al. **2005**; Domoto et al. **2007**; Seliger et al. **2007**]. Auch Transgelin (SM22-alpha) und das Protein Dj-1 können Marker für diese Art von Tumoren sein [Klade et al. **2001**; Kim et al. **2005**; Clements et al. **2006**].

Zudem wurden viele der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine wie z.B. die Aldo-Keto-Reduktasen, alpha-Enolase, Cyclophilin A, Cystatin B, Galectin-1, HSP27, MIF, Peroxiredoxin, PGK1, Protein Dj-1, Ribosomalproteine, S100 Proteine und Vimentin bereits in anderen Expressionsanalysen wie bei Pankreas-, Darm- und Lungenkrebs als hochreguliert nachgewiesen [Kondoh et al. **1992**; Campa et al. **2003**; Amatschek et al. **2004**; Shen et al. **2004**; Fukumoto et al. **2005**; Hwang et al. **2006**; Li et al. **2006**; Liu et al. **2006**; Werle et al. **2006**].

#### 4.3.1.4 Schlussbetrachtung für die neue Analysenmethode

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode verknüpft die beiden neuen Ansätze der vereinfachten Probenaufarbeitung und der neuen Datenvalidierungstechnik und liefert so validierte Ergebnisse auch aus komplexen Proben (Peptidgemische unbekannter Entstehungsgeschichte).

Hierbei wurden die im ersten Schritt aus einer automatischen DB-Suche ermittelten Peptidkandidaten größtenteils anhand ihrer hochpräzise gemessenen Massen für Vorläufer- und Fragmentationen entweder bestätigt, als falsch positives Ergebnis aufgedeckt oder erst aufgeklärt. Aufgrund der Kontrollmöglichkeit im iterativen Verifizierungszyklus mit einem DB-unabhängigen, kompositionsbasierten *de novo*-Sequenzierungsverfahren wurden Peptidsequenzen höchst zuverlässig anhand der hochgenauen Massenanalyse bestimmt und DB-verzeichneten Proteinen mit großer Sicherheit zugeordnet.

Mit der neuen Methode konnten gegenüber der klassischen Vorgehensweise mit spezifischer IAC-Aufreinigung nun viel schneller eine größere Menge an Peptiden aus den betrachteten Nierenzellkarzinomproben untersucht und sicher aufgeklärt werden.

Bei der Ergebnisevaluierung war auffällig, dass fast alle Ursprungsproteine intrazellulär lokalisiert sind, obwohl eine durch das Präparationsverfahren bedingte Lyse der Zellen nicht zu erwarten war. Kulturzellen weisen darüber hinaus nur wenige extrazelluläre Proteine auf. Es lässt sich daraus schließen, dass die identifizierten Peptide entweder a) aus natürlichen Degradationsprozessen in der Zelle mit anschließender Präsentation der Proteinfragmente/Peptide auf der Zelloberfläche (MHC-Präsentationsmechanismus) oder b) aus einer Zerstörung der Zellmembran aufgrund der Probenaufarbeitung resultierten.

Ungeachtet des tatsächlichen Präsentationsweges geben die nachgewiesenen Peptide aufgrund ihrer Proteinabstammung ein Abbild der Krebszelle wieder und charakterisieren diese, ohne zwingend auf deren Oberfläche aktiv präsentiert gewesen zu sein.

Aus den Befunden dieser Evaluierung stellte sich ferner heraus, dass das vereinfachte Probenaufbereitungsverfahren (Säureelution statt HLA-Immunitätschromatographie) für die Analyse von MHC-I bindenden Peptiden nicht hinreichend spezifisch zu sein scheint. Die meisten identifizierten Peptide entsprachen nicht dem Bindungsmotiv für MHC-I Komplexe. Bislang konnte nur das Peptid mit der Sequenz „RVAPEEHPVL“, welches vom beta-Aktin abgeleitet werden kann und einen nur geringen *Syfy*-Score-Wert von 19 für HLA-A\*0201 besitzt, als bereits identifiziertes MHC-I bindendes Peptid [Krüger et al. 2005] in beiden untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurden die restlichen, mit der IAC spezifisch aufgereinigten A498-Proben einer erneuten Analyse analog der beschriebenen Vorgehensweise unterworfen (Kap. 4.3.2).

Vergleich der Ergebnisse aus den DB-Analysen anhand der *LCQ Deca XP*- bzw. *LTQ FT*-Daten für die unspezifisch aufgereinigten RCC A498-Proben

Mithilfe der neuen Methode und der neuen Filtermöglichkeiten bei der DB-Suche können die zuvor wenig aussagekräftigen, langen Ergebnislisten mit vielen falsch positiven Kandidaten vor allem aufgrund der hochpräzise gemessenen Massen auf verifizierte Identifizierungen reduziert werden. Zur Verdeutlichung wird ein Vergleich der Analysemethoden beschrieben, bei dem die unspezifisch aufgereinigten A498-Proben zum einen an der 3D-Ionenfalle *LCQ Deca XP* und zum anderen am Hybridmassenspektrometer *LTQ FT* vermessen und einer DB-Suche mit Standardparametern in *TurboSEQUENT* (Parameter 2 in Tab. 3-9) unterworfen wurden.

Es wurden einerseits Teilproben (die hier am besten untersuchte C8-Fraktion 5) nach Größenausschluss (*Cut Off* < 3 kDa) und andererseits zum Vergleich alle erhaltenen C8-Fractionen nach erneuter Kapillar-LC- bzw. Nano-LC-Separation untersucht (Standardmethode ohne Größenausschluss mit *LCQ Deca XP* bzw. nur niedermolekulare Fraktionen wie bei neuer Methode mit *LTQ FT*).

Im Ergebnis wurde aufgrund des relativ stringenten Bewertungskriteriums „*Peptide Probability* 1:1000“ eine bereits deutlich eingeschränkte Vorauswahl der Kandidaten erreicht (siehe Anhang 6.5). Auf diesen stringenten (Vor-)Filter sind allerdings, wie bereits zuvor erwähnt, falsch negative Treffer zurückzuführen, welche hier jedoch nicht Objekt der Betrachtung sind. Die resultierenden Ergebnislisten aus der DB-Suche wurden zur besseren Bearbeitung und Darstellung aus dem *BioWorks*-Programm exportiert und im Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* (Version 2002 aus Microsoft *Office XP*) zunächst nach den Proteinkennungsnummern (gi-Nummern aus NCBI-Datenbank, Eintrag fett hervorgehoben) und Peptidmassen sortiert, dann durchnummeriert und anschließend nach bereits bekannten, verifizierten Peptid-/Proteinergebnissen ausgewertet (falsch positive Kandidaten durchgestrichen).

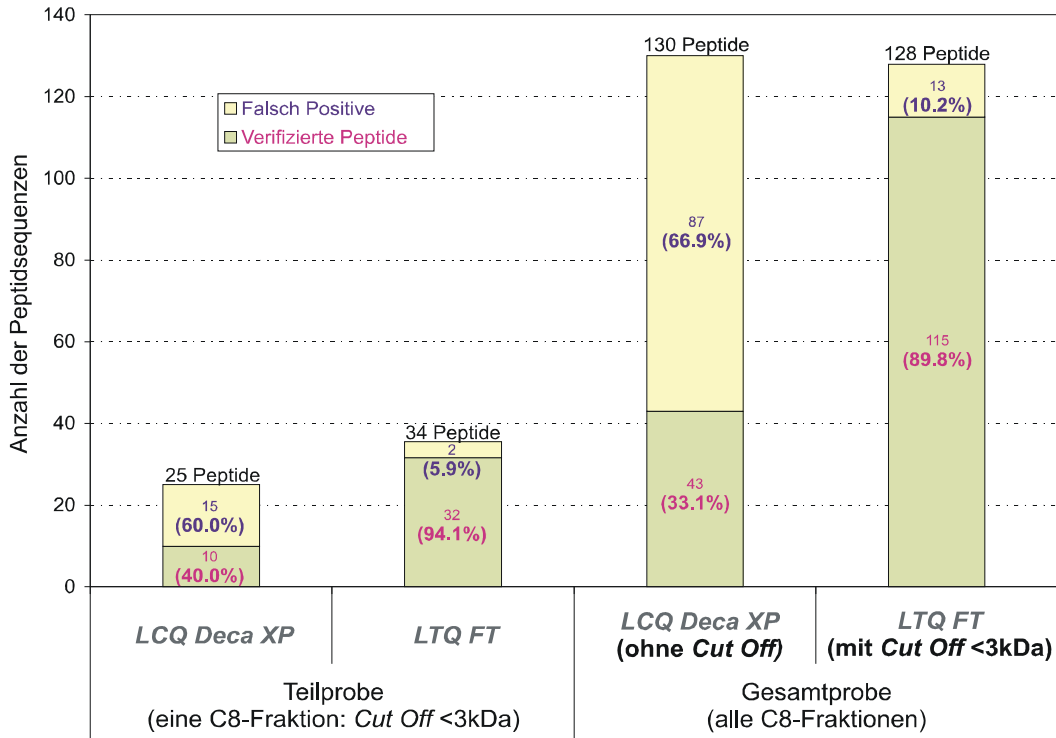
Die so erhaltenen Ergebnisse wurden schließlich auf Peptid- (Abb. 4-15) bzw. Proteinebene (Abb. 4-16) verglichen.

Hierbei ist festzustellen, dass - wie zu erwarten - erheblich bessere Kandidatenlisten mit wenigen falsch positiv identifizierten Ergebnissen bei der Untersuchung der Proben mit dem hochauflösenden und hochgenau messenden FTICR-Teil des *LTQ FT*-Gerätes erzeugt werden. Fehlzuordnungen sind auf verrauschte FT-MS/MS-Spektren und auf teilweise identische Sequenzabschnitte in ähnlichen Ursprungsproteinen zurückzuführen.

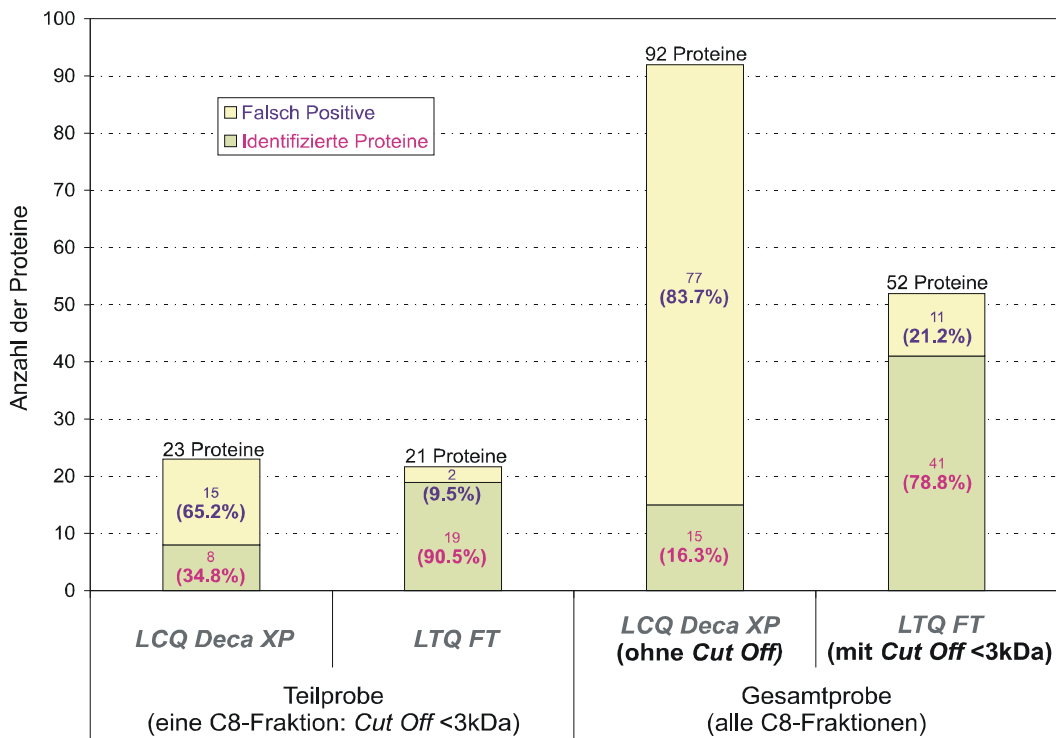
Die relativen Werte für falsch positive Zuordnungen sind beim Vergleich sowohl auf Peptid- als auch auf Proteinebene nahezu identisch. Ähnliches gilt auch für die Gegenüberstellung von Teil- bzw. Gesamtprobe.

Das deutlich schlechtere Abschneiden der am *LCQ Deca XP* gemessenen Gesamtprobe von Protein- zu Peptid-Identifizierungen ist auf die vielen falschen Einzel-Peptid-Proteinidentifizierungen zurückzuführen, was die Nichtberücksichtigung dieser Treffer bei herkömmlichen DB-Suchen aufgrund der hohen Fehlerwahrscheinlichkeit und fehlenden Kontrollmöglichkeit begründet.

**Abb. 4-15:** Vergleich der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Analysenmethoden auf Peptidebene



**Abb. 4-16:** Vergleich der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Analysenmethoden auf Proteinebene



### Folgerungen aus den Ergebnissen

Die aus dem Vergleich und aus den anderen durchgeführten Experimenten erlangten Erkenntnisse bestätigen die zuvor aufgestellte Hypothese (Kap. 4.2.2.2), dass eine herkömmliche massenspektrometrische Analyse von komplexeren Proben ohne nähere Vorkenntnisse nicht allein durch ein automatisches, wahrscheinlichkeitsbasiertes DB-Suchprogramm in vertrauenswürdiger Weise bewerkstelligt werden kann.

Erst durch die mit der APFF-Methode realisierte Möglichkeit einer Kontrolle der Ergebnisse bzw. einer echten Identifizierung der Peptide anhand der generierten Informationen (Zuordnung akkurat gemessener Massensignale) sind solche Untersuchungen mit validierten Ergebnissen durchführbar.

Angesichts der erhaltenen Ergebnisse ist der niedermolekulare Peptidmassenbereich bis ca. 3000 Da ideal geeignet für die Kombination von Flüssigkeitschromatographie (Separation der Peptide), FTICR-MS/MS-Analyse (hochgenaue MS-Datengenerierung) und CBS-Methode mit vorheriger DB-Suche (schnelle, verifizierbare Auswertung). Für die Durchführung der beschriebenen Analyse und Charakterisierung von Krebszellen scheint allerdings eine noch einfachere Probenaufarbeitung hinreichend zu sein, die nur aus ein-dimensionaler, konventioneller Nano-HPLC-Separation nach Säureelution und Größenausschluss durch Ultrafiltration besteht.

Des Weiteren ergibt sich aus dem Verfahren die Möglichkeit, die höhermolekularen Fraktionen, die hier zunächst nicht ausgewertet wurden, einer zusätzlichen Analyse für eingehendere Untersuchungen entweder direkt ohne weitere Probenaufarbeitung oder nach enzymatischer Spaltung zu unterwerfen.

Die beobachtete, höhere Empfindlichkeit der Messungen in der linearen Ionenfalle gegenüber der nachgeschalteten ICR-Zelle des *Finnigan LTQ FT*-Hybridmassenspektrometers (fehlende Fragmentationen aufgrund des langen Ionentransferweges) lassen den Schluss zu, dass eine vereinfachte und eindeutigere Spektreninterpretation resultieren kann, wenn MS/MS-Daten aus beiden Geräteteilen des *LTQ FT* zur Peptidsequenzbestimmung herangezogen werden.

Daher wird diese Vorgehensweise bei den folgenden Untersuchungen der restlichen IAC-aufgereinigten A498-Proben berücksichtigt.

### 4.3.2 Anwendung der neuen Datenvalidierungsmethode auf die spezifisch aufgereinigten A498-Proben

Aufgrund der Erkenntnisse und Resultate aus der neu entwickelten Methode wurden die restlichen spezifisch aufgereinigten A498-Proben aus dem klassischen Ansatz mit IAC einer weiteren hochgenauen MS- und MS/MS-Analyse unterzogen und nach dem neuen Verfahren ausgewertet.

#### 4.3.2.1 Vorgehensweise

Die Vorgehensweise war in großen Teilen analog der neuen Methode, wobei die bereits fraktionierten Proben ohne weitere Auftrennung über offline-Nanoelektrospray vermessen worden sind. Hierbei wurden mithilfe des Hybridmassenspektrometers *LTD FT MS*- und MS/MS-Daten sowohl in der linearen Ionenfalle als auch im FTICR-Teil von den untersuchten Peptiden aufgenommen. Eine zusammenfassende Darstellung der genauen Vorgehensweise wird nachfolgend gegeben:

- (1) Aufnahme von IT- und FTICR-MS- und MS/MS-Daten im *Data Dependent*<sup>TM</sup>-Modus (Parameter in Tab. 3-8)
- (2) Erstellung der Kandidatenliste (siehe Anhang 6.6) anhand der FTICR-MS- und MS/MS-Daten mithilfe *TurboSEQUENT* (wie Parameter 2 in Tab. 3-9, jedoch Vorläuferionenmasse: 600 – 1400 Da und ohne Schwellenwertangabe bei „*Peptide Probability*“)
- (3) Verifizierung der Vorschläge oder Bestimmung der Peptidsequenz mithilfe der CBS-Methode bzw. durch zusätzliche *de novo*-Sequenzierung anhand der IT-MS<sup>2</sup>-Daten
- (4) Überprüfung der Peptidsequenzen auf ihre MHC-I-Bindungswahrscheinlichkeit mithilfe von *SyFpeithi*

#### 4.3.2.2 Ergebnisse aus der Primärstrukturaufklärung der spezifisch aufgereinigten A498-Proben mithilfe von IT- und FTICR-MS und –MS/MS

Da es Unterschiede in der Eindeutigkeit der Identifizierung der Peptide gab, wurden sie in drei ID-Kategorien unterteilt:

- Gruppe A: eindeutige Peptidsequenzbestimmung durch Verifizierung mithilfe von CBS („hochwertige“ FTICR-MS<sup>2</sup>-Spektren mit genügend Fragmentationensignalen)
- Gruppe B: eindeutige Peptidsequenzbestimmung durch fast vollständige Verifizierung des Sequenzvorschlags (konsistent mit FTICR- und IT-MS<sup>2</sup>-Daten)
- Gruppe C: nur Verifizierung von Teilsequenzen der aus der DB-Suche vorgeschlagenen Peptide („schlechte“ FTICR-MS<sup>2</sup>-Spektren mit ungenügend zuordenbaren Fragmentationensignalen; gute Übereinstimmung mit restlichen IT-MS<sup>2</sup>- Daten)

Tab. 4-12: Ergebnisse aus den restlichen IAC-aufgereinigten A498-Proben mithilfe der neuen Vorgehensweise

ID#	Peptidsequenz SEQUEST-Vorschlag ja: + / nein: -	HPLC-Fraktion	[M+H] <sup>+</sup> (beobachtet)	Massen- abweichung (Ladungszustand)	Syfeithi-Score	Ursursprungprotein (AA-Position)	UniProtKB accession
A1	<u>(AL)</u> L(GGL)VNV <sup>8</sup> +	26	855.5297	- 0.19 ppm (+1)	HLA-A*0201: 34	Progesterin and adiponQ receptor family member 4, PAQR4 (213-221)	Q8N4S7
A2	(LL)I(PG)LATA <sup>8</sup> +	26	868.5504	+ 0.16 ppm (+1)	HLA-A*0201: 30	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1, NDUFA1 (16-24)	O15239
A3	<b>VMA(GD)IYSV</b> +	18	954.4603	+ 0.16 ppm (+1)	HLA-A*0201: 30	Adipophilin, ADFP (348-356)	Q99541
A4	(YV)DPVITSI <sup>1,2,3</sup> -	22	1006.5456	+ 0.10 ppm (+1)	HLA-A*0201: 22	Met proto-oncogene tyrosine kinase, c-MET (654-662)	P08581
A5	<u>DAKIRIFDL</u> <sup>3†,9</sup> +	29	1090.6261	+ 0.57 ppm (+2)	HLA-B*08: 33	60S ribosomal protein L10, RPL10, QM protein (28-36)	P27635
B1	(SL)A(GG)IGV <sup>1,3,10</sup> -	21/22	786.4721	+ 0.17 ppm (+1)	HLA-A*0201: 33	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, HNRPK (154-162)	P61978
B2	<b>(AL)VQVAEA</b> +	16	899.5202	+ 0.59 ppm (+1)	HLA-A*0201: 24	Hexosaminidase B, HEXB (34-42)	P07686
B3	(SL)Y(G)GTIT <sup>1</sup> -	22	924.5043	+ 0.63 ppm (+1)	HLA-A*0201: 29	E3 Ubiquitin-protein ligase BRE1A, RNF20 (312-320)	Q5VTR2
B4	(LL)IENVASL <sup>4,11</sup> -	24	971.5782	+ 1.05 ppm (+1)	HLA-A*0201: 34	Glutathione peroxidase 1, GPX1 (38-46)	P07203
B5	(SL)FP(GKL)EV <sup>5,12</sup> -	26	989.5668	+ 0.16 ppm (+2)	HLA-A*0201: 30	Protein flightless-1 homolog, FLII (1010-1018)	Q13045
B6	<b>(VL)MGLPLAQA</b> +	26	1012.5864	+ 0.43 ppm (+1)	HLA-A*0201: 24	Ly-6/neurotoxin-like protein 1 [Precursor], LYNX1 (11-20)	Q9BZG9
B7	(FV)FP(GE)LLL <sup>8</sup> +	38	1034.5928	+ 0.66 ppm (+1)	HLA-A*0201: 19	Neutral amino acid transporter, SLC1A5 (89-97)	Q71UA6, Q15758
B8	(AL)SDHHIYL <sup>1,12</sup> -	22	1068.5474	+ 0.14 ppm (+2)	HLA-A*0201: 23	Fructose-bisphosphate aldolase A, ALDOA (216-224)	P04075
C1	<b>(QLL)AEVEA</b> -	18	872.4722	- 0.18 ppm (+1)	HLA-A*0201: 9 HLA-B*08: 6	Heterodisulfide reductase subunit A, hdrA (556-563)	Q9APS0
C2	<b>(YL)(GQ)VTTI</b> -	18	894.4939	+ 0.89 ppm (+1)	HLA-A*0201: 0 HLA-B*08: 12	Ubiquitin-like 1-activating enzyme E1B, UBLE1B, UBA2, SAE2 (144-151)	Q9UBT2
C3	GLYSGVTTV <sup>10</sup> +	16	896.4731	+ 0.80 ppm (+1)	HLA-A*0201: 30	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit, RRM1 (46-54)	P23921
C4	(LLD)V(PT)AAV <sup>6,13</sup> +	20	898.5250	+ 0.69 ppm (+1)	HLA-A*0201: 28	Interferon, gamma-inducible protein 30, IFI30 (16-24)	Q8WU77, Q8NEI4
C5	(AL)LDKLYAL <sup>7†</sup> +	29	1019.6138	+ 0.26 ppm (+2)	HLA-A*0201: 32 HLA-B*08: 27	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3 (78-86)	Q9NV31
C6	<b>(VI)L(HL)T(VL)L</b> +	29	1020.6821	+ 0.49 ppm (+2)	HLA-A*0201: 26	AT-hook-containing transcription factor 1, ELYS (885-893)	Q8WYP5
C7	<b>(ILD)VTVVYL</b> +	29	1034.6151	+ 1.77 ppm (+1)	HLA-A*0201: 28	G2/mitotic-specific cyclin-F, CCNF (635-643)	P41002
C8	<b>(YL)T(AE)ILEL</b> +	29	1064.5882	+ 0.77 ppm (+2)	HLA-A*0201: 28	z.B. Histone H2A type 2-B, HIST2H2AB (58-66), Core histone macro-H2A.1, MACROH2A1, H2AFY (55-63)	Q8IUE6, Q75367

- unterstrichen:

- Klammer um Aminosäure:

- Peptidsequenz, fett:

- Zahl, fett:

Aminosäure eindeutig anhand des hochpräzise gemessenen Fragmentions zugeordnet

nicht eindeutige Reihenfolge der Aminosäuren aufgrund fehlender Fragmentionensignale

noch nicht als MHC-I bindendes Peptid in der Literatur beschrieben (s.u.)

hohe MHC-Liganden-Wahrscheinlichkeit mit ermittelten Score-Werten &gt;25

Legende zu Tab. 4-12:

- Referenzen zu den identifizierten MHC-I bindenden Peptiden laut *Syfpeithi*-Homepage (letzter Stand vom 24.05.2006):

- 1) [Weinschenk et al. **2002**]
- 2) [Schag et al. **2004**]
- 3) [Krüger et al. **2005**]
- 4) [Diehl et al. **1996**]
- 5) [Barnea et al. **2002**]
- 6) [Hunt et al. **1992b**]
- 7) [Lemmel et al. **2004**]
- † zwar zitiert, aber nicht im Artikel enthalten

- weitere Literaturstellen zu den identifizierten MHC-I bindenden Peptiden:

- 8) [Milner et al. **2006**]
- 9) [Kubo et al. **1994**; Flad et al. **2006**]
- 10) [Kageyama et al. **2004**]
- 11) [Luckey et al. **2001**]
- 12) [Lev et al. **2002**]
- 13) [Wei & Cresswell **1992**]

Bei der Auswertung der Fragmentationenspektren wurden auch hier oft schlechte Signal-Rausch-Verhältnisse beobachtet, die keine erfolgreichen Interpretationen zuließen. Lediglich 13 Peptide von den 47 bei der DB-Suche vorgeschlagenen Kandidaten konnten anhand ihrer zugeordneten Fragmentationenspektren bestätigt werden. Dabei erreichte nur ein Kandidat eine „*Peptide Probability*“ von „1:1000“ („ $9.5 \cdot 10^{-4}$ “ für DAKIRIFDL, siehe Anhang 6.6), so dass dieses Filterkriterium ähnlich wie die Proteinsequenzabdeckung offensichtlich für diese spezielle Art von Proben nur bedingt oder gar nicht geeignet ist. Die übrigen richtigen Vorschläge wären durch diesen standardmäßig gesetzten Wert normalerweise als falsch negative Ergebnistreffer herausgefiltert worden.

Durch die hochgenaue Massenanalyse und die zusätzliche Interpretationshilfe dank der gleichzeitig aufgenommenen IT-MS/MS-Spektren konnten letztlich insgesamt 21 weitere potentielle MHC-I bindende Peptide aus den restlichen spezifisch aufgereinigten A498-Proben identifiziert werden. 13 dieser Peptide wurden mit großer Sicherheit durch die CBS-Methode verifiziert (ID-Gruppe A und B), wovon zehn bereits in der Literatur als MHC-I bindende Peptide zugeordnet wurden. Drei weitere aus der ID-Gruppe C wurden ebenfalls schon in diesem Zusammenhang beschrieben. Acht der potentiellen MHC-I bindenden Peptidkandidaten konnten somit noch nicht in der Literatur gefunden werden, wobei sechs eine hohe MHC-Liganden-Wahrscheinlichkeit mit einem *Seifpeithi-Score*-Wert von 24 bis 30 besitzen.

Wie bereits in Kapitel 4.2.1.3 erwähnt, stellt das vorliegende Ergebnis aufgrund der IAC-Aufreinigung einen direkten Nachweis von präsentierten MHC-I bindenden Peptidliganden auf RCC-Zellen dar, so dass jeder der identifizierten Liganden potentiell von Interesse ist.



So konnte unter anderem ein weiteres Peptid aus Adipophilin (VMAGDIYSV, AA 348-356) mit sehr hoher Sicherheit (ID-Gruppe A) identifiziert werden, welches noch nicht als MHC-I bindendes Peptid zugeordnet worden ist.

Auch ALVVQVAEA (AA 34-42) aus der Hexosaminidase B und VLMGLPLAQA (AA 11-20) aus dem Protein LYNX1 (synonym auch *secreted Ly6/Upar-related protein 2*, SLURP2) wurden bislang noch nicht als MHC-I bindende Peptide in der Literatur beschrieben.

Hexosaminidase B ist involviert in der Hydrolyse einiger Hexose enthaltender Moleküle. Bei Defiziten oder Defekten dieses Enzyms entstehen aufgrund unzureichender Umsetzungen bestimmter Sphingolipide Akkumulationen dieser in den Lysosomen, welches bei der Sandhoff-Krankheit beobachtet wird [Sandhoff **1969**; Sandhoff et al. **1989**; Neufeld **1989**].

Das Protein LYNX1 besitzt sequentielle Ähnlichkeiten mit einem Neurotoxin und der Ly-6-Genfamilie und gehört zu einer Gruppe von lymphocytischen Antigenen, die durch einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker auf der Zelloberfläche anhaften [Gumley et al. **1995**]. Zudem wird dem Protein eine modulierende Funktion beim nikotinischen Acetylcholinrezeptor zugeschrieben [Miwa et al. **2006**]. LYNX1 konnte in Säugern vor allem im Nervensystem, aber auch in weitaus geringeren Mengen in Niere und Herz bestimmt werden [Miwa et al. **1999**; Dorus et al. **2004**].

Andere identifizierte Peptide stammten auch hier wieder von ubiquitär exprimierten *Housekeeping*-Proteinen ab, wie z.B. LLIPGLATA (AA 16-24) aus der alpha-Subkomplex-Untereinheit der NADH Dehydrogenase 1 (NDUFA1), LLIENVASL (AA 38-46) aus der Glutathion-Peroxidase 1 (GPX1), ALSDHIIYL (AA 216-224) aus der Aldolase A oder ILDVTVVYL (AA 635-643) aus dem Cyklin F.

Die NADH Dehydrogenase ist ein wichtiger Baustein in der mitochondrialen Atmungskette und katalysiert in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von NADH mit der Reduktion von Ubichinon und dem Transport von Protonen über eine biologische Membran [Brandt **2006**].

Glutathion-Peroxidase ist eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies und daher mitverantwortlich für den Schutz vor Schädigungen durch oxidativen Stress [Mills **1957**; Arthur **2000**; Zhang et al. **2005**].

Aldolase A ist bei der Glykolyse beteiligt [Gamblin et al. **1991**] und wurde bereits als Biomarker beim Nierenzellkarzinom diskutiert [Zhu et al. **1991**; Takashi et al. **1992**].

Cyklin F wird eine wichtige regulierende Funktion beim Zellzyklus in Verbindung mit Cyklin B zugeschrieben [Kong et al. **2000**]. Es wird vor allem in der G2-Phase exprimiert und dann bei der eigentlichen Mitose abrupt zerstört [Bai et al. **1994**].

Außerdem konnten weitere von bereits tumorassoziierten Proteinen abstammende Peptide nachgewiesen werden, wie z.B. YVDPVITSI (AA 654-662) aus dem Protoonkogen c-MET oder DAKIRIFDL (AA 28-36) aus dem 60S ribosomalen Protein L10 (synonym auch als *laminin receptor homolog* oder Tumorsuppressor QM bezeichnet).

Für das Protoonkogen c-MET wird mit dessen Ligand HGF (von engl.: *hepatocyte growth factor*) ein Signalweg erörtert, welcher bei der Entwicklung des Nierenzellkarzinoms involviert sein soll [Horie et al. **1999**; Buentig et al. **2002**; Linehan et al. **2004**].

Das 60S ribosomale Protein L10 stellt einen potentiellen Regulator für Signaltransduktionswege dar, an denen Proteine beteiligt sind, die eine SH3-Domäne aufweisen [Oh et al. **2002**; Park & Jeong **2006**].

Ferner konnten einige Peptide von Proteinen abgeleitet werden, die einen Beitrag zur transkriptionellen Regulation verschiedener Prozesse leisten, wie z.B. SLAGGIIGV (AA 154-162) aus dem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein K (hnRPK), GLYSGVTTV (AA 46-54) aus der Ribonukleotid-Reduktase M1 (RRM1), ALLDKLYAL (AA 78-86) aus dem uridinreichen kleinen nukleären U3-Ribonukleoprotein (IMP3), VILHLTVLL (AA 885-893) aus dem „AT hook“-DNA-Bindungsmotiv-enthaltenen Transkriptionsfaktor 1 (AHCTF1, synonym auch ELYS) oder YLTAEILEL aus dem Histon H2A.

Das hnRPK ist an der Regulation von Transkription und Translation beteiligt [Bomsztyk et al. **2004**] und es wird ihm eine Rolle während des Zellzyklus nachgesagt [Mann et al. **1988**; Dejgaard et al. **1994**]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass hnRPK als Kofaktor von p53 eine mögliche Schlüsselrolle in der Koordination transkriptioneller Antwort auf DNA-Schäden spielen könnte [Moumen et al. **2005**] und in Darmkrebs hochreguliert ist [Carpenter et al. **2006**].

RRM1 wird als prognostischer Marker bei nicht-kleinzelligem Bronchialkrebs [Bepler et al. **2004**] und bei Resistenzen gegen das Cytostatikum Gemcitabin in Lungen- und Pankreaskrebs diskutiert [Davidson et al. **2004**; Bepler et al. **2005**; Nakahira et al. **2007**].

Auch das Protein IMP3 wird bereits als potentieller Biomarker für metastasierende Nierenzellkarzinome betrachtet [Jiang et al. **2006**].

Der Transkriptionsfaktor AHCTF1 (ELYS) konnte im Mausmodell vor allem mit der Blutbildung in Zusammenhang gebracht werden [Kimura et al. **2002**]. Am Modell Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurde dem Protein eine wichtige Rolle sowohl bei der Zellteilung als auch beim korrekten Zusammenbau der Kernporen-Komplexe zugeschrieben [Rasala et al. **2006**].

Das Histon H2A ist eines der fünf Haupt-Proteinkomponenten des Chromatins in eukaryotischen Zellen und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Genregulation [Widom **1998**].

#### 4.3.2.3 Schlussfolgerung für die Identifizierung der MHC-I bindenden Peptide aus den spezifisch aufgereinigten A498-Proben

27 potentielle MHC-Peptide der Klasse I wurden aus den untersuchten, mittels Immunaффinitätschromatographie spezifisch aufgearbeiteten Proben der RCC A498-Linie bestimmt und ihren Ursursungsproteinen zugeordnet. 19 dieser Peptide konnten bereits in der Literatur als MHC-I bindende Liganden nachgewiesen werden.

Hierbei wurden sechs der identifizierten Peptide durch massenspektrometrischen Vergleich mit ihrem synthetischen Pendant verifiziert, wobei alle als MHC-I bindende Peptide bekannt waren (Tab. 4-5).

Weitere 21 Peptide wurden mithilfe der neuen Validierungsmethode zuverlässig anhand ihrer sehr vertrauenswürdigen, massenspektrometrischen Daten aufgeklärt, so dass hier keine Vergleichs-peptide für eine weitere Verifizierung hergestellt wurden. Außerdem wurden 13 dieser ermittelten Peptidsequenzen schon als MHC-I bindende Liganden in der Literatur beschrieben (Tab. 4-12).

Acht potentielle MHC-Peptide der Klasse I konnten noch nicht in der Literatur gefunden werden. Dabei wurde für sechs dieser Peptide ein hoher *Syfypeithi-Score*-Wert ermittelt, so dass diese eine große Wahrscheinlichkeit für einen MHC-Liganden besitzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die klassische, spezifische Aufreinigung mittels Immunaффinitätschromatographie das bewährte Verfahren für eine zuverlässige Gewinnung von MHC-I bindenden Peptiden ist. Unter diesem Gesichtspunkt stellt sie sich klar als die Methode der Wahl heraus. Die Untersuchung unspezifischer Säureelutionen von Zellen kann darüber hinaus ebenso wertvolle Informationen über den intrazellulären Zustand liefern, da offenbar auch hierbei krankheitsspezifische Proteinveränderungen erkannt werden. Eine direkte Kopplung dieser analytischen Informationen mit zu erwartenden Reaktionen des Immunsystems ist allerdings wohl nur über das spezifische MHC-System zu erwarten.

## 5 Ausblick

### Validierungsansätze in der massenspektrometrischen Proteomanalytik

Die beeindruckenden Leistungssteigerungen in der Computertechnologie, die miniaturisierten automatischen Systeme z.B. für die HPLC, die modernen Ionisationstechniken für große Biomoleküle in der MS und die mannigfachen Einsatzmöglichkeiten neuer Massenspektrometer ermöglichten den Übergang von Einzel- zu Hochdurchsatzexperimenten in der Analytik. Dabei mangelt es bisher jedoch vor allem an der Überprüfbarkeit der Ergebnisse aus diesen leistungsfähigen Methoden.

Im Bereich der Proteomforschung werden bei den standardmäßig angewendeten Computerprogrammen zur Datenauswertung so genannte „*probability scoring*“-Algorithmen und auch Datenbanken mit gezielt falschen Einträgen benutzt, die zur Bestimmung der Richtigkeit ihrer Ergebnisse bzw. ihrer Falsch-Positiv-Raten (Irrtumswahrscheinlichkeiten) führen sollen. Letztere Bestimmungsmethode erfolgt durch Vergleich der DB-Suchergebnisse mit den Resultaten, die in einer zusätzlichen DB-Recherche mit identischen Suchparametern und so genannten „*nonsense*“- oder „*decoy*“-Datenbanken (DB mit invertierten oder zufällig erstellten Sequenzeinträgen) erhalten werden [Keller et al. **2002**; Peng et al. **2003**; Rejtar et al. **2004**; Elias et al. **2005**; Higdon et al. **2005**; Qian et al. **2005**; Shadford et al. **2005**]. Durch nachträgliche Optimierung der Suchparameter sind bestimmte Obergrenzen für die Irrtumswahrscheinlichkeiten der jeweiligen DB-Analysen einstellbar (oft mit Falsch-Positiv-Raten von  $\leq 5\%$ ). Diese Recherchen sind sehr zeitintensiv, wenn sie zu statistisch abgesicherten Aussagen führen sollen. Die Bestimmung der Falsch-Positiv-Rate stellt einen notwendigen Schritt in Richtung validierter Ergebnisse dar, so dass sie nun auch in Leitfäden für die mittels Massenspektrometrie erzielten Proteinidentifizierungen zu finden sind [Taylor & Goodlet **2005**; Wilkins et al. **2006**].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung herkömmlicher Methoden zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen aus komplexen Probenmischungen stark fehlerbehaftete Ergebnislisten (mit vielen falsch positiven und auch falsch negativen Ergebnissen) erhalten werden. Gerade wenn mit standardmäßig eingesetzten, niedrig auflösenden Massenspektrometern und automatischen Datenbanksuchprogrammen gearbeitet wird, ist eine weitere Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse unverzichtbar, um vertrauenswürdige Aussagen zu erzielen. Aus diesem Grund wurden neue Ansätze zur Verbesserung der massenspektrometrischen Proteomanalyse untersucht und auf der Basis der besten Methoden eine neue Analysenmethode entwickelt, die zu validierten Ergebnissen führt [Thieu et al. **2006**].

Zu diesem Zweck wurden zunächst instrumentelle Parameter überprüft, die zu einer optimalen Interpretation der resultierenden Massenspektren führten. Das Interesse lag dabei vor allem im Bereich MHC-Klasse-I bindender Peptide aus renalen Humankarzinomzelllinien, da diese besonders schwierig mit herkömmlichen Methoden analysierbar sind.

Wie die Untersuchungen dieser Arbeit dann weiter zeigten, ist der Ansatz, hochaufgelöste und hochakkurate MS- und MS/MS-Spektren für die Datenauswertung zu verwenden, sehr vielversprechend, da so bereits an der Datenquelle eine hohe Ergebnisrichtigkeit begründet wird.

Ähnliche Zielsetzungen finden sich auch in der neueren Literatur. Zum Beispiel werden in der Gruppe von Zubarev et al. hochpräzise gemessene FTICR-CID- und ECD-Datensätze (engl. *electron capture dissociation*) miteinander verknüpft [Nielsen et al. **2005**; Savitski et al. **2005**; Savitski et al. **2006**]. Bei der ECD-Technik werden Elektronen z.B. mithilfe einer Hohlkathode in die ICR-Zelle emittiert, die sich sodann an die in der ICR-Falle gespeicherten Molekülkationen anlagern können. Hierbei entstehen reduzierte Radikale  $[M+nH]^{(n-1)+\cdot}$ , die im nächsten Schritt fragmentieren. Bei Peptiden werden mit dieser Technik bevorzugt Fragmente erhalten, die durch Bindungsbrüche am Peptidrückgrat zwischen den N-C-Bindungen (alpha-ständig zu den Peptidbindungen) entstehen [Zubarev et al. **1998**]. Die resultierenden Fragmentationen werden folglich als c- bzw. z-Ionen bezeichnet [Roepstorff & Fohlman **1984**]. Aus ihnen können, wie bei der CID aus den b- und y-Ionen, komplementäre Sequenzinformationen zum Vorläuferpeptidion bezogen werden. Die massenspektrometrische Bestimmung von ECD-Fragmenten, zusätzlich zu CID-Fragmenten des gleichen Vorläuferions, kann daher als weitere Informationsquelle dienen. Die Verknüpfung dieser Techniken stellt damit eine zusätzliche, sichere Grundlage zur Validierung der Peptidkandidaten aus einer DB-Suche oder *de novo*-Sequenzierung dar. ECD-Fragmente werden jedoch nur beobachtet, wenn das ursprüngliche Kation, an das das Elektron anlagert, mindestens zweifach geladen war. Einfach geladene Peptide allerdings, wie sie bei den MHC-Klasse-I bindenden Peptiden vorwiegend vorkommen, können mit der ECD-Fragmentierungstechnik nicht erfasst werden.

Im Gegensatz dazu ist die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte, neue Analysenmethode nicht auf mehrfach geladene Peptidvorläuferionen beschränkt. So konnten auch einfach geladene MHC-Klasse-I bindende Peptide durch Anwendung des neuen Validierungsverfahrens erfolgreich identifiziert werden, selbst wenn auf eine zusätzliche Synthese und MS/MS-Analyse der Referenzpeptide verzichtet wurde.

Außerdem konnte mithilfe der neuen Analysemethoden gezeigt werden, dass sogar autoproteolytisch entstandene Peptide mit unbekannter enzymatischer Entstehungsgeschichte eine nützliche Quelle für die Charakterisierung biologischer Proben darstellen. Die neue Methode umfasst dabei eine minimierte Probenaufarbeitung der untersuchten Krebszelllinien mittels unspezifischer Säureelution und Ultrafiltration und basiert auf einer verifizierbaren Auswertung von MS- und MS/MS-Daten aus einer Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICRMS/MS-Analyse. Es hat sich herausgestellt, dass die Kombination aus vereinfachter Probenaufarbeitung und hochpräziser Massenanalyse die sichere Peptid-/Proteinidentifizierung erheblich beschleunigt. Vor allem der Informationsgehalt der FTICR-MS- und MS/MS-Daten erwies sich als ideales Verifizierungskriterium, da sich bei ihrer Auswertung mögliche Aminosäurezusammensetzungen und deren Kombinationen einschränken und Primärstrukturen höchst zuverlässig erarbeiten und validieren lassen. Die *de novo*-Sequenzierung als DB-unabhängige Methode erlaubt eine Validierung der Ergebnisse, die in Standardverfahren der Proteomanalysen in der Regel nicht durchgeführt wird. Dazu nutzt das hier entwickelte Validierungsverfahren ein iteratives Zusammenspiel von schneller DB-Suche und zuverlässiger, kompositionsbasierter *de novo*-Sequenzierung auf Grundlage der höchstgenau gemessenen Massen (CBS-Methode [Spengler 2004]). Zudem liefert die CBS-Methode nahezu keine falsch positiven Ergebnisse, so dass nun auch Einzel-Peptid-Proteinidentifikationen mit nur einem einzelnen verifizierten Ergebnistreffer bei hoher DB-Sicherheit als Informationsquelle zugelassen werden können.

Die vorgestellte Methode erlaubt, anders als herkömmliche Verfahren, auch direkte, validierte Peptid- und Proteinidentifizierungen aus unspezifisch erzeugten, komplexen Peptidmischungen. Auf diese Weise werden natürliche Flüssigkeiten unterschiedlichster Art auch bei einer sehr stark vereinfachten Probenpräparation für die Proteomforschung zugänglich und können so bei der Aufklärung verschiedenster bioanalytischer Fragestellungen helfen.



## 6.1.2 TurboSEQUEST-Ergebnisse aus Lauf 2 von „Frk5-3“

Reference Scan(s)	Sequence	MH+ Charge	XC	Score Delta Cn	Accession Sp	Peptides (Hits) RSp	
#1 macrophage migration inhibitory factor (glycosylation- ... 521 - 523 525 527	F.IVNTNVPASVDPG.F F.IVNTNVPASVDPG.F F.IVNTNVPASVDPG.F	1438.77 1438.77 1438.77	2 2 2	3.80 3.84 3.12	0.27 0.21 0.23	30.19 633.9 775.2 535.0 16	3 (3 0 0 0) 6 1 15/26
#2 mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens] 393 - 395 397 404	L.RVAPEEHPVLL L.RVAPEEHPVLL L.RVAPEEHPVLL	1146.63 1146.63 1146.63	2 2 2	2.23 2.35 1.43	0.23 0.19 0.07	30.12 28336.0 490.3 400.6 339.8 185	3 (3 0 0 0) 7 92 10/18 9/18
#3 17 kda cyclophilin A (internal fragment) [human, first tr ... 619 - 625 627 769	F.DIAVDGEPLGR.X F.DIAVDGEPLGR.X F.DIAVDGEPLGR.X	1141.59 1141.59 985.48	2 2 1	3.54 3.47 2.44	0.13 0.12 0.13	28.19 1041969.0 1180.6 804.3 543.6 23	3 (2 1 0 0) 3 143 11/18
#4 uracil DNA glycosylase [Homo sapiens] 431 435 - 437 560	M.GKVKVGVNGFG.R M.GKVKVGVNGFG.R G.YSNRVVLL.M	1061.61 1061.61 965.51	2 2 2	2.95 3.29 2.19	0.36 0.16 0.06	28.16 35053.0 872.8 1175.7 619.0 65	3 (2 1 0 0) 6 5 11/14
#5 <u>unnamed protein product [Homo sapiens]</u> 421 423 425	<u>A.SSPGGVYATRSSAVRLR.S</u> <u>G.SALRPSTSRSLYA.S</u> <u>A.SSPGGVYATRSSAVRLR.S</u>	<u>1763.95</u> <u>1408.75</u> <u>1763.95</u>	<u>3</u> <u>3</u> <u>3</u>	<u>1.76</u> <u>3.42</u> <u>2.03</u>	<u>0.18</u> <u>0.32</u> <u>0.15</u>	<u>26.17</u> <u>1002.1</u> <u>734.1</u> <u>37848.0</u>	<u>3 (2 0 1 0)</u> <u>1</u> <u>1</u> <u>24/64</u> <u>26/48</u> <u>29/64</u>
#6 <u>dual specificity phosphatase 2: Dual specificity phosphatase 2 [Homo sapiens]</u> 591 672 - 678 680	<u>M.VEISAWFOEAIQ.F</u> <u>G.VISPNF.S</u> <u>G.VISPNF.S</u>	<u>1349.67</u> <u>676.37</u> <u>676.37</u>	<u>3</u> <u>1</u> <u>1</u>	<u>2.38</u> <u>1.15</u> <u>1.67</u>	<u>0.11</u> <u>0.08</u> <u>0.06</u>	<u>20.18</u> <u>4759206.0</u> <u>845.2</u> <u>216.9</u> <u>237.2</u> <u>42</u>	<u>3 (0 2 0 1)</u> <u>197</u> <u>7/10</u> <u>7/10</u>
#7 <u>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1: CTC [Homo sapiens]</u> 599 603	<u>T.FAPVNVITTEVK.S</u> <u>T.FAPVNVITTEVK.S</u>	<u>1204.66</u> <u>1204.66</u>	<u>2</u> <u>2</u>	<u>2.50</u> <u>2.52</u>	<u>0.26</u> <u>0.20</u>	<u>20.13</u> <u>4503471.0</u> <u>380.2</u> <u>242.3</u> <u>48</u>	<u>2 (2 0 0 0)</u> <u>9</u> <u>14/20</u> <u>14/20</u>
#8 similar to aldo-keto reductase family 1, member B10; al ... 777 781 - 787	E.DYPFDA.E E.DYPFDA.E	727.29 727.29	1 1	1.92 1.76	0.23 0.11	20.10 37551249.0 230.1 227.3 62	2 (2 0 0 0) 68 7/10
#9 <u>retinitis pigmentosa RP1 protein: oxygen-regulated protein 1 [Homo sapiens]</u> 358 413	<u>E.ILKHAITEEADDLK</u> <u>A.ACSFSADV.S</u>	<u>1580.85</u> <u>799.33</u>	<u>3</u> <u>2</u>	<u>1.61</u> <u>1.48</u>	<u>0.06</u> <u>0.12</u>	<u>20.08</u> <u>5454016.0</u> <u>403.2</u> <u>370.5</u> <u>90</u>	<u>2 (2 0 0 0)</u> <u>240</u> <u>16/52</u> <u>9/14</u>
#10 <u>LAK-4p [Homo sapiens]</u> 650 652 654	<u>V.FSEF.M</u> <u>V.FSEF.M</u> <u>V.FSEF.M</u>	<u>529.23</u> <u>529.23</u> <u>529.23</u>	<u>1</u> <u>1</u> <u>1</u>	<u>1.11</u> <u>0.89</u> <u>1.10</u>	<u>0.05</u> <u>0.28</u> <u>0.01</u>	<u>20.06</u> <u>7209574.0</u> <u>242.0</u> <u>182.0</u> <u>200.7</u> <u>39</u>	<u>3 (1 1 0 0)</u> <u>10</u> <u>4/6</u> <u>4/6</u>
#11 <u>Z288-HUMAN Zinc finger protein 288 (Dendritic derivative) [Homo sapiens]</u> 365 457	<u>P.HQCSICWRSFSLKDY</u> <u>Q.PSVNITFIQQPLP</u>	<u>1709.79</u> <u>1172.63</u>	<u>3</u> <u>2</u>	<u>1.34</u> <u>1.35</u>	<u>0.08</u> <u>0.21</u>	<u>18.29</u> <u>17380345.0</u> <u>407.1</u> <u>693.6</u> <u>40</u>	<u>2 (1 1 0 0)</u> <u>83</u> <u>12/20</u>
#12 <u>desmoglein 2 preproprotein: HDGC, included [Homo sapiens]</u> 358 463	<u>S.YVTGSTMPTT.T</u> <u>K.PATETSMINTASHS.L</u>	<u>1053.49</u> <u>1333.57</u>	<u>2</u> <u>2</u>	<u>1.03</u> <u>2.16</u>	<u>0.11</u> <u>0.12</u>	<u>18.11</u> <u>4503403.0</u> <u>266.6</u> <u>1224.9</u> <u>2</u>	<u>2 (1 1 0 0)</u> <u>73</u> <u>8/18</u> <u>26/48</u>
#13 <u>similar to zinc finger protein 207 [Homo sapiens]</u> 393 - 395 399	<u>P.PVMPAMPQGLH.H</u> <u>P.PVMPAMPQGLH.H</u>	<u>1146.58</u> <u>1146.58</u>	<u>2</u> <u>2</u>	<u>1.72</u> <u>1.27</u>	<u>0.30</u> <u>0.02</u>	<u>18.09</u> <u>37549438.0</u> <u>344.6</u> <u>306.9</u> <u>200</u>	<u>2 (1 1 0 0)</u> <u>108</u> <u>11/20</u> <u>10/20</u>
#14 <u>similar to KIAA1074 protein [Homo sapiens]</u> 417 451	<u>S.EIASECCE.L</u> <u>R.EARLSQLQSENMLLPQQLDDA.Y</u>	<u>883.32</u> <u>2399.19</u>	<u>2</u> <u>2</u>	<u>1.16</u> <u>0.57</u>	<u>0.05</u> <u>0.16</u>	<u>16.22</u> <u>37545342.0</u> <u>303.4</u> <u>33.5</u> <u>42</u>	<u>2 (0 2 0 0)</u> <u>55</u> <u>10/14</u> <u>4/40</u>
#15 <u>rasGTPase activating protein [Homo sapiens]</u> 381 - 387 650 654	<u>K.TIQTLSWGSLS.K</u> <u>F.MCEFF.F</u> <u>F.MCEFF.F</u>	<u>1249.64</u> <u>529.18</u> <u>529.18</u>	<u>2</u> <u>1</u> <u>1</u>	<u>1.59</u> <u>1.02</u> <u>0.98</u>	<u>0.10</u> <u>0.10</u> <u>0.11</u>	<u>16.18</u> <u>1871475.0</u> <u>331.7</u> <u>162.3</u> <u>181.8</u> <u>68</u>	<u>3 (1 0 0 1)</u> <u>163</u> <u>4/6</u> <u>4/6</u>
#16 <u>hypothetical protein MGC4161 [Homo sapiens]</u> 397 558	<u>G.SLKEHQRIH.S</u> <u>N.RESPGQAGMNSIHSPGASPVSHPD.G</u>	<u>1147.63</u> <u>2512.16</u>	<u>2</u> <u>3</u>	<u>1.87</u> <u>1.20</u>	<u>0.21</u> <u>0.13</u>	<u>16.09</u> <u>13236532.0</u> <u>439.2</u> <u>167.0</u> <u>136</u>	<u>2 (1 0 1 0)</u> <u>55</u> <u>11/16</u> <u>13/96</u>
#17 <u>Nance-Horan syndrome (congenital cataracts and dental anomalies) [Homo sapiens]</u> 540 640	<u>G.FSSKFSATSASAR.V</u> <u>A.RAVPAPSGLPPPP.P</u>	<u>1346.67</u> <u>1352.77</u>	<u>2</u> <u>3</u>	<u>1.57</u> <u>1.36</u>	<u>0.15</u> <u>0.14</u>	<u>16.08</u> <u>38093637.0</u> <u>464.9</u> <u>564.3</u> <u>86</u>	<u>2 (1 0 1 0)</u> <u>199</u> <u>13/24</u> <u>19/52</u>
#18 <u>LIM domains containing 1 [Homo sapiens]</u> 521 - 523 527	<u>S.VLLDSPSPRVRL.P</u> <u>S.VLLDSPSPRVRL.P</u>	<u>1438.84</u> <u>1438.84</u>	<u>2</u> <u>2</u>	<u>2.79</u> <u>2.26</u>	<u>0.31</u> <u>0.31</u>	<u>14.41</u> <u>7657307.0</u> <u>526.6</u> <u>354.3</u> <u>146</u>	<u>2 (0 1 1 0)</u> <u>12</u> <u>12/24</u>
#19 <u>myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult [Homo sapiens]</u> 777 781 - 787	<u>Y.DYPFVS.Q</u> <u>Y.DYPFVS.Q</u>	<u>727.33</u> <u>727.33</u>	<u>1</u> <u>1</u>	<u>1.47</u> <u>1.34</u>	<u>0.31</u> <u>0.31</u>	<u>14.31</u> <u>8923940.0</u> <u>220.2</u> <u>220.8</u> <u>75</u>	<u>2 (0 1 1 0)</u> <u>85</u> <u>6/10</u> <u>7/10</u>
#20 <u>KIAA1419 protein [Homo sapiens]</u> 358 415	<u>W.VMDTYPWAA.S</u> <u>V.SSINSATSHSSVGSNIES.D</u>	<u>1053.47</u> <u>1763.80</u>	<u>2</u> <u>3</u>	<u>0.98</u> <u>1.65</u>	<u>0.13</u> <u>0.12</u>	<u>14.13</u> <u>20521916.0</u> <u>246.2</u> <u>480.8</u> <u>19</u>	<u>2 (0 1 1 0)</u> <u>142</u> <u>7/16</u> <u>22/68</u>



6.1.3 TurboSEQUEST-Ergebnisse aus Lauf 3 von „Frk5-3“

Reference Scan(s)	Sequence	MH+ Charge	XC	Delta Cn	Score	Accession	Sp	Peptides (Hits)
#1 similar to Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) [H...	L.FADKVPKTAENFR.A	1522.80	3	4.50	0.37	6679439.0	1	5 (5 0 0 0 0)
456 - 458	L.FADKVPKTAENFR.A	1522.80	3	4.21	0.34	2948.5	1	30/48
460	S.MANAGPNTNGSQF.F	1308.56	2	3.49	0.13	2394.7	1	28/48
544	S.MANAGPNTNGSQF.F	1308.56	2	2.33	0.13	1049.1	40	15/24
548	G.EKFEDENF.I	1057.45	2	1.85	0.05	699.4	37	15/24
582						491.8	76	11/14
#2 <b>CSD3 protein isoform 2 [Homo sapiens]</b>	...				32.07	34330133.0		4 (2 0 2 0 0)
362	QLNGHWSGSQPHCS.G	1409.60	2	0.72	0.11	132.3	83	6/24
630	C.QNPQTANGK.V	916.45	2	1.40	0.00	695.9	94	12/18
716	S.NMELLSSGVYKSGEA.R	1681.86	2	0.57	0.13	121.9	51	6/28
756	T.VLQLVLT.G	672.43	1	1.08	0.00	189.6	37	5/10
#3 macrophage migration inhibitory factor (glycosylation- ...	F.IVNTNVPRASVPDG.F	1438.77	2	3.93	0.28	4505185.0	1	3 (3 0 0 0 0)
526	F.IVNTNVPRASVPDG.F	1438.77	2	4.02	0.28	761.8	1	18/26
528 - 532	F.IVNTNVPRASVPDG.F	1438.77	2	2.88	0.19	775.0	2	19/26
536 - 538	F.IVNTNVPRASVPDG.F	1438.77	2	2.88	0.19	471.2	23	14/26
#4 mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]	...				30.12	28336.0		3 (3 0 0 0 0)
401 - 403	L.RVAPEEHPVLL	1146.63	2	2.38	0.28	399.8	24	11/18
405 - 411	L.RVAPEEHPVLL	1146.63	2	2.11	0.18	577.0	3	13/18
415	L.RVAPEEHPVLL	1146.63	2	1.43	0.03	404.8	228	10/18
#5 enolase 1; phosphopyruvate hydratase; MYC promoter ...	K.IHAREIFD.S	1000.52	2	2.14	0.00	4503571.0		3 (3 0 0 0 0)
450 - 452	L.FTSKGLFR.A	955.54	2	1.74	0.02	489.6	113	10/14
486	L.FTSKGLFR.A	955.54	2	1.68	0.20	701.8	18	11/14
490						562.7	47	11/14
#6 uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]	...				28.24	35053.0		3 (2 1 0 0 0)
442 - 444	M.GKVKVGVNGFG.R	1061.61	2	3.16	0.21	1475.6	1	16/20
446	M.GKVKVGVNGFG.R	1061.61	2	2.99	0.20	1533.0	1	16/20
574	G.YSNRVVDL.M	965.51	2	1.98	0.19	671.3	98	11/14
#7 17 kda cyclophilin A (internal fragment) [human, first tr ...	F.DIADVGEPLGR.X	1141.59	2	3.64	0.19	1041969.0		2 (2 0 0 0 0)
632 - 634	F.DIADVGEPLGR.X	1141.59	2	3.54	0.22	774.4	109	13/20
636 - 642						764.9	90	13/20
#8 EDARADD protein [Homo sapiens]	...				20.15	28422655.0		2 (2 0 0 0 0)
450 - 452	K.IHAREIFD.S	1000.52	2	2.14	0.14	489.6	113	10/14
515	F.RAAVPSGASTGIYE.V	1378.70	2	3.02	0.23	777.6	4	15/26
#9 <b>KBF1_HUMAN Nuclear factor NF kappa-B p105 subunit</b> ...	...				20.12	21542418.0		2 (2 0 0 0 0)
570-572	K.DMVMVGFANL.G	965.48	2	2.44	0.15	518.8	213	11/16
574	K.DMVMVGFANL.G	965.48	2	2.17	0.09	846.8	8	13/16
#10 similar to Protein CDC27Hs (Cell division cycle protein ...	...				18.16	29735853.0		2 (1 1 0 0 0)
554	Y.EGRAVVCLQ.M	974.51	2	3.13	0.14	736.2	38	14/16
564	Y.EGRAVVCLQ.M	974.51	2	2.65	0.05	859.3	37	14/16
#11 LIM domains containing 1 [Homo sapiens]	...				16.42	7657307.0		2 (0 2 0 0 0)
526	S.VLLDSPSSPRVRL.P	1438.84	2	2.81	0.38	542.2	20	15/24
528-532	S.VLLDSPSSPRVRL.P	1438.84	2	2.90	0.37	555.6	9	16/24
#12 similar to 60S ribosomal protein L32 [Homo sapiens]	...				16.33	37552604.0		2 (0 2 0 0 0)
442-444	D.GQVQVKCNW.W	1061.52	2	2.50	0.25	1001.0	9	13/16
446	D.GQVQVKCNW.W	1061.52	2	2.39	0.22	985.4	38	13/16
#13 Ca2+-channel protein alpha1 subunit D CG4894-PA [Dr ...	M.DFERGASGEGGFSPNGNGGPGSGD.V	2224.91	3	2.29	0.08	19584591.0		2 (1 0 1 0 0)
468	P.ETMNGTITIGPSGAGGQKGGAA.A	1861.87	3	1.74	0.18	756.2	9	25/92
644						473.9	43	24/80
#14 alpha3 type IV collagen [Homo sapiens]	...				16.14	13559798.0		2 (1 0 1 0 0)
292	L.SLPQSPQPPGTPEPEGM	1403.68	2	1.48	0.11	292.1	47	24/60
524	G.PPGEAGPRGELSVSTP.V	1550.78	3	2.70	0.15	1338.6	4	28/60
#15 similar to submaxillary apomucin [Homo sapiens]	...				16.09	37542945.0		3 (1 0 0 1 1)
507-509	S.AGLTGTIGSPAIVRGTIW.P	1715.91	3	1.74	0.14	428.0	194	25/68
522	T.TGLSTEVTGTITGPSAGATGT.T	1765.85	3	1.76	0.18	526.8	81	26/76
534	T.GPSADGSGTIG.P	906.38	2	1.26	0.01	498.7	139	11/20
#16 Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) [Homo sapie ...	S.MANAGPITNGSQF.F	1307.61	2	3.02	0.29	1049.1	40	15/24
544	S.MANAGPITNGSQF.F	1307.61	2	1.76	0.25	699.4	37	15/24
548								
#17 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent res ...	L.IAVFK.T	577.37	1	1.27	0.03	16741295.0		3 (0 0 1 2 0)
664	L.IAVFK.T	577.37	1	1.63	0.08	261.2	25	5/8
668	L.IAVFK.T	577.37	1	1.45	0.13	338.4	26	6/8
670-674						316.6	27	6/8
#18 C-Chain C. Structure Of The Human Nuclear Cap-Bindin ...	L.IAVFQ.Q	577.34	1	1.27	0.15	24987336.0		3 (0 0 1 2 0)
664	L.IAVFQ.Q	577.34	1	1.63	0.08	261.2	25	5/8
668	L.IAVFQ.Q	577.34	1	1.63	0.08	338.4	26	6/8
670-674						316.6	27	6/8
#19 Rho GTPase-activating protein-8 isoform 2; BCH doma ...	V.IAVFQ.R	577.34	1	1.27	0.15	31317218.0		3 (0 0 1 2 0)
664	V.IAVFQ.R	577.34	1	1.63	0.08	261.2	25	5/8
668	V.IAVFQ.R	577.34	1	1.63	0.08	338.4	26	6/8
670-674						316.6	27	6/8
#20 kinesin family member 5A; spastic paraplegia 10 (autoc ...	L.KNTASVNL.E.L	975.51	2	2.37	0.14	4826808.0		2 (0 1 1 0 0)
556	L.KNTASVNL.E.L	975.51	2	2.43	0.08	812.2	4	14/16
564						1061.2	4	15/16

## 6.2 Beispiele von Peptidkandidaten aus der unspezifischen Aufreinigung der A498

Probe: C8-Fraktion 5 (Säureelution und *Cut Off* < 3 kDa)  
 Aufnahmemodus: *UltimatePlus* + *LTQ FT* („Dep MS/MS“ aus Tab. 3-7)  
 Filterparameter: „+/- 0.01 u“; „XC > 0.5“; „Delta Cn > 0.1“ (Parameter 1 in Tab. 3-9)

Hier wurden zur Veranschaulichung der Vorgehensweise für die neue Validierungsmethode in Kapitel 4.3.1 nur einige Peptidkandidaten ausgewählt und auf eine Auflistung der sehr großen fehlerbehafteten Kandidatenlisten verzichtet:

Time(s)	Reference	Peptide	MH+	z	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions
33.66	<a href="#">hypothetical protein LOC22978 [Homo sapiens]</a>	VIPSNE	676.37	1	0.85	0.14	134.5	41	5/10
33.66	<a href="#">hypothetical protein FLJ20257 [Homo sapiens]</a>	VLPSNE	676.37	1	0.85	0.13	134.5	41	5/10
33.46	<a href="#">novel protein [Homo sapiens]</a>	KGPEVF	676.37	1	0.82	0.19	190.0	2	6/10
33.76	<b>A Chain A, Human Cyclophilin A Complexed With 2-Thr Cy ...</b>	VNPTVF	676.37	1	0.82	0.15	105.9	29	4/10
33.56	<a href="#">Neuromedin B receptor [Homo sapiens]</a>	SVPNIE	676.37	1	0.82	0.14	100.2	89	5/10
33.56	<a href="#">nuclear orphan receptor ROR beta [Homo sapiens]</a>	SVPNIE	676.37	1	0.82	0.12	100.2	89	5/10
33.46	<a href="#">KIAA1862 protein [Homo sapiens]</a>	VSPQVE	676.37	1	0.65	0.23	59.4	77	4/10
33.46	<a href="#">protocadherin beta 11 precursor variant [Homo sapiens]</a>	SPVGAVF	676.37	1	0.66	0.20	130.7	8	5/12
	...	...							
26.11	<a href="#">similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2M</a>	NNRQLL	757.43	1	1.19	0.13	146.4	3	5/10
26.29	<a href="#">cardiomyopathy associated 5 [Homo sapiens]</a>	NNQRLL	757.43	2	1.12	0.18	119.3	79	5/10
26.11	<b>Transgelin 2 [Homo sapiens]</b>	MPRQIL	757.44	1	1.10	0.18	142.3	4	5/10
26.07	<a href="#">unnamed protein product [Homo sapiens]</a>	KDLTAPL	757.45	2	1.01	0.11	128.5	26	6/12
25.96	<a href="#">KIAA1669 protein [Homo sapiens]</a>	AVGAGGRGL	757.43	2	0.74	0.11	132.4	17	7/16
25.96	<a href="#">ATP-binding cassette, sub-family C, member 11</a>	PMAGRIL	757.44	2	0.69	0.18	95.7	73	5/12
	...	...							
21.32	<a href="#">ADP-ribosylation factor protein 4 [Homo sapiens]</a>	RPLWKHYF	1146.62	2	1.09	0.33	183.9	2	8/14
18.99	<a href="#">immunoglobulin lambda chain variable region [Homo sapiens]</a>	PRLLIYGNSN	1146.63	2	0.89	0.12	51.4	31	4/18
21.22	<b>A Chain A, The Yeast Actin Val 159 Asn Mutant Complex ...</b>	RVAPEEHPVL	1146.63	2	0.84	0.10	141.6	1	6/18
18.99	<a href="#">KIAA1645 protein [Homo sapiens]</a>	RPLLLAGYED	1146.62	2	0.78	0.14	51.4	31	4/18
19.18	<a href="#">S31927 drop9 protein - human (fragment)</a>	EGRRSSVKVE	1146.62	2	0.58	0.10	79.4	31	5/18
	...	...							

Validierte Ergebnisse für die drei Beispiele nach Verifizierung mit CBS-Methode:

m/z (beobachtet)	[M+H] <sup>+</sup> (berechnet)	Massen- abweichung	Peptidsequenz	Ursursungsprotein (AA-Position)	UniProtKB accession
676.3656 <sup>+1</sup>	676.3665	- 1.3 ppm	VNPTVF	Cyclophilin A, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, PPIA (2-7)	P62937
757.4378 <sup>+1</sup>	757.4395	- 1.5 ppm	MPRQIL	Transgelin 2, TAGLN2 (194-199)	P37802
573.8162 <sup>+2</sup>	1146.6266	- 1.3 ppm	RVAPEEHPVL	beta-Actin, ACTB (95-104)	P60709



Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung

		196.2	2.4e-008	12511.2	49465263_21 (18 1 1 0 1)
3	<b>gi 49465263 emb CAC46462.1 MIF [Homo sapiens]</b>				
	A498B_5, 2162 - 217 M.FVIVNT	1 395	2 1e-002	161.6	1 7/15
	Fk4-3_003, 837 - 841 V.HVVPDQL M	807.44	3 8e-002	0.252	1 4/18
	Fk6-3_003, 1149 R.A.SVPDGLS.E	892.44	1 4.2e-002	0.055	1 6/24
	Fk4-3_003, 476 - 480 F.IVNTVPR.A	912.53	2 4.3e-002	12.5	1 2/21
	Fk5-3_003, 655 Y.IAVHVVDQL	977.54	2 0.3	0.002	6 3/24
	Fk4-3_003, 685 - 692 N.TNVPASVDPG F	1112.57	2 2.7e-003	18.0	3 3/30
	Fk4-3_003, 950 - 954 M.NAANVGWNNST.F	1147.51	1 2.6e-004	166.8	1 10/30
	Fk6-3_003, 899 - 915 R.ISPDRVYNY.Y	1239.64	1 1.8e-003	175.2	1 10/27
	A498B_5, 1490 - 151 M.NAANVGWNNST.F.A.	1365.62	2 3.5e-002	106.0	1 9/36
	A498B_4, 1494 Y.YDMNAANVGWNN.S	1368.56	2 4.2e-002	119.9	1 12/33
	A498B_4, 887 - 924 A.ERLRISPRVY.I	1403.78	3 5.8e-002	0.155	2 4/60
	Fk7-3_003, 967 - 988 N.TNVPASVDPGFLS.E	1459.75	2 0.1	0.845	1 4/39
	Fk5-3_003, 770 - 778 L.TQGLAGATKPPQY.I	1530.79	2 4.3e-002	0.432	1 7/39
	A498B_5, 1498 - 154 Y.YDMNAANVGWNNST.F	1556.64	2 2.7e-005	0.701	1 12/39
	A498B_7, 1785 - 180 Y.YDMNAANVGWNNST.F.A.	1774.75	2 3.7e-005	0.725	2 14/45
	A498B_7, 1604 - 162 F.IVNTVPRASVDPGFLS.E	1785.95	2 7.8e-005	0.355	1 8/48
	A498B_5, 1290 L.TQGLAGATKPPQYI.V.H	1813.98	2 3.4e-004	2.226	1 11/48
	Fk7-3_003, 1103 - 111 F.IVNTVPRASVDPGFLS.E	1914.99	2 6.0e-006	2.873	1 12/51
	Fk8-3_003, 1071 - 101 M.FVNTVPRASVDPGFLS.E	1933.02	2 2.4e-008	0.643	1 12/51
	Fk6-3_003, 789 L.AGATKPPQYI.V.HVVPDQL	2019.07	2 3.1e-003	0.207	1 5/54
	Fk7-3_003, 902 - 915 L.TQGLAGATKPPQYI.V.HVVPDQL	2489.31	2 1.8e-003	0.001	38 2/66
4	<b>gi 12803567 gb AAH02616.1 Transgelin 2 [Homo sapiens]</b>	<b>72.2</b>		<b>22392.2</b>	<b>12803567_8 (6 0 2 0 0)</b>
	Fk5-3_003, 811 - 819 G.MPRGLL.-	757.44	1 7.8e-002	1.387	1 6/15
	A498B_5, 1578 L.IQMITT.Q	761.42	1 8.4e-002	1.363	1 7/15
	Fk5-3_003, 906 - 914 A.VARDGLFS.G	979.48	2 0.1	0.741	6 3/24
	A498B_5, 1292 L.MNLGGLAVAR.D	1001.56	2 7.3e-005	0.423	1 12/27
	A498B_5, 1338 L.MNLGGLAVARDDGL	1288.63	2 3.0e-007	2.281	1 10/36
	Fk7-3_003, 1183 - 111 L.LGGLAVARDDGLFS.G	1390.73	2 1.373	0.420	53.9
	Fk4-3_003, 746 - 752 G.LMGTRNGASGAGMTG.Y	1579.73	2 5.8e-008	3.021	1 14/45
	Fk6-3_003, 691 G.LMGTRNGASGAGMTGY.G.M	1799.82	2 1.2e-002	0.711	45.3
5	<b>gi 3979379 gb AAH63511.1 EEF1A1 protein [Homo sapiens]</b>	<b>224.2</b>		<b>31040.2</b>	<b>3979379_25 (19 3 1 0 2)</b>
	Fk4-3_003, 1034 - 10 A.FVPSG.W	619.34	1 0.2	0.314	1 3/15
	Fk4-3_003, 1136 - 11 S.DYPLG.R	661.32	1 7.8e-002	0.989	1 8/15
	Fk4-3_003, 1069 - 10 F.SDYPLG.R	748.35	1 1.5e-002	1.108	1 5/18
	Fk6-3_003, 1077 - 10 S.FSDYPLG.R	895.42	1 3.2e-002	0.924	1 5/21
	A498B_6, 1521 S.DYPLGRF.A	964.49	1 0.3	0.535	13 3/21
	A498B_6, 1501 - 152 S.DYPLGRF.A.V	1035.53	2 9.1e-004	1.472	34.5
	A498B_6, 1425 F.SDYPLGRF.A	1051.52	2 4.2e-003	0.870	86.8
	Fk6-3_003, 767 - 771 E.TOVLKPMVYTF	1101.63	2 3.5e-002	0.888	1 6/30
	Fk4-3_003, 445 - 468 Y.IKKIGYNDP.Y	1148.63	2 2.9e-004	0.731	50.9
	A498B_6, 2275 - 228 A.FVPSG.WND.M	1190.69	2 1.4e-003	1.256	1 9/30
	A498B_6, 1704 R.DMRGTVAVGVK.A	1205.56	1 8.3e-003	0.943	33.2
	A498B_6, 1597 Q.DVYIKGIGTVPGR	1376.74	2 0.2	0.946	209 14.9
	Fk7-3_003, 919 - 923 L.NHPGGSAGYAPVLD	1423.73	2 0.4	0.330	7.7
	Fk6-3_003, 720 - 727 G.RVETGVLPKPMVYTF	1485.85	2 3.3e-003	2.191	0.470
	A498B_6, 2143 - 215 K.SDAAFLKSDAAVDM.P.C	1487.72	2 4.8e-002	0.621	24.9
	A498B_4, 1210 E.DGPKFLKSDAAVDM.M	1532.80	2 0.2	1.083	22.0
	Fk6-3_003, 804 - 809 E.VSTYIKKIGYNDP.Y	1727.89	2 6.9e-005	1.637	0.542
	Fk8-3_003, 991 V.PVGRVETGVLPKPMVYTF	1738.99	2 0.1	0.541	15.6
	Fk8-3_003, 1179 - 111 R.LP.LQD.VYIKGIGTVPGR	1826.04	2 0.2	1.374	40.1
	Fk6-3_003, 1026 - 10 G.VILNHPGGSAGYAPVLD	1862.05	2 2.2e-007	3.970	0.625
	A498B_4, 1581 G.WKVKTRKDNASGATLLE.A	1875.99	2 4.5e-007	0.582	8.1
	Fk8-3_003, 997 - 101 G.VILNHPGGSAGYAPVLD.C	1977.08	2 1.4e-007	3.982	0.622
	Fk6-3_003, 920 - 923 K.IGGIGTVPGR.VETGVLPKPMVYTF	2336.34	2 0.3	0.452	0.096
	A498B_8, 1711 G.DVYIKGIGTVPGR.VETGVLPKPMVYTF	2841.59	3 6.6e-004	1.932	86.1

Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung

6	gi116924231 gb AAH17386.1 ribosomal protein S19 [Homo sapiens]	1.9e-007	60.2	17271.2	16924231	6 (6 0 0 0 0)
	FR4-3_003_861 - 872 V PGGTVKDVNGGEF V	1313.67	2	7.4e-006	2.932	0.804
	A498B_4_1156 V PGGTVKDVNGGEF V	1460.74	2	2.4e-007	1.593	0.586
	A498B_6_618 - 795 WFFYTRAASTARHLYL R	1669.88	3	0.4	1.268	0.027
	A498B_4_1066 V PGGTVKDVNGGEFV R A	1715.91	3	5.7e-006	3.441	0.573
	A498B_5_1143 V PGGTVKDVNGGEFV R A L	1786.94	3	1.9e-007	1.662	0.505
	A498B_7_1554 V PGGTVKDVNGGEFV R A A	1971.07	3	9.9e-002	0.717	0.193
7	gi112803339 gb AAH02468.1 PAL-1 mRNA-binding protein, isoform 2 [Homo sapiens]	5.2e-007	20.1	44177.1	12803339	2 (2 0 0 0 0)
	FR4-3_003_1230 - 12 D DESDPE V	838.31	1	6.0e-002	1.075	0.000
	A498B_4_1562 L FDDSDPFE V	1100.41	1	5.2e-007	1.685	0.571
8	gi151460711 ref XP_097846.1 PREDICTED: similar to Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP)	6.7e-007	20.2	23677.2	51460711	2 (2 0 0 0 0)
	FR4-3_003_1186 - 12 MPVLSKWSGRLS L	1285.68	2	1.4e-005	1.623	0.404
	FR4-3_003_1253 - 12 MPVLSKWSGRLS L R	1398.76	2	6.7e-007	3.391	0.551
9	gi151475872 ref XP_377928.2 PREDICTED: similar to Calcigzarin (S100C protein) (MLN 70) [Homo sapiens]	1.1e-006	20.2	12538.4	51475872	2 (2 0 0 0 0)
	A498B_7_1965 - 197 LIGGLAMACHDSF L	1221.54	2	1.1e-006	3.241	0.623
	FR4-3_003_780 - 783 LIGGLAMACHDSFL K A	1462.72	2	1.7e-002	1.355	0.511
10	gi14185720 gb AAD09172.1 ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 [Homo sapiens]	1.4e-006	10.1	23011.6	4185720	1 (1 0 0 0 0)
	FR4-3_003_915 - 916 L FNVDDHLYE L	1207.54	2	1.4e-006	1.840	0.515
11	gi151467768 ref XP_016993.3 PREDICTED: similar to Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF	1.7e-006	30.1	24940.6	51467768	3 (3 0 0 0 0)
	FR4-3_003_916 - 926 R LPEGDLG K	700.35	1	0.2	1.524	0.026
	FR4-3_003_739 - 751 G IDIFGKYE D	1213.65	2	3.8e-003	1.107	0.355
	FR4-3_003_850 - 859 L SAMTEEAAYAKAMAK -	1621.83	2	1.7e-006	1.988	0.864
12	gi147115317 emb CAC28618.1 VIM [Homo sapiens]	1.9e-006	126.1	53547.2	47115317	13 (11 2 0 0 0)
	A498B_7_2225 - 223 S LPLNFS S	700.40	1	5.1e-002	1.290	0.093
	A498B_6_1695 S LPLNFS S	787.43	1	0.2	1.194	0.126
	A498B_4_1188 - 119 S VPGVRLQL D	881.56	2	2.5e-003	1.661	0.307
	A498B_5_1322 R SSVPGVRLQL Q	927.56	2	0.1	1.029	0.229
	FR4-3_003_884 - 897 R SSVPGVRLQL D	1055.62	1	4.8e-002	2.008	0.013
	FR4-3_003_479 - 488 K TVETRDGVNIE	1231.62	2	0.3	0.587	0.180
	FR4-3_003_471 A SPPGGVYATRSSA V	1238.60	2	0.2	0.491	0.003
	FR4-3_003_544 - 546 G SALRPPSTRSLYA S	1406.75	2	0.2	0.567	0.128
	FR4-3_003_451 - 459 A SPPGGVYATRSSAV R L	1494.77	2	0.1	1.299	0.012
	A498B_4_994 S LGSALRPPSTRSLYA S	1578.86	3	8.8e-003	1.159	0.106
	FR4-3_003_474 K TVETRDGVNIEGHHDDL	2180.98	2	4.5e-002	0.792	0.414
	A498B_4_803 - 805 K TVETRDGVNIEGHHDDLE -	2423.11	3	1.9e-006	1.226	0.395
	A498B_4_914 - 916 G GPGTASRPSRSSVYVITSTRYSLG S	2576.27	3	3.5e-002	1.252	0.138
13	gi1565169 gb AAB31203.1 early pregnancy factor, EPF-chaperonin 10 homolog [human, platelets, Pepti	2.0e-006	30.1	3140.5	565169	3 (3 0 0 0 0)
	A498B_4_1316 G DILGKYVD -	922.49	2	4.4e-002	1.670	0.083
	A498B_4_1420 - 142 R DGLGKYVD -	1094.54	2	5.6e-004	2.331	0.487
	A498B_6_1383 - 139 L FRDGLGKYVD -	1397.71	2	2.0e-006	2.336	0.496
14	gi156967119 pdb 1XJL B Chain B, structure of Human Annexin A2 In The Presence Of Calcium Ions	2.0e-006	20.1	36459.8	56967119	2 (2 0 0 0 0)
	FR4-3_003_1253 - 12 G DGEFSM D	914.46	2	0.5	0.692	0.291
	A498B_4_1676 - 167 Y YVGGDTHGDKALL	1833.90	2	2.5e-006	1.343	0.589
15	gi15542166 pdb 1CF0 B Chain B, Human Platelet Profilin Complexed With An L-Profilin- Iodotyrosine Pept	3.8e-006	114.2	14842.5	5542166	12 (9 3 0 0 0)
	FR4-3_003_1253 - 12 G DGEFSM D	685.25	1	0.1	1.202	0.276
	FR4-3_003_829 - 833 F VNIPTAE V	743.39	1	5.9e-002	1.182	0.115
	FR4-3_003_1040 - 10 F YNGLTLG G	836.45	1	0.3	1.353	0.075
	A498B_7_2167 - 217 NITPAEYGLV G K	1054.61	2	0.1	0.973	0.243
	A498B_8_1897 - 189 F VNIPTAEYGLV G K	1267.73	2	8.2e-004	1.523	0.466
	A498B_6_1449 A AVPKITVNIPTAEV G V	1599.87	2	0.3	0.888	0.001
	A498B_6_1461 WAAVPGKITVNIPTAEV G V	1670.91	2	2.0e-002	1.636	0.177
	A498B_6_1907 F YNGLTLGQKCSV R D	1707.92	2	7.1e-006	1.272	0.565
	FR4-3_003_1187 - 111 A AVPKITVNIPTAEVGLV G K	1968.12	2	7.6e-004	1.151	0.323
	A498B_8_1678 - 168 F VNIPTAEYGLV G KDRSSF Y	1988.08	3	0.2	1.148	0.137
	FR4-3_003_1195 - 12 WAAVPGKITVNIPTAEVGLV G K	2039.15	2	5.2e-003	1.198	0.283
	A498B_4_903 L RKTSTGGAPTNNVYTKDKTL V	2323.26	3	3.6e-006	3.129	0.519

## Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung

16	<a href="#">gi 30584939 gb AAP36737.1 Homo sapiens S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin) [synthetic c]</a>	982.41	1	1.9e-005	50.1	11845.9	30584939	5 (5 0 0 0 0)
	FRk4-3_003_1118 - 11 T NSDGLDFSE	982.41	1	1.9e-005	1.627	0.358	111.1	1
	FRk4-3_003_722 V FGKYAGHDGYYNTL	1554.72	2	6.1e-005	2.006	0.811	122.8	1
	FRk6-3_003_681 V FGKYAGHDGYYNTLS.K	1754.84	2	1.2e-005	0.838	0.449	72.2	1
	FRk6-3_003_825 - 829 L IAVFGKYAGDGYNYTL	1837.91	2	4.2e-006	1.978	0.584	120.0	1
	A498B_6_1216 V FGKYAGHDGYYNTLSKTEF.L	2260.09	3	5.1e-005	2.764	0.817	197.6	1
17	<a href="#">gi 2982081 pdb 1AZV B.Chain.B, Familial AIs Mutant G37r-Cuznosod (Human)</a>	1116.57	1	3.7e-002	2.277	0.476	158.3	1
	FRk7-3_003_1451 - 14 K.GDGPVGGIINF.E	1244.66	2	9.9e-004	0.831	0.495	39.0	1
	FRk7-3_003_1143 - 11 L.KGDGPVGGIINF.E	1456.82	2	5.7e-006	1.314	0.388	96.4	1
	FRk7-3_003_1231 - 12 C.VLKGDPVGGIINF.E	1456.82	2	5.7e-006	1.314	0.388	96.4	1
18	<a href="#">gi 14250065 gb AAH08437.1 Calmodulin 2 [Homo sapiens]</a>	1401.66	2	3.7e-003	0.637	0.164	9.1	14
	FRk4-3_003_793 - 800 M.IREADIDGGVNY.Y	1695.76	2	7.8e-006	2.212	0.639	154.4	1
	A498B_4_1252 G.MIREADIDGGVNY.E	1695.76	2	7.8e-006	2.212	0.639	154.4	1
	FRk4-3_003_1523 - 15 Y.FILPDSLPLD.T	1129.61	1	1.3e-004	1.072	0.221	118.1	1
	FRk8-3_003_1523 - 15 Y.FILPDSLPLD.T	1230.66	1	1.0e-005	1.361	0.361	127.1	1
19	<a href="#">gi 32959008 emb CAE11897.1 small nuclear ribonucleoprotein Sm D4 [Homo sapiens]</a>	727.29	1	0.1	1.025	0.235	113.6	1
	FRk3-3_003_1317 - 13 E.DYPPDA.E	1280.54	2	1.1e-005	2.000	0.494	148.1	1
	A498B_5_1346 - 137 Q.SSHLEDYPPDA.E	1280.54	2	1.1e-005	2.000	0.494	148.1	1
20	<a href="#">gi 3098514 gb AAC15671.1 aldose reductase-related protein [Homo sapiens]</a>	833.40	1	0.2	1.043	0.000	96.5	1
	FRk5-3_003_1063 - 10 Y.VVESTGYFT.T	938.48	1	0.2	0.922	0.109	112.6	1
	FRk5-3_003_1378 - 13 A.INDPFDL.N	946.49	1	4.1e-002	1.375	0.144	148.6	1
	FRk5-3_003_890 - 907 G.YSNRYVDL.M	965.51	2	0.1	1.833	0.075	130.9	1
	FRk4-3_003_1041 - 10 R.VPTANVSYVDL	1000.53	1	0.2	1.230	0.205	117.2	1
	FRk5-3_003_903 - 910 A.FNSGKYDVA.I	1049.56	2	6.5e-002	0.636	0.085	52.0	1
	FRk4-3_003_712 - 720 M.GKVKYVNGFG.R	1061.61	2	1.7e-005	2.506	0.529	265.1	1
	FRk7-3_003_1414 - 14 L.ISWYDNEF.Y	1130.48	2	6.1e-005	1.364	0.519	112.2	1
	A498B_6_1431 E.FGYSNRVYVDL.M	1169.59	2	2.1e-004	1.447	0.412	87.1	1
	FRk5-3_003_735 - 737 T.RA.FNSGKYD.V	1177.63	2	7.5e-002	0.555	0.266	6.5	9
	FRk6-3_003_904 - 908 G.MAFRPTANV.S.V	1192.61	2	3.5e-002	0.880	0.249	16.4	1
	FRk5-3_003_866 - 875 G.NIPASTGA.AK.V.G.K	1269.72	2	1.4e-003	0.967	0.072	28.7	9
	FRk5-3_003_929 - 934 D.NEFGYSNRVYD.L	1299.60	2	2.8e-003	1.475	0.523	81.6	1
	A498B_5_1362 - 138 J.FRPTANVSYVDL	1303.70	2	8.8e-005	2.915	0.486	176.0	1
	FRk6-3_003_647 - 652 T.RA.FNSGKYDVA.I	1347.74	2	2.7e-004	1.188	0.395	51.5	1
	A498B_6_1485 D.NEFGYSNRVYD.L.M	1412.68	2	1.3e-003	2.075	0.470	257.0	1
	A498B_6_2054 - 207 J.FRPTANVSYVDL.T	1416.78	2	0.1	0.838	0.119	27.7	2
	FRk6-3_003_828 K.AENGLVINGNPT.I	1439.79	2	9.0e-002	0.401	0.257	4.4	19
	A498B_7_1636 G.MAFRPTANVSYVDL	1505.78	2	1.3e-005	1.932	0.342	63.1	1
	A498B_6_1607 Y.DNEFGYSNRVYD.L.M	1527.71	2	9.9e-004	3.045	0.610	343.5	1
	A498B_6_2136 G.MAFRPTANVSYVDL.T.C	1719.91	2	5.3e-003	0.675	0.124	28.8	4
	A498B_4_1068 G.ERDPSKIKWGDAGAEY.V	1821.88	3	7.3e-002	1.211	0.428	52.9	1
	A498B_6_1824 S.WYDNEFGYSNRVYD.L.M	1876.85	2	9.7e-005	0.318	0.394	11.7	4
	A498B_5_1612 T.TYHAITATGKTYDGP.SGLW.R.D	2266.23	3	3.2e-004	1.822	0.320	47.8	1
	A498B_7_1556 S.SDFNSDTHSSTFDAGAGALNDHFV.K.L	2753.24	3	2.3e-002	1.165	0.437	9.7	1
22	<a href="#">gi 49467320 emb CAC4659.1 S100A10 [Homo sapiens]</a>	1095.54	2	9.6e-002	1.094	0.210	89.9	1
	FRk7-3_003_1119 - 11 M.KEKPGFLE.N	1097.53	2	4.1e-002	1.168	0.233	116.0	1
	FRk8-3_003_974 - 986 L.M.EKRFGL.E	1104.61	2	0.5	0.391	0.369	8.4	3
	FRk6-3_003_749 L.TKEDLRVLM.E	1160.47	1	9.5e-003	0.920	0.148	40.5	1
	FRk4-3_003_602 - 611 M.PSGMEHMET.M	1291.51	2	2.5e-005	1.627	0.574	101.5	1
	A498B_4_1124 M.PSGMEHMET.M	1291.51	2	2.5e-005	1.627	0.574	101.5	1
23	<a href="#">gi 27436418 gb AAO1380.1 aldo-ketoreductase [Homo sapiens]</a>	791.45	1	9.1e-002	1.011	0.243	84.5	1
	FRk7-3_003_1147 S.KLWPTF.F	1000.57	2	5.6e-004	2.525	0.000	403.4	1
	A498B_4_1268 L.YDEGLYKALG.V	1125.62	2	0.1	0.852	0.219	61.6	1
	FRk7-3_003_868 - 879 Y.LIHWQGF.K.S	1372.79	2	2.5e-005	2.339	0.466	419.5	1
	A498B_4_1132 F.VELSTKAMRPV.G.L	1372.79	2	2.5e-005	2.339	0.466	419.5	1

Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung

24	gi 48146549 emb CAC32897.1 PGK1 [Homo sapiens]	804.45	1	0.2	0.730	0.302	44674.1	48146549	9 (7 1 0 1 0)
	FR8-3_003_1310 - 131K.IIPLVDF.V	1087.62	2	6.5e-005	1.430	0.303	33.9	318	2
	FR5-3_003_971 - 982.LLEKVLPGVDAL	1111.56	2	3.7e-002	0.961	0.476	89.9	1	727
	FR4-3_003_534	1143.65	2	1.8e-002	0.611	0.217	18.1	3	330
	FR7-3_003_989 - 973.G.VNLPKAGGFLM	1197.71	2	0.5	0.481	0.267	11.6	4	230
	FR8-3_003_954 - 957.SLEFVAVELKSL	1297.74	2	1.1e-004	1.449	0.493	87.5	1	636
	A498B_5_1406	1402.79	2	3.2e-005	0.923	0.336	57.1	1	636
	FR7-3_003_828 - 832.G.VNLPKAGGFLMK.K	1411.78	2	0.1	1.284	0.247	37.0	1	539
	A498B_7_1691 - 169	1524.86	2	3.4e-004	1.487	0.333	50.9	1	742
	A498B_8_2091								
	gi 33350654 pdb 1PPWJH Chain H, Crystal Structure Of Human Dj-1, P 1 21 Space Group	643.37	1	0.4	0.739	-	33.6	1	315
	FR4-3_003_1013	1084.51	2	0.4	0.745	0.059	24.3	3	427
	A498B_4_1242	1087.64	2	4.7e-005	1.216	0.382	14.6	2	527
	FR5-3_003_687 - 694.S.EAAYKELK.E	1155.54	2	0.2	0.993	0.084	35.0	1	530
	A498B_4_1204	1780.03	3	1.9e-002	1.642	0.494	67.5	1	996
	A498B_4_978 - 982	1964.15	3	2.7e-004	1.757	0.593	123.3	1	12108
	A498B_6_1250 - 125								
	A498B_6_1250 - 125								
	gi 5959887 emb CA13086.1 peroxiredoxin 1 [Homo sapiens]	951.45	2	8.1e-005	2.204	0.501	217.2	1	1024
	FR4-3_003_870 - 877.K.ADEGSFRG.L	1164.57	2	1.5e-004	1.227	0.207	94.6	1	730
	FR5-3_003_862 - 871.K.ATAYMPDGGFK.D	1211.61	2	4.8e-005	1.438	0.556	173.8	1	930
	FR8-3_003_1174 - 111.K.ADEGSFRGLF.J	1263.63	2	3.5e-002	0.738	0.719	3.0	11	330
	FR4-3_003_614 - 621.S.DPKRTIAGDY.G.V	1603.88	2	0.3	0.831	0.481	7.1	1	439
	FR6-3_003_671 - 685.S.DPKRTIAGDY.G.VL.K.A								
	gi 7264004 emb CA801656.1 histone 1, H2aj [Homo sapiens]	1437.84	2	8.5e-002	1.988	0.479	153.1	1	1039
	A498B_6_1415	1508.86	2	6.7e-005	3.048	0.526	229.7	1	1242
	FR7-3_003_1018 - 10	1678.99	2	2.8e-004	1.650	0.341	108.7	1	948
	A498B_7_2020								
	gi 33286422 ref NP_872271.1 pyruvate kinase 3 isoform 2 [Homo sapiens]	645.40	1	0.2	1.164	-	134.1	1	615
	FR8-3_003_1366 - 131R.GFPVLC	847.38	1	9.7e-002	1.431	0.049	121.9	3	618
	A498B_5_2180 - 219	1170.58	2	0.2	0.434	0.167	18.3	6	330
	FR4-3_003_610 - 617.C.TIGPASPASVET.L	1130.62	2	0.2	0.527	0.396	14.3	2	327
	FR6-3_003_855 - 859.A.SDPLLYRPV.A.V	1158.68	2	0.3	0.942	0.223	35.5	1	427
	FR8-3_003_1067 - 10	1390.66	2	1.1e-004	1.439	0.469	73.8	1	639
	A498B_4_1254								
	gi 7431380 pir J4E0353 uridine diphosphoglucose dehydrogenase (EC 1.1.1.30) - human	1099.57	2	2.0e-003	1.381	0.487	102.0	1	727
	FR5-3_003_933 - 943.F.DANTKPNL.N.Q	1180.62	2	1.3e-003	0.778	0.311	44.7	1	530
	FR4-3_003_790 - 798.F.ISVNTPTKTYG.M	1357.63	2	2.2e-002	0.613	0.086	25.6	1	436
	FR4-3_003_470 - 478.G.GDTEPEGGAVGA.L	1419.82	2	1.6e-004	1.167	0.478	48.1	1	636
	A498B_5_1245 - 124								
	gi 229995 pdb 1HLA M Chain M, Human Class I Histocompatibility Antigen A2 (HLA-A2, Human Leucocyte	1332.76	2	1.8e-004	1.681	0.556	84.9	1	730
	FR8-3_003_714 - 717 - IGRTPKIGVYS.R	2329.25	3	0.3	1.330	0.440	26.3	6	114
	A498B_5_540								
	gi 14250401 gb AAH08633.1 actin, beta [Homo sapiens]	990.53	1	0.2	0.830	0.291	64.6	1	524
	FR8-3_003_791	1146.63	2	4.8e-004	0.829	0.142	41.8	1	527
	A498B_4_524	1259.71	2	0.3	0.873	0.204	17.2	2	430
	A498B_4_1020	1388.75	2	0.1	0.689	0.124	19.8	27	333
	A498B_5_1149 - 115	1502.80	2	1.0e-003	1.579	0.366	81.9	1	736
	A498B_5_1800	1665.86	2	2.0e-004	1.369	0.369	92.9	1	739
	A498B_6_1298								
	gi 42542977 pdb 1G2WIA Chain A, X-Ray Crystal Structure Of Human Galectin-1	609.29	1	0.4	1.106	0.003	55.0	1	412
	FR4-3_003_832 - 840.L.EAIFY.N.M	623.30	1	0.4	0.973	0.000	73.1	1	412
	FR4-3_003_921 - 929.C.IIFDQ.A	873.49	2	2.0e-004	0.908	0.188	97.2	1	518
	FR7-3_003_885 - 899.K.FRNRL.N.L.E	1020.50	2	0.3	0.693	0.286	17.8	8	327
	FR4-3_003_814 - 817.R.GEVAADAKSF.V	1095.55	2	4.9e-003	1.279	0.133	93.7	1	627
	FR5-3_003_739 - 742.Y.MAAGDQFK.K.C	1516.80	2	5.8e-002	0.690	0.249	15.6	8	342
	FR7-3_003_1255 - 12	1891.92	2	1.6e-003	2.478	0.538	176.3	1	1148
	A498B_7_1649								

## Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung

33	gi 49168580 emb CAC38785.1 MDH2 [Homo sapiens]	886.46	1	0.3	4.0.1	35536.8	49168580	4(4 0 0 0)
	FRK4_3_003_917 - 922 G.ASGGGQPLS.L					0.230	89.6	1 6.27
	A498B_5_1558 G.ASGGGQPLS.L					0.263	144.0	1 8.30
	A498B_5_1980 N.AKAVAVLGAASGGQPLS.L					0.370	60.7	1 7.48
	A498B_5_2009 - 203 N.AKAVAVLGAASGGQPLS.L					0.566	51.0	1 6.51
34	gi 2183299 gb AAC51652.1 aldelyde dehydrogenase 1 [Homo sapiens]	1637.96	2	2.0e-004	40.1	54800.0	2183299	4(4 0 0 0)
	A498B_6_1629 Y.FVGTYS					0.003	81.6	1 6.18
	FRK6_3_003_709 - 713 A.FTGSTEVGKLIK.E					0.478	118.2	1 7.53
	A498B_4_1122 G.NPLTPGVTPGQIDK.E					0.321	45.2	1 6.42
	A498B_4_1102 G.NPLTPGVTPGQIDK.EYDK.I					0.202	33.2	1 8.14
35	gi 29881667 gb AAH61192.1 Splicing factor proline:glutamine rich [polyprimidine tract binding pro	2228.12	3	7.5e-002	10.2	76140.8	29881667	1(1 0 0 0)
	A498B_5_1251 - 125 A.FSGFGRERA.Y					0.599	493.9	1 1.327
	gi 2981776 pdb 1IAZZ  Citrate Bound, C298aW219Y MUTANT HUMAN ALDOSE REDUCTASE	1151.58	2	2.7e-004	3.134	36644.5	2981776	6(4 1 0 1)
	FRK5_3_003_1091 V.VTAYSPG.S					0.446	22.2	10 3.21
	FRK5_3_003_951 - 958 N.NGAKMPLG.L					0.392	68.3	1 6.24
	A498B_4_1268 L.YDEGLYKAI.G					0.501	403.4	1 1.227
	FRK5_3_003_937 - 953 L.NNGAKMPLG.L					0.539	46.6	1 5.27
	A498B_4_1206 - 123 L.NGAKMPLG.L					0.460	231.8	1 10.30
	A498B_6_1173 - 119 L.IRFPGRNL.Y					0.487	194.3	1 13.48
37	gi 70686 pir IHSHUA5 histone H2A.5 - human	1174.65	3	3.6e-004	44.1	14051.0	70686	5(3 1 1 0)
	A498B_4_1324 - 134 G.AGAPVYL.A					0.070	180.7	1 8.18
	A498B_4_1310 G.AGAPVYLA.A					0.102	171.6	1 9.24
	FRK7_3_003_873 A.IRNDLNLKLR					0.477	29.2	1 4.33
	A498B_6_1489 G.RVTLAAGGVLPNGA.Y					0.066	140.8	1 10.42
	FRK8_3_003_823 G.LAIRNDELNLKLR					0.241	21.0	2 4.39
38	gi 32851807 gb AAP89333.1 biliverdin reductase B [Homo sapiens]	1537.89	2	3.6e-004	10.1	22105.4	32851807	1(1 0 0 0)
	A498B_4_1634 M.AYKAIQIF.G.A					0.333	74.5	1 6.24
39	gi 67511480 emb CAJ00736.1 diazepam binding inhibitor, splice form 1c [Homo sapiens]	946.61	1	4.9e-004	1.349	10138.1	67511480	1(1 0 1 0)
	FRK5_3_003_985 - 100 G.DINTERQMLD.F					0.335	186.6	1 8.30
40	gi 2957075 ref NP_808852.1 cytoplasmic dynein light chain 2A isoform b [Homo sapiens]	1260.59	2	5.1e-004	1.048	7337.8	2957075	1(1 0 0 0)
	FRK4_3_003_1006 - 101 L.VGNPTE:-					0.906	196.6	1 7.21
41	gi 55959290 emb CAH16494.1 annexin A1 [Homo sapiens]	913.50	1	5.2e-004	10.1	22740.8	55959290	1(1 0 0 0)
	A498B_6_1433 L.LKTPAGFDADLR					0.377	161.9	1 8.33
42	gi 49466297 emb CAC46469.1 PRDX4 [Homo sapiens]	1347.66	2	5.5e-004	1.820	30570.8	49466297	1(1 0 0 0)
	FRK5_3_003_795 - 805 F.IDDKGLR.Q					0.239	211.5	1 10.24
43	gi 825728 emb CAA68439.1 ubiquitin precursor [Homo sapiens]	1042.63	2	5.7e-004	10.1	10411.7	825728	1(1 0 0 0)
	A498B_6_1405 G.IEPLSLRQLA.Q					0.134	158.1	1 9.27
44	gi 39645331 gb AAH63513.1 KR18 protein [Homo sapiens]	1139.66	2	5.7e-004	40.1	56874.3	39645331	4(4 0 0 0)
	FRK8_3_003_1525 - 15 G.SLLSPLV.L.E					0.000	69.3	1 6.21
	FRK8_3_003_1490 - 14 N.GSLLSPLV.L.E					0.002	58.9	1 6.24
	FRK8_3_003_1291 - 12 A.YTYNGSLLSPLV.L					0.322	49.6	2 5.93
	FRK7_3_003_974 - 979 G.SSNFRGGLGGYGGAGSGMGGITA.V					0.504	87.4	1 9.66
45	gi 3064379 gb AAP36438.1 Homo sapiens cystatin B (stefin B) [synthetic construct]	2030.93	2	2.5e-002	2.211	11246.7	3064379	6(6 0 0 0)
	FRK5_3_003_642 - 658 Y.FKHYVGD					0.219	100.0	1 6.18
	FRK4_3_003_844 - 852 K.SQVYAGTNY.F					0.273	95.1	1 7.24
	FRK7_3_003_847 - 859 D.FVHLRVF.Q.S					0.384	130.8	1 6.21
	FRK6_3_003_1069 - 10 K.SQVYAGTNY.F					0.530	100.5	1 7.27
	FRK4_3_003_397 - 403 Q.SLPHNKPLT.L					0.245	18.5	3 4.27
	A498B_4_1202 K.AVSPKSOVYAGTNY.F					0.071	215.5	1 11.39
46	gi 14250367 gb AAH0815.1 Similar to transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome) [Homo sapiens] [M	1470.76	2	1.9e-003	2.609	42689.4	14250367	1(1 0 0 0)
	FRK8_3_003_1131 - 11 G.IDRDAJAVRGLIT.K					0.354	22.7	1 5.42
47	gi 49466446 emb CAC46543.1 PSME2 [Homo sapiens]	1611.92	2	6.7e-004	18.1	27414.4	49466446	2(1 1 0 0)
	FRK8_3_003_975 F.LYRFLPKIYV.L					0.292	37.3	2 4.30
	FRK8_3_003_975 L.YRFLPKIYV.L					0.273	85.7	1 6.30
48	gi 20664042 pdb 1K8UJ.A Crystal Structure Of Calcium-Free (Or Apo) Human S100a6; Cys3met Wu	1453.86	2	7.0e-004	1.412	10165.5	20664042	3(3 0 0 0)
	FRK4_3_003_628 - 636 L.LYNEALKG.G-					0.062	186.8	1 10.21
	FRK5_3_003_662 - 667 L.VAIFHKYS.G					0.316	1.157	1 2.27
	A498B_4_1186 L.ALYNEALKG.G-					0.257	50.2	1 4.27



Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung

49	gi 46439318 ref NP_082282.1 peptidylprolyl isomerase E isoform 3 [Homo sapiens]	9.4e-004	18.1	26133.0	46439318 2 (1 1 0 0 0)
	FRS-3_003_721 - 730F ILKHTGPGLLS M	9.5e-003	1.292	80.2	1 730
	A498B_6_1278 NIFLKHTGPGLLS M	9.4e-004	1.790	194.8	1 1033
50	gi 2896146 gb AA09608.1 transcriptional coactivator ALY [Homo sapiens]	9.9e-004	14.1	24470.5	2896146 2 (1 0 0 1 0)
	A498B_5_1978 D.SDFGGAGVETGGKLL Y	9.9e-004	1.549	54.5	1 745
	A498B_5_1466 F.DSFGGGAGVETGGKLL V	0.3	0.246	1.4	6 148
51	gi 3478573 gb AAH5796.1 SH3-domain binding protein 4 [Homo sapiens]	1.0e-003	12.0	107428.1	3478573 3 (0 0 0 3 0)
	FR8-3_003_1337 -13.R.LIFPII S	0.4	0.804	111.9	1 4
	FR7-3_003_1467 -14.V.GRARP.SL.C	0.5	0.824	55.6	4 418
	FR5-3_003_862 -871.I.LTGFCVTPQ.P	1.0e-003	0.843	0.327	11 427
52	gi 995213 pdb 1ESV A Chain A, Complex Between Latrunculin A and Actin	1.3e-003	50.1	41999.9	995213 5 (5 0 0 0 0)
	FR7-3_003_1293 -13.R.V.FPSV.G.R	0.2	0.942	97.6	1 521
	FR7-3_003_1247 G.DDAPRAV.FPSV.G.R	1.3e-003	0.213	20.9	3 436
	A498B_6_1593 A.GDDAPRAV.FPSV.G.R	1.6e-002	0.993	0.302	10 13
	FR8-3_003_1035 -10.G.FAGDDAPRAV.FPSV.G.R	8.1e-003	1.479	40.3	1 545
	FR8-3_003_1074 -10.K.A.G.F.A.GDDAPRAV.FPSV.G.R	1.3e-003	1.790	0.463	105.8 1 1051
53	gi 248440 gb AA822014.1 28 kDa heat shock protein homolog fragment 2 [human, Peptide Partial, 30 a	1.3e-003	42.1	3424.7	248440 5 (4 0 0 1)
	A498B_6_2298 E.WSQMLG.G	0.2	0.591	59.2	1 415
	FR5-3_003_919 - 931 G.LPRLPEE.W	5.1e-002	1.578	0.141	198.1 818
	A498B_6_1505 G.LPRLPEWS.Q	4.7e-002	1.030	0.112	30.4 2 524
	A498B_6_1497 G.LPRLPEWS.Q.W	1.0e-002	1.915	0.452	215.5 1 827
	A498B_7_2005 F.G.LPRLPEWS.Q.W	1.3e-003	1.114	0.130	51.1 630
54	gi 230868 pdb 3GPD G Chain G, Twinning In Crystals Of Human Skeletal Muscle D. Glyceroldehyde-3-Pho	1.3e-003	8.0	35853.3	230868 1 (0 1 0 0 0)
	FR5-3_003_866 - 875.Q.NLPASTOAAKAVG.K	1.269.72 2	0.967	0.004	28.7 9 539
55	gi 7246517 pdb 1CM1B Chain B, Structure Of The Human PinLC8 Dimer With A Bound Peptide	1.6e-003	10.1	9853.9	7246517 1 (1 0 0 0 0)
	FR7-3_003_862 - 871.G.SYYTHETKHFV.F.Y	1.6e-003	1.176	16.8	1 436
56	gi 2661039 gb AA88178.1 alpha enolase [Homo sapiens]	1.9e-003	130.1	36286.6	2661039 14 (12 0 1 1 0)
	FR8-3_003_1141 -11.F.MILPVG.A	0.3	0.838	33.4	1 315
	FR8-3_003_1327 F.MILPVG.A	0.4	0.491	0.498	17.2 1 218
	FR8-3_003_1453 -14.E.VILPVP.F.N	8.2e-003	1.147	0.529	76.5 1 521
	A498B_4_1430 G.IQVYGGDL.T	8.8e-002	1.629	0.271	227.1 1 821
	FR8-3_003_1274 -12.E.VILPVP.F.N	1.9e-003	1.089	0.276	71.5 1 524
	FR8-3_003_1515 -15.S.EVILPVP.F.N	1.1e-002	1.175	0.000	98.0 1 524
	FR8-3_003_1278 -12.F.MILPVG.AA.N.F.R	6.1e-002	0.885	0.194	66.5 1 527
	FR8-3_003_884 - 894.F.MILPVG.AA.N.F.R	0.2	0.410	0.229	17.3 4 330
	FR4-3_003_407 - 415.F.NVINGGSHAGNKLA.M	4.1e-003	2.648	0.607	245.5 1 1439
	FR5-3_003_955 - 967.K.SPDDPSRYSPDGL	0.3	0.841	0.111	31.4 1 436
	A498B_6_1591 G.KDATNVGDEG.FAPNILE	0.1	1.223	0.259	64.2 1 748
	FR7-3_003_1138 -11.G.KDATNVGDEG.FAPNILE.N	1.7e-002	1.786	0.461	82.0 1 951
	A498B_5_1179 F.NVINGGSHAGNKLA.M.G.E.F.M	0.4	1.354	0.361	32.5 1 8102
	A498B_7_1773 K.SPDDPSRYSPDGL.ADL.Y	1.6e-002	1.673	0.295	77.9 1 748
57	gi 66360366 pdb 1WY1B Chain B, Human Triosephosphate Isomerase Of New Crystal Form	1.9e-003	20.1	26665.8	66360366 2 (2 0 0 0 0)
	FR4-3_003_706 - 714.F.VDINAVG.G	0.2	0.609	0.196	55.6 1 421
	FR7-3_003_1002 -10.K.Y.TNGAFTGESPMK.D	1.9e-003	1.582	0.468	75.8 1 845
58	gi 48257056 gb AAH18947.2 TALD01 protein [Homo sapiens]	2.0e-003	10.0	37395.4	48257056 1 (1 0 0 0 0)
	FR4-3_003_893 - 900.F.TTVVADTDGF.H.A	2.0e-003	0.649	0.273	79.5 1 530
59	gi 15126755 gb AAH1292.1 Heat shock 70kDa protein 1 [Homo sapiens]	2.0e-003	10.1	22754.5	15126755 1 (1 0 0 0 0)
	A498B_6_1533 -155.R.GP5WDPFR.D	2.0e-003	1.988	0.547	219.4 1 921
60	gi 62896593 pdb 1ADU enolase 1 variant [Homo sapiens]	2.4e-003	24.1	47111.3	62896593 3 (2 0 0 1 0)
	FR5-3_003_703 K.IHAREF.D	0.4	0.490	0.007	15.2 1 218
	FR5-3_003_741 - 749.L.F.TSKGLF.R.A	2.4e-003	1.706	0.339	188.2 1 921
	FR5-3_003_697 - 722.K.IHAREF.D.S	2.8e-002	0.750	0.000	67.2 1 521
61	gi 4206374 gb AAD11622.1 placental protein 17b1; PP17b1 [Homo sapiens]	2.5e-003	10.1	47179.0	4206374 1 (1 0 0 0 0)
	A498B_4_1561 L.VGFFAPGTEKAPFERK.K	1.797.97 2	1.370	0.093	77.8 1 848
62	gi 13786856 pdb 1101H Chain H, Human Muscle L-Lactate Dehydrogenase M Chain, Tertiary Complex With	2.5e-003	32.1	36534.3	13786856 4 (1 2 1 0 0)
	FR4-3_003_1065 K.DGLYNYL	0.4	1.148	0.000	126.9 1 615
	FR7-3_003_1387 -14.K.DGLYNYL.L	1.1e-002	1.058	0.076	54.7 1 518
	FR5-3_003_923 - 930.G.IQKELQ.F	2.5e-003	1.210	0.162	72.6 1 518
	FR5-3_003_879 G.QINGSDLYK.V	0.4	0.573	0.380	5.4 7 224

## Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung

63	gi 34190015 gb AAH25302.2  Transketolase-like 1 [Homo sapiens]	2.5e-003	10.1	65313.6	34190015	1 (1 0 0 0 0)
	FK7-3_003_857 - 863 E RADAIKLESIQ.T	1597.93	2	0.046	13.6	5
64	gi 2344812 emb CAA63430.1  Drg1 [Homo sapiens]	2.6e-003	20.1	42795.7	2344812	2 (2 0 0 0 0)
	FK6-3_003_853 F.YGOMGYMPSASMITRL	1515.68	2	0.329	14.3	1
	FK8-3_003_1002 - 10 F.YGOMGYMPSASMITRLIR	1759.80	2	0.985	71.8	1
65	gi 50845388 ref NP_001002858.1  annexin A2 isoform 1 [Homo sapiens]	2.6e-003	20.1	40365.7	50845388	2 (2 0 0 0 0)
	FK4-3_003_701 - 709 S.LEGDHSTPPSAVG.S	1330.59	2	0.5	0.586	4
	A498B_4_1154 - 118 K.LSLEGDHSTPPSAVG.S	1530.71	2	0.219	31.2	2
66	gi 15928913 gb AAH14920.1  Unknkn (protein for IMAGE3906970) [Homo sapiens]	2.8e-003	30.1	21128.6	15928913	3 (3 0 0 0 0)
	FK5-3_003_1042 - 10 S.LDVNHFAPDEL	1156.53	2	0.279	70.4	1
	A498B_6_2201 S.LDVNHFAPDEL.T	1289.61	2	0.248	53.0	1
	FK7-3_003_1086 R.DWYPHSRFLD.Q	1335.61	2	0.362	43.3	1
67	gi 30582427 gb AAP35440.1  aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) [Homo sapiens]	2.9e-003	10.1	36997.8	30582427	1 (1 0 0 0 0)
	A498B_8_1770 - 178 F.VSKLWPTF.F	1090.63	2	0.462	113.4	1
68	gi 63991414 gb AAV40932.1  unknkn [Homo sapiens]	3.1e-003	8.1	146668.4	63991414	1 (1 0 0 0 0)
	A498B_6_2273 Y.QLAAAVDLG.N	1041.59	1	0.061	50.7	13
69	gi 1082187 pir JC2542  alpha-2(E)-catenin - human	3.7e-003	10.1	102711.5	1082187	1 (1 0 0 0 0)
	FK8-3_003_1470 - 14 G.IIVDRLS.F.S	903.52	1	0.357	97.2	1
70	gi 32483377 ref NP_054817.2  peroxiredoxin 3 isoform b [Homo sapiens]	3.9e-003	36.1	25822.3	32483377	4 (3 1 0 0 0)
	A498B_4_1506 - 165 F.FYPLD.F	654.31	1	0.4	66.3	1
	FK8-3_003_1301 - 13 L.FFYPLD	686.35	1	0.1	0.936	2
	A498B_7_2302 - 235 L.FFYPLD.F	801.38	1	0.201	57.8	2
	FK8-3_003_1399 - 14 F.FYPLD.F	902.43	1	0.3	129.5	1
71	gi 62420949 gb AAH2193.1  actin-like protein [Homo sapiens]	4.9e-003	8.1	115668.0	62420949	1 (1 0 0 0 0)
	A498B_5_1135 Y.NELRYAPDEHPIL.L	1502.80	3	0.181	41.0	4
72	gi 46219796 gb AAH66884.1  H3 histone family, member F [Homo sapiens]	4.9e-003	18.2	16410.5	46219796	2 (1 1 0 0 0)
	A498B_5_566 - 727 L.RKLPFQRL.V	1170.75	3	0.341	337.2	1
	A498B_5_1221 L.VREAQDFKTDL.R	1434.76	3	0.423	70.1	866
73	gi 66392203 ref NP_001018146.1  nucleoside-diphosphate kinase 2 isoform 1 [Homo sapiens]	5.0e-003	30.1	30117.6	66392203	3 (3 0 0 0 0)
	FK7-3_003_1014 - 10 L.WFKPEEL.V	948.48	2	0.368	66.7	1
	FK8-3_003_1103 K.DRPFPGLV	948.49	2	0.038	69.1	521
	FK7-3_003_982 - 995 K.DRPFPGLV.K.Y	1175.66	2	0.050	93.6	1
74	gi 62087910 dbj BAD92402.1  ribosomal protein S10 variant [Homo sapiens]	5.2e-003	10.1	19847.3	62087910	1 (1 0 0 0 0)
	A498B_5_838 - 948 G.LMLPKKNRIAYE.L	1606.88	3	0.287	95.2	1
75	gi 49466447 emb CAG46544.1  PGAM1 [Homo sapiens]	5.2e-003	30.1	28816.8	49466447	3 (3 0 0 0 0)
	FK8-3_003_1431 E.LNLTGPV.Y	1036.64	1	0.2	1.032	3
	FK8-3_003_1266 - 12 L.NLPTGPV.Y.E	1086.62	1	0.257	63.3	1
	FK8-3_003_1502 - 15 E.LNLTGPV.Y.E	1189.70	1	0.096	52.3	1
76	gi 5802810 gb AD61791.1  Gag-Pro-Pol protein [Homo sapiens]	5.3e-003	4.1	130155.2	5802810	1 (1 0 0 1 0)
	A498B_4_1374 - 141 G.SELHEID	840.45	1	0.025	143.0	2
77	gi 1418763 emb CAA93152.1  beta 2 isoform of 61kDa regulatory subunit of PP2A [Homo sapiens]	5.3e-003	2.1	57257.9	1418763	1 (1 0 0 0 1)
	A498B_4_1374 - 141 A.SELHELL.S	840.45	1	-	143.0	2
78	gi 40768274 dbj BAA32321.2  KIAA0476 protein [Homo sapiens]	5.3e-003	6.1	156536.4	40768274	1 (0 1 0 0 0)
	A498B_6_1431 T.MAALOKDHYD.V	1169.60	2	0.464	27.6	6
79	gi 55669907 pdb 1TE6 B Chain B, Crystal Structure Of Human Neuron Specific Enolase At 1.8 Angstrom	5.7e-003	42.1	47930.4	55669907	5 (2 2 1 0 0)
	FK5-3_003_741 - 749 L.YTAKGLR.A	955.54	2	0.2	0.439	2
	FK8-3_003_1515 - 15 S.DLLPVPF.N	984.58	1	0.494	98.0	1
	FK5-3_003_961 - 974 D.SRGNPTVE.V.D.L.Y	1186.61	2	0.327	136.0	1
	FK5-3_003_1006 - 10 R.AAVPSGASTIYE.A	1222.60	1	0.3	1.516	1
	FK8-3_003_815 - 827 F.RAAVPSGASTIYE.A	1378.70	2	0.2	0.583	23
80	gi 62088352 dbj BAD92623.1  ribosomal protein S7 variant [Homo sapiens]	6.0e-003	10.1	8944.7	62088352	1 (1 0 0 0 0)
	FK8-3_003_1207 - 12 D.LVFRSEV.G.K	960.54	1	0.248	123.2	1
81	gi 51472805 ref XP_373666.2  PREDICTED: hypothetical protein XP_373666 [Homo sapiens]	6.0e-003	8.0	46675.9	51472805	1 (1 0 0 0 0)
	A498B_8_1655 - 166 P.YRTEGETPSRAV.P.K	1805.90	2	0.193	26.2	5
82	gi 20150005 pdb 1H95 A Chain A, Solution Structure Of The Single-Stranded Dna-Binding Cold Shock Do	6.8e-003	10.0	8717.6	20150005	1 (1 0 0 0 0)
	A498B_6_1923 - 192 G.TYKMFVNRNGY.G.F	1440.74	2	0.395	28.6	1









## Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer BN30-Probenaufarbeitung

17	gi1617086 emb CAA32093.1 glycophorin C [Homo sapiens]	5.6e-005	20.1	12193.2	1617086	2 (2 0 0 0 0)
	EN30_11_723 - 733 D.PALDAGDSSRKEY.F	1536.73	1.900	0.396	46.9	1
	EN30_13_1060 D.PALDAGDSSRKEY.F	1796.88	1.630	0.442	64.7	1
18	gi62531063 gb AAH93062.1 TMX2 protein [Homo sapiens]	6.4e-005	10.1	29623.2	62531063	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_1064 R.YTDVSTRY.K	1004.47	2.669	0.439	548.3	1
19	gi46219796 gb AAH6884.1 H3 histone family, member F [Homo sapiens]	2.8e-004	30.1	154910.5	46219796	3 (3 0 0 0 0)
	EN30_12_667 - 687 L.VREAQDF.K	977.51	2.000	0.329	308.3	1
	EN30_13_1171 L.IRKLPLGRL.V	1170.75	3	0.000	278.1	1
	EN30_13_999 - 1001 L.VREAQDFKDL.R	1434.76	3	0.453	84.3	1
20	gi2957075 ref NP_808852.1 cytoplasmic dynein light chain 2A isoform b [Homo sapiens]	6.2e-004	10.1	7337.8	2957075	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_965 L.VIGNFTE.-	913.50	1.430	0.247	109.6	1
21	gi47125390 gb AAH70263.1 Ribosomal protein SA [Homo sapiens]	8.1e-004	10.1	32819.4	47125390	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_841 - 851 C.NTDSPLRY.V	965.47	2.413	0.194	282.1	1
22	gi12803339 gb AAH02486.1 PAL-1 mRNA-binding protein, isoform 2 [Homo sapiens]	8.2e-004	10.1	44177.1	12803339	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_1087 I.MPOHLGEFG.C	941.45	2	0.342	319.5	1
23	gi66360366 pdb 1WV7 IB Chain B, Human Triosephosphate Isomerase Of New Crystal Form	9.5e-004	10.1	26665.8	66360366	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_561 F.VDINIAKQ.-	900.51	1.749	0.318	267.8	1
24	gi16924231 gb AAH17386.1 ribosomal protein S19 [Homo sapiens]	9.7e-004	20.1	17271.2	16924231	2 (2 0 0 0 0)
	EN30_11_763 V.PQVTVYDYNQGEF	1313.67	1.390	0.523	90.9	1
	EN30_12_704 V.PQVTVYDYNQGEF.V.R.A	1715.91	3	0.341	14.2	1
25	gi30841910 gb AAP34740.1 immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]	2.5e-003	10.1	14101.8	30841910	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_891 L.ETGGDLIQPG.G	986.48	2	0.300	309.5	1
26	gi30684646 gb AAP36575.1 Homo sapiens thymosin, beta 10 [synthetic construct]	2.5e-003	30.1	5135.6	30684646	3 (3 0 0 0 0)
	EN30_14_464 D.MGEIASFD.K	869.37	1	0.001	121.4	2
	EN30_14_1180 - 120 D.KPDMGEIASFD.K	1209.55	2	0.484	313.6	1
	EN30_14_1131 N.LTPTKETEGERSELS	1989.05	3	0.380	25.1	1
27	gi30683907 gb AAP36202.1 Homo sapiens cofillin 1 (non-muscle) [synthetic construct]	2.7e-003	20.1	16603.7	30683907	2 (2 0 0 0 0)
	EN30_14_1165 L.AEKLGGASVISLEGGKPL.L	1668.95	3	0.147	16.7	2
	EN30_11_1032 L.YDATYETIKSKKDL.V	1819.86	3	0.163	44.9	1
28	gi14250401 gb AAH06833.1 actin, beta [Homo sapiens]	3.2e-003	10.1	40978.5	14250401	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12_389 - 403 L.RVAPEHPV.LL	1146.63	2	0.182	143.2	1
29	gi5469716 gb AAV38930.1 cyclin B1 [Homo sapiens]	3.9e-003	18.1	44074.0	5469716	2 (1 1 0 0 0)
	EN30_12_684 S.EPVPEPEPEPEVKE	1798.87	2	0.543	30.1	2
	EN30_12_694 E.PVPEPEPEPEVKEE	1798.87	2	0.142	36.2	1
30	gi49466263 emb CAC46452.1 MIF [Homo sapiens]	4.2e-003	76.1	12511.2	49466263	8 (7 0 1 0 0)
	EN30_11_537 - 539 L.RISPRVY.I	1005.55	2	0.218	133.0	1
	EN30_14_1207 - 120 L.LAERLRISPD.R	1169.66	3	0.264	114.8	1
	EN30_12_423 E.RLRISPRVY.I	1274.73	3	0.032	25.9	2
	EN30_12_1115 L.LAERLRISPD.R.V	1325.76	3	0.054	30.6	3
	EN30_13_643 - 789 L.LAERLRISPRVY.Y	1587.90	3	0.433	41.8	1
	EN30_14_1602 F.IVNTMVRASVPDGFSLSE	1785.95	2	0.246	23.8	1
	EN30_15_1197 F.IVNTMVRASVPDGFSLSE.L	2028.08	2	0.837	10.1	3
	EN30_14_1258 L.TGGLAGATGPRPGYIAVHVVPDQL.M	2602.40	3	0.703	0.076	5.6
31	gi5107727 pdb 2IF1 Human Translation Initiation Factor ERF1, Hmr, 29 Structures	5.6e-003	10.1	14291.2	5107727	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_13_944 - 946 E.IGLAHDQDLKYHGF.-	1540.85	3	0.343	199.0	1
32	gi51475872 ref XP_377926.2 PREDICTED: similar to Calcigarrin (S100C protein), (MLN 70) [Homo sapiens]	6.4e-003	10.1	12338.4	51475872	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_14_985 - 987 D.SFLKAVPSOKRT.-	1361.79	3	0.126	138.2	1
33	gi30584467 gb AAP36486.1 Homo sapiens S100 calcium binding protein A6 (calyculin) [synthetic cons]	7.5e-003	10.1	10286.4	30584467	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12_1293 L.MEDLRNKDQEVNIF.Q	1752.79	3	0.209	60.7	1
34	gi4622023 gb AAU21786.1 similar to calcigarrin; similar to PID-gp31163349 [Homo sapiens]	8.1e-003	10.1	11501.9	4622023	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_14_1211 - 121 L.IAVFGKYAGKD.G	1239.67	3	0.405	67.8	1
35	gi3659980 pdb 1BCK A Chain A, Human Cyclophilin A Complexed With 2-Thr Cyclosporin	8.5e-003	34.1	17962.9	3659980	4 (2 1 1 0 0)
	EN30_12_431 X.VNPTV.F	676.37	1	0.786	0.061	53.3
	EN30_14_1520 X.VNPTV.F.D	823.43	1	0.2	0.209	48.2
	EN30_14_548 X.VNPTV.F.D.I	938.46	1	0.244	28.7	1
	EN30_12_1253 L.FADKVPKTAENF.R	1366.70	3	0.832	0.153	15.5

Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer BN30-Probenaufarbeitung

36	gi147940482 gb AAH71674.1 Unknown (protein for MCC:87876) [Homo sapiens]	9.1e-003	8.1	17096.0	47940482	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_13,1402 - 140 E.MERPLTQY.K	1150.59	2	0.085	208.0	1 8/24
37	gi121730274 db 1G15 B Chain B, D82n,D94n Double Point Mutant Of Human Nuclear Transport Factor 2 {	9.8e-003	10.0	14467.1	21730274	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12,436 - 444 F.RLALHNFQ-	927.52	2	0.124	27.2	1 5/21
38	gi19789555 gb IAF98362.1 vitamin D receptor-interacting protein complex component DRP205 [Homo sa	1.1e-002	6.1	166681.9	9789555	1 (0 0 1 0 0)
	EN30_14,1693 - 169 S.NIKTKKKSSR	1048.65	2	0.379	7.9	8 2/24
39	gi151468655 ref XP_291464.3 PREDICTED: similar to KIAA0433 protein [Homo sapiens]	1.3e-002	10.1	51838.1	51468655	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12,465 - 507 H.LSSPILNLMPF	1431.79	2	0.048	128.0	1 9/33
40	gi12506502 sp P51160 HUMAN_HUMAN Membrane-associated protein HEM-1 (Hematopoietic protein 1)	1.4e-002	8.0	128133.2	2506502	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_13,1501 S.FELASAAGV G	977.53	2	0.022	71.4	20 6/27
41	gi1307354 gb AA080789.1 prothymosin alpha [Homo sapiens]	1.8e-002	14.1	12039.9	307354	2 (1 0 0 1 0)
	EN30_14,1002 E.EDGDEDEAESATGKRAAE	1879.78	3	0.561	8.8	8 3/102
	EN30_14,1002 D.GDEDEAESATGKRAED	1879.78	3	0.204	25.1	1 5/102
42	gi1327655 emb CAC3452.1 T-cell receptor beta chain VJ region [Homo sapiens]	1.9e-002	10.0	11270.5	1327655	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12,1297 A.YFCASSPDSGRDTEAF	1752.72	3	0.233	13.0	1 4/80
43	gi15052121 gb AAD38427.1 breifeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1 [Homo sapiens]	1.9e-002	8.1	208575.2	5052121	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11,553 - 557 A.IYNEIAGK.K	907.49	2	0.208	248.5	2 10/21
44	gi17386024 emb CAC38368.1 Glycophorin A [Homo sapiens]	2.0e-002	10.1	14324.4	17386024	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_13,1121 D.VKPLSPDIDVPL.S	1377.76	2	0.363	80.6	1 7/36
45	gi156636097 ref XP_508202.1 PREDICTED: similar to 60S acidic ribosomal protein P2 [Pan troglodytes	2.0e-002	28.1	11667.9	55636097	3 (2 1 0 0 0)
	EN30_14,1730 R.VYASVYLL.A	828.45	1	0.057	64.7	1 5/18
	EN30_13,1471 -MRYVASVYLL	1002.51	2	0.853	0.112	2 5/21
	EN30_15,1049 -MRYVASVYLL.A	1115.59	2	0.140	87.2	1 8/24
46	gi11663764 gb AA18640.1 T54 protein [Homo sapiens]	2.1e-002	8.1	40778.5	1663764	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11,1151 G.KYEGLDPNLV	986.48	2	0.343	123.8	2 7/24
47	gi178753 gb AA059460.1 NaH antipporter [Homo sapiens]	2.1e-002	2.0	90574.9	178753	1 (0 0 0 0 1)
	EN30_11,779 G.GLRGAIAPFSLG.Y	1061.61	3	-	14.1	7 4/60
48	gi19909911 db BAB87181.1 psi neuronal apoptosis inhibitory protein [Homo sapiens]	2.2e-002	6.1	131808.8	19909911	1 (0 0 1 0 0)
	EN30_11,1069 E.FNDUDDAEAGVDEEDL	1768.67	2	0.741	38.7	2 6/45
49	gi1867654 db BAB89499.1 FL_00154 protein [Homo sapiens]	2.2e-002	10.72	161620.5	1867654	1 (0 0 1 0 0)
	EN30_11,841 - 851 G.SDGAAPRY.F	985.47	2	0.424	88.4	5 6/24
50	gi146709954 gb AAH67737.1 Unknown (protein for IMAGE5298595) [Homo sapiens]	2.4e-002	8.1	47323.2	46709954	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11,833 G.SAAA.A.A.A.A.A.A.SGGVSPDN	1401.66	2	0.612	15.4	27 5/51
51	gi180656893 gb AAK32510.1 ribosomal protein S17 [synthetic construct]	2.5e-002	10.1	16540.4	60656893	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_13,1013 L.GVYGTQVGMNFKTPRGPV.-	1957.03	3	0.502	66.5	1 12/102
52	gi121406202 emb CAC21468.1 RPS21 [Homo sapiens]	2.6e-002	10.1	9105.6	12140620	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11,773 L.AKADGIVSKNF.-	1149.63	3	0.390	132.7	1 1/260
53	gi10863768 gb AAG23867.1 infertility-related sperm protein [Homo sapiens]	2.7e-002	8.0	103535.6	10863768	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_12,457 A.MKONLPPVR.G	1069.58	2	0.286	22.7	3 3/24
54	gi1807100 gb AB32387.1 ADP-ribosyltransferase [Homo sapiens]	2.8e-002	8.1	36295.4	807100	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_14,464 L.DMALASFD.D	869.37	1	0.406	152.7	1 9/21
55	gi137549909 ref XP_243943.2 PREDICTED: similar to histone (15.4 kD) (his-72) [Homo sapiens]	2.8e-002	8.1	16466.1	37549909	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_13,1171 L.LRKLFPGR.L.Y	1170.75	3	0.334	278.1	1 16/48
56	gi155666048 emb CAH70919.1 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14 [Homo sapiens]	3.4e-002	10.0	135175.5	55666048	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11,889 N.GPELDVYSOPE.M	1304.60	2	0.106	23.9	2 4/30
57	gi19171162 emb CAC06145.1 ventrithoid transmembrane protein [Homo sapiens]	3.6e-002	6.1	45245.4	19171162	1 (0 0 1 0 0)
	EN30_11,801 T.LLEVAFLYNGV.S	1384.75	3	0.266	17.0	32 5/66
58	gi18809885 gb AAF7974.1 immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]	4.1e-002	6.1	14295.2	8809885	1 (0 0 1 0 0)
	EN30_14,1526 - 152 K.PSERLSLTCGY.G	1322.63	2	0.573	88.5	2 6/36
59	gi14326057 gb AAK60729.1 envelope protein [Homo sapiens]	4.1e-002	4.1	51195.6	14326057	1 (0 0 1 0 0)
	EN30_13,1281 - 128 R.WLPCAFPQGGV.S	1232.56	2	0.172	22.0	82 4/30
60	gi1687494 gb AAH7004.1 SRX11 protein [Homo sapiens]	4.2e-002	10.1	13608.1	1687494	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12,1341 L.RVYLGAISTDLQ.-	1319.70	2	0.347	100.7	1 7/33
61	gi151467517 ref XP_498309.1 PREDICTED: similar to Collagen-binding protein 2 precursor (Colligin 2	4.3e-002	10.0	43509.2	51467517	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_15,451 R.MPHKKDLVLTYSFHATAFEL.D	2348.21	3	0.002	20.2	1 6/114



## Fortsetzung der Kandidatenliste aus unspezifischer BN30-Probenaufarbeitung

62	gi 34531977 dbj BAC36278.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	4.3e-002	10.0	0.326	20248.9	34531977	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12_1305 A.MGTSGRVSA.H	964.49	2	4.3e-002	13.2	8	2/27
63	gi 51464647 ref XP_371777.2 PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 9530066k23 [Homo sapiens]	4.5e-002	8.1	0.041	31736.1	51464647	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11_1111 R.LEDKRNL.V	830.46	2	4.5e-002	151.6	11	7/18
64	gi 34534039 dbj BAC36887.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	4.7e-002	10.0	0.163	22169.5	34534039	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_15_570 SJCLFLLPVLVVSFTKG.T	2060.26	3	4.7e-002	4.3	2	3/102
65	gi 1418763 emb CAA93152.1 beta 2 isoform of 61kDa regulatory subunit of PP2A [Homo sapiens]	4.8e-002	10.1	0.000	57257.9	1418763	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12_1468 A.SELHELL.S	840.45	1	4.8e-002	205.9	1	8/18
66	gi 5802810 gb AAD51791.1 Gag-Pro-Pol protein [Homo sapiens]	4.8e-002	8.1	0.084	130155.2	5802810	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_12_1488 G.SELHELD	840.45	1	4.8e-002	205.9	1	8/18
67	gi 47077068 dbj BAD10464.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	4.8e-002	10.1	0.029	57013.4	47077068	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_13_430 K.VAEYARRFGVPII	1377.76	2	4.8e-002	22.1	9	4/33
68	gi 1689537 dbj BAA11048.1 SEC14L [Homo sapiens]	4.8e-002	4.0	0.429	81226.2	1689537	1 (0 0 1 0 0)
	EN30_11_811 P.GVLDQYYAGG.W	1113.52	2	4.8e-002	10.6	13	2/27
69	gi 42542977 pdb 1G2WIA Chain A, X-Ray Crystal Structure Of Human Galectin-1	4.9e-002	12.1	-	14586.2	42542977	2 (0 1 0 1 0)
	EN30_11_1179 C.IIFDQ.A	623.30	1	0.2	0.739	0.000	44.6
	EN30_11_929 C.IIFDQANL	808.38	1	4.9e-002	1.607	0.190	170.7
70	gi 528666 gb AAD42075.1 phospholipase A2 activating protein [Homo sapiens]	4.9e-002	10.1	0.000	170.7	528666	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_929 A.LTFDQANP	808.38	1	4.9e-002	1.607	0.000	170.7
71	gi 3857049 ref NP_066086.2 hypothetical protein LOC55844 [Homo sapiens]	5.1e-002	8.0	0.107	122600.2	3857049	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_14_789 - 771 Q.TSPYPPECCM.G	1224.47	2	5.1e-002	0.032	1.4	1/30
72	gi 51461046 ref XP_496582.1 PREDICTED: similar to Glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1	5.1e-002	8.0	0.183	76884.9	51461046	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11_1546 L.NKGRKYS.S	916.57	2	5.1e-002	12.0	9	2/21
73	gi 6729770 pdb 1BZC1A Chain A, Human Pip1b Catalytic Domain Complexed With Tpi	5.1e-002	10.1	0.169	37288.7	6729770	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_977 - 1003 I.FEDTNL.K	738.33	1	5.1e-002	137.6	1	7/15
74	gi 62896593 dbj BAD06237.1 enolase 1 variant [Homo sapiens]	5.2e-002	10.1	0.169	47111.3	62896593	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_12_450 L.FTSKGLR.A	955.54	3	5.2e-002	65.7	1	8/42
75	gi 57529131 ref NP_055875.1 hypothetical protein LOC23080 [Homo sapiens]	5.3e-002	8.0	0.386	71902.6	57529131	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_14_1131 G.NVMYTTSRNVYGTGKAVGG.S	1989.05	3	5.3e-002	0.902	0.386	8.7
76	gi 3489742 ref NP_910217.1 EST AU031036(E06017) corresponds to a region of the predicted gene.-S1	5.3e-002	10.0	0.187	126386.5	3489742	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_11_1091 L.IYAYMLVEVGK.V.S	1384.75	3	5.3e-002	0.929	8.1	9/466
77	gi 7022510 dbj BAA91625.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	5.7e-002	8.1	0.666	59388.1	7022510	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11_989 F.NFDYRGLNW.L	1191.59	2	5.7e-002	28.4	54	4/24
78	gi 5479495 gb AAV39916.1 immunoglobulin mu heavy chain [Homo sapiens]	5.9e-002	10.0	0.201	17130.7	5479495	1 (1 0 0 0 0)
	EN30_13_1149 G.GVNASLPDFY.W	1195.60	2	5.9e-002	0.519	9.1	25
79	gi 7662308 ref NP_065513.1 hypothetical protein LOC9725 [Homo sapiens]	6.0e-002	8.0	0.247	92100.2	7662308	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11_837 G.GQDFENELGCCPWL.T	1681.70	2	6.0e-002	0.317	1.4	30
80	gi 52627141 ref NP_001005283.1 offactory receptor, family 9, subfamily Q, member 2 [Homo sapiens]	6.1e-002	8.1	0.425	35339.4	52627141	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_14_1211 - 121 MLAVLWEHGT.LS	1239.67	3	6.1e-002	1.264	51.7	2
81	gi 4220900 gb AAD12725.1 transcriptional co-activator CRSP150 [Homo sapiens]	6.1e-002	8.1	0.250	160559.6	4220900	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11_537 - 539 A.RSLPQPAHL	1005.55	2	6.1e-002	98.2	2	7/24
82	gi 1507680 dbj BAA01186.1 alanine aminotransferase [Homo sapiens]	6.5e-002	8.1	0.110	54466.3	1507680	1 (0 1 0 0 0)
	EN30_11_715 Y.IERROGCPADP.N	1295.67	2	6.5e-002	64.9	4	5/33
83	gi 16924258 gb AAH7403.1 Unknown (protein for IMAGE4290619) [Homo sapiens]	6.7e-002	10.0	0.110	25800.2	16924258	1 (1 0 0 0 0)

6.5 Kandidatenlisten aus unspezifischer A498-Probenaufarbeitung (zu Abb. 4-15 + Abb. 4-16)

6.5.1 Ergebnisse aus C8-Fraktion 5 (mit Cut Off < 3 kDa) (aus Kapillar-HPLC/ESI-IT-MS/MS)

Aufnahmemodus: Summit + LCQ Deca Xp („Dep MS/MS“ aus Tab. 3-5)
Filterparameter: „+/- 0.5 u“; „Peptide Probability 1:1000“ (Parameter 2 in Tab. 3-9)

Table with columns: #, Scan(s), Reference, MH+ z, Peptide, P (pep). Lists various protein identifications such as T cell receptor beta chain, actin, and various kinase proteins.

6.5.2 Ergebnisse aus C8-Fraktion 5 (mit Cut Off < 3 kDa) (aus Nano-HPLC/Nano-ESI-FTICR-MS/MS)

Aufnahmemodus: UltimatePlus + LTQ FT („Dep MS/MS“ aus Tab. 3-7)
Filterparameter: „+/- 3 ppm“; „Peptide Probability 1:1000“ (Parameter 2 in Tab. 3-9)

Table with columns: #, Scan(s), Reference, MH+ z, Peptide, P (pep). Lists various protein identifications such as Transgelin 2, ribosomal protein S19, and various actin and cyclophilin complexes.







### 6.6 Kandidatenliste aus spezifischer IAC-Probenaufarbeitung der A498

Daten erhalten aus offline NSI-Messungen am *LTQ FT* der Fraktionen 2-26 nach „Dep MS/MS“ aus Tab. 3-8:

File_Scan(s)	Reference Peptide	MH-	z	P (pp)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)
					XC	ACn	Sp	RSP	Ions
									Count
1	gi12653091 gb AAH0266.1 MAH1 dehydrogenase (ubiquinone) 1 [Homo sapiens]	868.55	1	1.3e-003	10.1	0.208	8087.1	12653091	1 (1 0 0 0)
2	gi30594653 gb AAP36579.1 Homo sapiens hexosaminidase B (beta polypeptide) [synthetic construct]	889.52	1	2.5e-002	10.0	0.134	63184.3	30594653	1 (1 0 0 0)
3	gi1701814 sp O8H457 PAO84.RUMAN Progestin and adipoQ receptor family member IV	855.53	1	1.0	10.1	0.188	29077.0	51701814	1 (1 0 0 0)
4	gi15446653 ref XP_371481.3 PREDICTED: similar to hypothetical protein FL14480 [Homo sapiens]	868.55	1	1.0	8.0	0.411	58828.9	51460534	1 (1 0 0 0)
5	gi6006011 ref NP_005492.1 integrin alpha 3 isoform b, precursor [Homo sapiens]	888.47	1	1.0	10.0	0.247	118880.2	6006011	1 (1 0 0 0)
6	gi12698684 gb AAK01642.1 LY-6 neurotoxin-like protein Lynx1 [Homo sapiens]	1012.59	1	1.0	8.0	0.114	8895.3	12698684	1 (1 0 0 0)
7	gi2066654 gb BAD2874.1 Vascular endothelial growth factor receptor 3 precursor variant [Homo s	889.52	1	1.0	8.0	0.143	71688.3	62088854	1 (1 0 0 0)
8	gi15147217 ref XP_497484.1 PREDICTED: similar to PROHIBITIN (B-CELL RECEPTOR ASSOCIATED PROTEIN 3	889.52	1	1.0	8.0	0.243	10750.6	5147217	1 (1 0 0 0)
9	gi1806040 emb CA465898.1 adiopophilin [Homo sapiens]	854.46	1	1.0	10.1	0.262	48070.5	1806040	1 (1 0 0 0)
10	gi43920370 gb AAO4872.1 TPK: olfactory receptor OR1-67 [Homo sapiens]	1057.80	2	1.0	8.1	0.154	35490.3	43920370	1 (1 0 0 0)
11	gi12654689 gb AAH01189.1 SRP2 protein [Homo sapiens]	889.52	1	1.0	10.0	0.059	9207.5	12654689	1 (1 0 0 0)
12	gi5006420 gb AAD3749.1 ribonucleotide reductase M1 subunit [Homo sapiens]	886.47	1	1.0	6.1	0.164	89984.5	5006420	1 (1 0 0 0)
13	gi1464351 ref XP_497891.1 PREDICTED: similar to GalNAc transferase 10 isoform a, GalNAc transfer	886.47	1	1.0	8.0	0.159	72928.9	5146351	1 (1 0 0 0)
14	gi2135161 pr IS21727 gamma-interferon-induced protein IP-30 precursor - human. (fragment)	888.52	1	1.0	10.0	0.301	11387.7	2135161	1 (1 0 0 0)
15	gi7959199 gb AA85993.1 HSA41-69 protein [Homo sapiens]	855.53	1	1.0	6.0	0.169	74412.4	7959199	1 (1 0 0 0)
16	gi151472008 ref XP_498146.1 PREDICTED: similar to HY-REN-7 antigen [Homo sapiens]	886.47	1	1.0	6.0	0.301	30340.5	51472008	1 (1 0 0 0)
17	gi48257056 gb AAH18847.2 TALD01 protein [Homo sapiens]	888.47	1	1.0	8.0	0.247	37386.4	48257056	1 (1 0 0 0)
18	gi22134628 gb AAH82997.1 putative anion transporter [Homo sapiens]	1057.81	2	1.0	10.1	0.146	60021.1	22134628	1 (1 0 0 0)
19	gi7513043 pr I00391 hypothetical protein KIAA0612 - human (fragment)	894.49	1	1.0	10.0	0.000	18692.49	7513043	1 (1 0 0 0)
20	gi5803027 ref NP_006811.1 histocompatibility 28 [Homo sapiens]	1034.57	2	1.0	10.0	0.038	46903.0	5803027	1 (1 0 0 0)
21	gi6595917 emb CA16648.1 O1THUMP0000018654 [Homo sapiens]	789.45	1	1.0	10.0	0.246	20099.6	6595917	1 (1 0 0 0)
22	gi6808257 emb CAB70896.1 hypothetical protein [Homo sapiens]	659.15	1	1.0	10.0	0.008	18435.2	6808257	1 (1 0 0 0)
23	gi37544402 gb AAH6162.1 envelope glycoprotein [Homo sapiens]	884.49	1	1.0	8.0	0.799	59799.4	37544402	1 (1 0 0 0)
24	gi2582415 gb AA82561.1 zinc transporter 4 [Homo sapiens]	1034.57	2	1.0	8.0	0.123	47466.6	2582415	1 (1 0 0 0)
25	gi912716 gb AA833747.1 iduronate-2-sulfatase, IDS (EC 3.1.6.13) [human, Hunter syndrome patient s	889.57	2	1.0	8.0	0.086	61860.0	912716	1 (1 0 0 0)
26	gi1606064 ref NP_569927.1 MAP-kinase activating death domain-containing protein isoform b [Homo	789.44	1	1.0	6.0	0.000	17337.9	1606064	1 (1 0 0 0)
27	gi46559358 gb BAD16739.1 fibrillin 1 [Homo sapiens]	659.15	1	1.0	8.0	0.039	312006.0	46559358	1 (1 0 0 0)
28	gi3603230 gb AAD08639.1 cytochrome oxidase assembly factor [Homo sapiens]	855.53	1	1.0	4.0	0.204	46972.5	3603230	1 (1 0 0 1)
29	gi38372683 sp O8NGF3I0R4X2.HUMAN Olfactory receptor 4X2	1012.59	2	1.0	4.0	0.124	34265.9	38372683	1 (1 0 0 1)
30	gi2135871 pr I138080 replication licensing factor MCM5 - human	1012.58	2	1.0	2.0	0.247	82192.3	2135871	1 (1 0 0 1)

Database... human\_thieu\_new.fasta Filter(s)... different peptides ; precursor=600.00;1400.00 ; mass +/- =3.0 PPM

Anhang 6.6 (Abschnitt 1/3)

Die farbigen Kreise markieren einen Ergebnistreffer mit „Peptide Probability“-Werten von größer (grün) bzw. kleiner (gelb) „10<sup>-3</sup>“ (= „1:1000“); ein weißer Kreis bedeutet ein „Peptide Probability“-Wert von „1“ (= „1:1“).

Fortsetzung der Kandidatenliste aus spezifischer IAC-Probenaufarbeitung von Fraktionen 28-42 („Dep MS/MS“ aus Tab. 3-8):

File_Scan(s)	Peptide	Reference	P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (bits)
z	MH+		P (pep)	XC	ΔCn	Sp	RSP	ions
								Count
1	gi 23491778 db BAC19833.1 ribosomal protein L10-like [Homo sapiens]		9.5e-004	10.0	0.907	4360.3	23491778	1 (1 0 0 0)
2	gi 3112011 db AAH03179.1 BEE protein [Homo sapiens]		3.7e-002	8.1	0.067	17338.0	13112011	1 (1 0 0 0)
3	gi 4191562 db AAH09814.1 neutral amino acid transporter [Homo sapiens]		5.8e-002	10.1	0.209	56347.4	4191562	1 (1 0 0 0)
4	gi 256073 db AAB91446.1 CTC26 [Homo sapiens]		8.0	8.0	0.246	21906.8	256073	1 (0 1 0 0)
5	gi 21460705 ref NP_659438.1 leucine rich repeat containing 46 [Homo sapiens]		8.0	8.0	0.159	75904.7	21460705	1 (0 1 0 0)
6	gi 4147307 ref XP_371965.1 PREDICTED: similar to Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3p [Pr		1.0	10.0	0.068	37994.9	4147307	1 (1 0 0 0)
7	gi 46946357 db AAI07090.1 XK-related protein 4 [Homo sapiens]		1.0	10.0	0.068	71463.7	46946357	1 (1 0 0 0)
8	gi 17290096 db BAB76516.1 transcription factor ELYS [Homo sapiens]		1.0	10.0	0.246	252395.9	17290096	1 (1 0 0 0)
9	gi 5689547 db BA83057.1 KIAA1105 protein [Homo sapiens]		1.0	10.0	0.266	82303.9	5689547	1 (1 0 0 0)
10	gi 4052976 db AAH6493.1 DCP2 protein [Homo sapiens]		1.0	8.0	0.230	44580.3	4052976	1 (0 1 0 0)
11	gi 15468803 ref XP_371320.2 PREDICTED: FLJ06193 protein [Homo sapiens]		1.0	10.0	0.000	153065.8	15468803	1 (1 0 0 0)
12	gi 5821953 db AAV68612.1 anti-tetanus toxoid immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sap		1.0	0.073	0.0	13085.5	5821953	1 (1 0 0 0)
13	gi 2456410 db AAB7040.1 metabotropic glutamate receptor 8 [Homo sapiens]		1.0	8.0	0.000	101601.9	2456410	1 (0 1 0 0)
14	gi 62087238 db BAD92066.1 G2/mitotic-specific cyclin 1 variant [Homo sapiens]		1.0	10.0	0.000	77906.1	62087238	1 (1 0 0 0)
15	gi 31791034 ref NP_853638.1 keratin associated protein 6-3 [Homo sapiens]		1.0	8.0	0.326	10401.9	31791034	1 (0 1 0 0)
16	gi 187074 db AAA59008.1 lactate dehydrogenase-C [Homo sapiens]		1.0	10.0	0.845	28966.5	187074	1 (1 0 0 0)
17	gi 5566017 emb CAH7262.1 arginine vasopressin receptor 1B [Homo sapiens]		1.0	8.0	0.000	46940.5	5566017	1 (0 1 0 0)
18	gi 405309 ref NP_997336.1 hypothetical protein LOC400579 [Homo sapiens]		1.0	6.0	0.000	24300.3	405309	1 (0 1 0 0)
19	gi 2247287 db AAH38817.1 FK506-binding protein 6 [Homo sapiens]		1.0	10.0	0.112	37190.0	2247287	1 (1 0 0 0)
20	gi 51339295 ref NP_079040.2 hypothetical protein LOC79820 [Homo sapiens]		1.0	8.0	0.000	126942.7	51339295	1 (0 1 0 0)
21	gi 20336748 ref NP_613256.1 H2A histone family, member Y isoform 3 [Homo sapiens]		1.0	4.0	0.001	39566.4	20336748	1 (0 0 1 0)
22	gi 21669163 db BAC91606.1 immunoglobulin lambda light chain VLJ region [Homo sapiens]		1.0	8.0	0.002	11597.6	21669163	1 (0 1 0 0)
23	gi 38348352 ref NP_940923.1 hypothetical protein LOC374467 [Homo sapiens]		1.0	8.0	0.001	135743.9	38348352	1 (0 1 0 0)
			1.0	0.864	0.006	30.7		4

Fortsetzung der Kandidatenliste aus spezifischer IAC-Probenaufarbeitung von Fraktionen 28-42 („Dep MS/MS“ aus Tab. 3-8):

24	gi 52947 gb AA828816.1 heat shock protein HSP72 homolog [Homo sapiens]	1.0	6.0	10713.5	462947	1 (0 0 1 0 0)
	498_2nd_29_203 - 29:E.VNEVYISL.L	1.0	0.864	30.7	4	321
25	gi 3656270 ref NP_338191.1 voltage-dependent calcium channel alpha 1G subunit isoform 2 [Homo sap	1.0	4.0	259959.9	3656270	1 (0 0 0 1 0)
	498_2nd_29_203 - 29:R.QLFDITSL.L	1.0	0.864	30.7	4	321
26	gi 5262601 emb CAD45741.1 hypothetical protein [Homo sapiens]	1.0	14.0	112804.2	5262601	2 (0 1 1 0 0)
	498_2nd_39a_24 - P.LTYSLT.G	1.0	0.362	7.1	6	215
	498_2nd_39a_104 - 1:G.LRVLVRLQ.G	1.0	0.119	1.8	1	124
27	gi 57162293 emb CA46571.1 actin-like 7A [Homo sapiens]	1.0	10.0	48672.5	57162293	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_29_523 - Y.LFRQEKI.A	1.0	0.722	15.7	5	221
28	gi 51104923 gb AA338256.1 heat shock protein 94c [Homo sapiens]	1.0	10.0	51692.1	81104923	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_29_82 - 64 - R.LLAKGCEVY.L	1.0	0.648	12.4	16	227
29	gi 6330941 db BA86574.1 KIAA1260 protein [Homo sapiens]	1.0	10.0	91958.0	6330941	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_29_534 - L.RNKNYKEL.I	1.0	0.612	15.8	3	221
30	gi 55651769 emb CAH7272.1 RPY1-342J.42 [Homo sapiens]	1.0	10.0	67626.7	55651769	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_38_123 - G.F.VL.VAFPSL.C	1.0	0.554	34.7	2	324
31	gi 51467076 ref XP_291253.8 PREDICTED: KIAA0146 protein [Homo sapiens]	1.0	10.0	131831.2	51467076	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_29_297 - 39:IN.AIFRFRL.W	1.0	0.489	0.070	28.6	15
32	gi 8086540 db BA95898.1 REBE [Homo sapiens]	1.0	10.0	172230.1	8086540	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_39a_24 - E.I.TSYT.E	1.0	0.363	7.1	6	215
33	gi 14286290 gb AAH08938.1 Minor histocompatibility antigen 13, isoform 1 [Homo sapiens]	1.0	10.0	41521.6	14286290	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_37_8 - M.ALLPFFGAL	1.0	0.292	2.9	2	224
34	gi 13276231 emb CAC33883.1 FYVE and coiled-coil domain containing 1 [Homo sapiens]	1.0	10.0	166890.5	13276231	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_37_19 - 39 - I.C.YYCCNNY.V	1.0	0.246	0.520	4.2	118
35	gi 469971 pdb 1A7C A Chain A, Human Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 In Complex With A Penta	1.0	10.0	42799.9	469971	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_39a_104 - 1:R.LPRLVLPK.F	1.0	0.746	1.8	1	124
36	gi 54112390 ref NP_000713.2 calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1 [Homo sapi	1.0	10.0	123105.6	54112390	1 (1 0 0 0 0)
	498_2nd_36_2 - 182 - K.GTQPCDT.R	1.0	0.046	2.1	2	118
37	gi 7443955 pir PC4369 olfactory receptor, HT2 - human (fragment)	1.0	8.0	29668.0	7443955	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_29_279 - 35:IS.LLDSQLHLIM	1.0	0.754	28.5	2	327
38	gi 6253247 db BAD9573.1 anterior pharynx defective 1b short splicing variant [Homo sapiens] [MA	1.0	8.0	24266.1	6253247	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_15 - 498:L.VLLIHLVLS	1.0	0.667	30.0	2	424
39	gi 62988664 gb AA74271.1 unknown [Homo sapiens]	1.0	8.0	85896.7	62988664	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_29_534 - P.TNYLRREI.G	1.0	0.612	15.8	3	221
40	gi 62897803 db BAD9584.1 US snorNP protein 3 homolog [Homo sapiens]	1.0	8.0	21864.6	62897803	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_29_525 - 52:A.ALLDKLYAL.G	1.0	0.413	34.5	2	424
41	gi 34532960 db CAC8656.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	1.0	8.0	46214.6	34532960	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_39a_24 - A.I.TVSI.F	1.0	0.362	7.1	6	215
42	gi 66730423 ref NP_001010903.2 hypothetical protein LOC389384 [Homo sapiens]	1.0	8.0	71924.5	66730423	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_39a_157 - N.FFVRTQ.PE	1.0	0.337	1.3	22	118
43	gi 7439347 pir JC6312 protein-tyrosine-phosphatase (EC 3.1.3.48) receptor-type - human	1.0	8.0	162100.1	7439347	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_454 - 53:V.ECMSCMD.C	1.0	0.205	0.9	1	121
44	gi 37947 emb CAA2792.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	1.0	8.0	309085.7	37947	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_36_2 - 182 - I.PGTCDDT.C	1.0	0.046	2.1	2	118
45	gi 6580759 gb AAE16267.1 leucine carboxyl methyltransferase [Homo sapiens]	1.0	8.0	38237.9	6580759	1 (0 1 0 0 0)
	498_2nd_39a_97 - 15:T.SCCSTSSCDDA.D.E	1.0	0.024	1.2	1	263
46	gi 1738312 ref NP_006884.1 calicin [Homo sapiens]	1.0	6.0	66621.9	1738312	1 (0 0 1 0 0)
	498_2nd_29_184 - 23:G.RV.LV.KGYS.I.S	1.0	0.610	17.7	8	221
47	gi 28780 emb CAA28420.1 apo-B100 precursor [Homo sapiens]	1.0	2.0	514934.5	28780	1 (0 0 0 0 1)
	498_2nd_39a_52 - 10:N.TKVFHKL	1.0	0.353	1.0	53	115

Anhang 6.6 (Abschnitt 3/3)



---

## Literaturverzeichnis

1. Adams J: "The proteasome: structure, function, and role in the cell", *Cancer Treatment Reviews* **2003**, 29, 3-9
2. Albert T, Duchateau PN, Deeb SS, Pullinger CR, Cho M, Heilbron DC, Malloy MJ, Kane JP und Brown BG: "Apolipoprotein L-I is positively associated with hyperglycemia and plasma triglycerides in CAD patients with low HDL", *Journal of Lipid Research* **2005**, 46, 469-474
3. Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A, Dekan G, Vogl S, Kubista E, Heider KH, Stratowa C, Schreiber M und Sommergruber W: "Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes", *Cancer Research* **2004**, 64, 844-856
4. Amster IJ: "Fourier Transform Mass Spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, 31, 1325-1337
5. Apweiler R, Bairoch A, Wu C, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N und Yeh LS: "UniProt: the Universal Protein knowledgebase", *Nucleic Acids Research* **2004**, 32 (Database issue), D115-119
6. Arnott D, Shabanowitz J und Hunt DF: "Mass spectrometry of proteins and peptides: sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis", *Clinical Chemistry* **1993**, 39, 2005-2010
7. Arthur JR: "The glutathione peroxidases", *Cellular and Molecular Life Sciences* **2000**, 57, 1825-1835
8. Bai C, Richman R und Elledge SJ: "Human cyclin F", *The EMBO Journal* **1994**, 13, 6087-6098
9. Bairoch A und Apweiler R: "The SWISS-PROT protein sequence data bank and its new supplement TREMBL", *Nucleic Acids Research* **1996**, 24, 21-25
10. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N und Yeh LS: "The Universal Protein Resource (UniProt)", *Nucleic Acids Research* **2005**, 33 (Database Issue), D154-159
11. Barnea E, Beer I, Patoka R, Ziv T, Kessler O, Tzehoval E, Eisenbach L, Zavazava N und Admon A: "Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens", *European Journal of Immunology* **2002**, 32, 213-222
12. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF und Ziegler A: "Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis.", *Cell* **1978**, 14, 9-20
13. Beavis RC und Chait BT: "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, 3, 432-435
14. Bepler G, Sharma S, Cantor A, Gautam A, Haura E, Simon G, Sharma A, Sommers E und Robinson L: "RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival in patients with non-small-cell lung cancer", *Journal of Clinical Oncology* **2004**, 22, 1878-1885
15. Bepler G, Zheng Z, Gautam A, Sharma S, Cantor A, Sharma A, Cress WD, Kim YC, Rosell R, McBride C, Robinson L, Sommers E und Haura E: "Ribonucleotide reductase M1 gene promoter activity, polymorphisms, population frequencies, and clinical relevance", *Lung Cancer* **2005**, 47, 183-192

16. Blackburn RK und Anderegg RJ: "Characterization of femtomole levels of proteins in solution using rapid proteolysis and nano-electrospray ionization mass spectrometry", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, 8, 483-494
17. Bläker H, Hofmann WJ, Rieker RJ, Penzel R, Graf M und Otto HF: "Beta-catenin accumulation and mutation of the CTNNB1 gene in hepatoblastoma", *Genes, Chromosomes and Cancer* **1999**, 25, 399-402
18. Bökelmann V, Spengler B und Kaufmann R: "Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization", *European Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 1, 81-93
19. Bomsztyk K, Denisenko O und Ostrowski J: "hnRNP K: one protein multiple processes", *BioEssays* **2004**, 26, 629-638
20. Brandt U: "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)", *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75, 69-92
21. Buentig N, Störkel S und Atzpodien J: "Molekulargenetische Veränderungen in Nierenzellkarzinomen", *Der Urologe A* **2002**, 41, 475-481
22. Campa MJ, Wang MZ, Howard B, Fitzgerald MC und Patz Jr EF: "Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer", *Cancer Research* **2003**, 63, 1652-1656
23. Carpenter B, McKay M, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C und Murray GI: "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer", *British Journal of Cancer* **2006**, 95, 921-927
24. Ceppellini R, Mattiuz PL, Scudeller G und Visetti M: "Experimental allotransplantation in man. I. The role of the HL-A system in different genetic combinations", *Transplantation Proceedings* **1969**, 1, 385-389
25. Chamrad D und Meyer HE: "Valid data from large-scale proteomics studies", *Nature Methods* **2005**, 2, 647-648
26. Chaurand P, Lützenkirchen F und Spengler B: "Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, 10, 91-103
27. Cheburkin YV, Knyazeva TG, Peter S, Knyazev YP, Karelin MI, Shkolnik MI, Evtushenko VI, Hanson K, Ullrich A und Knyazev PG: "Molecular Portrait of Human Kidney Carcinomas: The cDNA Microarray Profiling of Kinases and Phosphatases Involved in the Cell Signaling Control", *Molecular Biology* **2002**, 36, 376-384
28. Chen MW, Vacherot F, De La Taille A, Gil-Diez-De-Medina S, Shen R, Friedman RA, Burchardt M, Chopin DK und Buttyan R: "The emergence of protocadherin-PC expression during the acquisition of apoptosis-resistance by prostate cancer cells", *Oncogene* **2002**, 21, 7861-7871
29. Chesire DR, Ewing CM, Gage WR und Isaacs WB: "In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis", *Oncogene* **2002**, 21, 2679-2694
30. Clark RE, Dodi IA, Hill SC, Lill JR, Aubert G, Macintyre AR, Rojas J, Bourdon A, Bonner PL, Wang L, Christmas SE, Travers PJ, Creaser CS, Rees RC und Madrigal JA: "Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein", *Blood* **2001**, 98, 2887-2893

31. Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW und Ting JP: "DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 15091-15096
32. Cody RB, Burner RC und Freiser BS: "Collision-Induced Dissociation with Fourier Transform Mass Spectrometry", *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 96-101
33. Cohen P: "The structure and regulation of protein phosphatases", *Annual Review of Biochemistry* **1989**, *58*, 453-508
34. Comisarow MB und Marshall AG: "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy", *Chemical Physics Letters* **1974**, *25*, 282-283
35. Comisarow MB und Marshall AG: "Frequency-sweep fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy", *Chemical Physics Letters* **1974**, *26*, 489-490
36. Comisarow MB: "Signal modeling for ion cyclotron resonance", *The Journal of Chemical Physics* **1978**, *69*, 4097-4104
37. Cottrell JS: "Protein identification by peptide mass fingerprinting", *Peptide Research* **1994**, *7*, 115-118
38. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF und Slingsluff Jr. CL: "Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines", *Science* **1994**, *264*, 716-719
39. Craven RA, Stanley AJ, Hanrahan S, Dods J, Unwin R, Totty N, Harnden P, Eardley I, Selby PJ und Banks RE: "Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma", *Proteomics* **2006**, *6*, 2853-2864
40. Dausset J: "Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion", *Vox Sanguinis* **1954**, *4*, 190-198
41. Davidson JD, Ma L, Flagella M, Geeganage S, Gelbert LM und Slapak CA: "An increase in the expression of ribonucleotide reductase large subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines", *Cancer Research* **2004**, *64*, 3761-3766
42. Dejgaard K, Leffers H, Rasmussen HH, Madsen P, Kruse TA, Gesser B, Nielsen H und Celis JE: "Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing", *Journal of Molecular Biology* **1994**, *236*, 33-48
43. Diehl M, Münz C, Keilholz W, Stevanovic S, Holmes N, Loke YW und Rammensee H-G: "Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters", *Current Biology* **1996**, *6*, 305-314
44. Dihazi H, Asif AR, Agarwal NK, Doncheva Y und Mueller GA: "Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells", *Molecular & Cellular Proteomics* **2005**, *4*, 1445-458
45. Ding M, Beck RJ, Keller CJ und Fenton RG: "Cloning and analysis of MAGE-1-related genes.", *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, *202*, 549-555
46. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD und Alice MB: "Molecular Beams of Macroions", *The Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*, 2240-2249
47. Domoto T, Miyama Y, Suzuki H, Teratani T, Arai K, Sugiyama T, Takayama T, Mugiya S, Ozono S und Nozawa R: "Evaluation of S100A10, annexin II and B-FABP expression as markers for renal cell carcinoma", *Cancer Science* **2007**, *98*, 77-82

48. Doolittle RF: "Searching through sequence databases", *Methods in Enzymology* (Ed.: Doolittle R), **1990**, 183 (*Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences*), 99-110
49. Dorus S, Vallender EJ, Evans PD, Anderson JR, Gilbert SL, Mahowald M, Wyckoff GJ, Malcom CM und Lahn BT: "Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of Homo sapiens", *Cell* **2004**, 119, 1027-1040
50. Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, Kunitake ST, Naya-Vigne J, O'Connor PM, Malloy MJ und Kane JP: "Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L", *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 25576-25582
51. Duchateau PN, Movsesyan I, Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Schoenhaus SA, O'Connor-Kearns PM, Spencer SJ, Jaffe RB, Redberg RF, Ishida BY, Matsuzawa Y, Kane JP und Malloy MJ: "Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects", *Journal of Lipid Research* **2000**, 41, 1231-1236
52. Duchateau PN, Pullinger CR, Cho MH, Eng C und Kane JP: "Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene", *Journal of Lipid Research* **2001**, 42, 620-630
53. Elias JE, Haas W, Faherty BK und Gygi SP: "Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations", *Nature Methods* **2005**, 2, 667-675
54. Eng JK, McCormack AL und Yates III JR: "An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, 5, 976-989
55. Falick AM, Hines WM, Medzihradzky KF, Baldwin MA und Gibson BW: "Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, 4, 882-893
56. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF und Whitehouse CM: "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules", *Science* **1989**, 246, 64-71
57. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF und Whitehouse CM: "Electrospray ionization-principles and practice", *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, 9, 37-70
58. Flad T (Dissertation **1998**): "Charakterisierung tumorspezifischer Antigene auf renalen Karzinomen", Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 174 Seiten
59. Flad T, Spengler B, Kalbacher H, Brossart P, Baier D, Kaufmann R, Bold P, Metzger S, Bluggel M, Meyer HE, Kurz B und Müller CA: "Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method", *Cancer Research* **1998**, 58, 5803-5811
60. Flad T, Müller L, Dihazi H, Grigorova V, Bogumil R, Beck A, Thedieck C, Müller GA, Kalbacher H und Müller CA: "T cell epitope definition by differential mass spectrometry: identification of a novel, immunogenic HLA-B8 ligand directly from renal cancer tissue", *Proteomics* **2006**, 6, 364-374
61. Frassanito MA, Mayordomo JI, DeLeo RM, Storkus WJ, Lotze MT und DeLeo AB: "Identification of Meth A sarcoma-derived class I major histocompatibility complex-associated peptides recognized by a specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte", *Cancer Research* **1995**, 55, 124-128

62. Fukumoto S, Yamauchi N, Moriguchi H, Hippo Y, Watanabe A, Shibahara J, Taniguchi H, Ishikawa S, Ito H, Yamamoto S, Iwanari H, Hironaka M, Ishikawa Y, Niki T, Sohara Y, Kodama T, Nishimura M, Fukayama M, Dosaka-Akita H und Aburatani H: "Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas", *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*, 1776-1785
63. Gamblin SJ, Davies GJ, Grimes JM, Jackson RM, Littlechild JA und Watson HC: "Activity and specificity of human aldolases", *Journal of Molecular Biology* **1991**, *219*, 573-576
64. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD und Bairoch A: "ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis", *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 3784-3788
65. Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethe B, Brasseur F und Boon T: "Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes.", *Journal of Experimental Medicine* **1994**, *179*, 921-930
66. Gumley TP, McKenzie IF und Sandrin MS: "Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules", *Immunology and Cell Biology* **1995**, *73*, 277-296
67. Hamm GH und Cameron GN: "The EMBL data library", *Nucleic Acids Research* **1986**, *14*, 5-9
68. Haynes PA, Gygi SP, Figeys D und Aebersold R: "Proteome analysis: biological assay or data archive?", *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1862-1871
69. Heid HW, Schnolzer M und Keenan TW: "Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane", *Biochemical Journal* **1996**, *320*, 1025-1030
70. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR und Keenan TW: "Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases", *Cell and Tissue Research* **1998**, *294*, 309-321
71. Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Müller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J und Stone SR: "alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure", *Biochemistry* **1990**, *29*, 3166-3173
72. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C und Watanabe C: "Identifying Proteins from Two-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide Fragments in Protein Sequence Databases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *190*, 5011-5015
73. Henzel WJ, Watanabe C und Stults JT: "Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14*, Sept 2003
74. Herr W, Ranieri E, Olson W, Zarour H, Gesualdo L und Storkus WJ: "Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4+ and CD8+ T lymphocyte responses", *Blood* **2000**, *96*, 1857-1864
75. Higdon R, Hogan JM, Van Belle G und Kolker E: "Randomized sequence databases for tandem mass spectrometry peptide and protein identification.", *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2005**, *9*, 364-379
76. Hinck L, Näthke IS, Papkoff J und Nelson WJ: "Beta-catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways", *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19*, 538-542
77. Horie S, Aruga S, Kawamata H, Okui N, Kakizoe T und Kitamura T: "Biological role of HGF/MET pathway in renal cell carcinoma", *The Journal of Urology* **1999**, *161*, 990-997

- 
78. Hülken J, Birchmeier W und Behrens J: "E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton", *The Journal of Cell Biology* **1994**, 127, 2061-2069
  79. Hunt DF, Yates III JR, Shabanowitz J, Winston S und Hauer CR: "Protein Sequencing by Tandem Mass Spectrometry", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, 83, 6233-6237
  80. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E und Engelhard VH: "Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry", *Science* **1992**, 255, 1261-1263
  81. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox A, Sakaguchi K, Appella E, Grey HM und Sette A: "Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad", *Science* **1992**, 256, 1817-1820
  82. Hunter T: "Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling", *Cell* **1995**, 80, 225-236
  83. Hwang TL, Liang Y, Chien KY und Yu JS: "Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma", *Proteomics* **2006**, 6, 2259-2272
  84. Ikonomou MG, Blades AT und Kebarle P: "Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance", *Analytical Chemistry* **1991**, 63, 1989-1998
  85. Iribarne JV und Thomson BA: "On the evaporation of small ions from charged droplets", *The Journal of Chemical Physics* **1976**, 64, 2287-2294
  86. James P, Quadroni M, Carafoli E und Gonnet G: "Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting", *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, 195, 58-64
  87. Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Rock KL, Liu Q, Hsieh CC, Li C, Chen W, Duan HO, McDougal S und Wu CL: "Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study", *The Lancet Oncology* **2006**, 7, 556-564
  88. Johnson RS und Biemann K: "Computer program (SEQPEP) to aid in the interpretation of high-energy collision tandem mass spectra of peptides", *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry (Biological Mass Spectrometry)* **1989**, 18, 945-957
  89. Kageyama G, Kawano S, Kanagawa S, Kondo S, Sugita M, Nakanishi T, Shimizu A und Kumagai S: "Effect of mutated transporters associated with antigen-processing 2 on characteristic major histocompatibility complex binding peptides: analysis using electrospray ionization tandem mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, 18, 995-1000
  90. Karas M, Bachmann D und Hillenkamp F: "Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules", *Analytical Chemistry* **1985**, 57, 2935-2939
  91. Karas M, Bachmann D, Bahr U und Hillenkamp F: "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, 78, 53-68
  92. Karas M und Hillenkamp F: "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons", *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 2299-2301

93. Karas M, Bahr U und Hillenkamp F: "UV Laser Matrix Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins in the 100 000 Dalton Range", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, 92, 231-242
94. Karas M, Bahr U, Ingendoh A und Hillenkamp F: "Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins of Mass 100 000 to 250 000 Dalton", *Angewandte Chemie International Edition in English* **1989**, 28, 760-761
95. Karas M, Glückmann M und Schäfer J: "Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors", *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, 1-12
96. Kaufmann R, Spengler B und Lützenkirchen F: "Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, 7, 902-910
97. Kaufmann R, Kirsch D und Spengler B: "Sequencing of Peptides in a Time-of-Flight MS: Evaluation of Postsource Decay Following Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1994**, 131, 355-385
98. Kaufmann R, Chaurand P, Kirsch D und Spengler B: "Post-source decay and delayed extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization-reflectron time-of-flight mass spectrometry. Are there trade-offs?", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, 10, 1199-1208
99. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E und Aebersold R: "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search", *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 5383-5392
100. Kellner R, Lichtenfels R, Atkins D, Bukur J, Ackermann A, Beck J, Brenner W, Melchior S und Seliger B: "Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance", *Proteomics* **2002**, 2, 1743-1751
101. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS und Mak TW: "DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN", *Cancer Cell* **2005**, 7, 263-273
102. Kimura N, Takizawa M, Okita K, Natori O, Igarashi K, Ueno M, Nakashima K, Nobuhisa I und Taga T: "Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse foetal haematopoietic tissues", *Genes to Cells* **2002**, 7, 435-446
103. Kjaer M: "Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading", *Physiological Review* **2004**, 84, 649-698
104. Klade CS, Voss T, Krystek E, Ahorn H, Zatloukal K, Pummer K und Adolf GR: "Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis", *Proteomics* **2001**, 1, 890-898
105. Kondoh N, Schweinfest CW, Henderson KW und Papas TS: "Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class I messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation", *Cancer Research* **1992**, 52, 791-796
106. Kong M, Barnes EA, Ollendorff V und Donoghue DJ: "Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction", *The EMBO Journal* **2000**, 19, 1378-1388
107. Kristensen P, Johnsen AH, Uerkvitz W, Tanaka K und Hendil KB: "Human proteasome subunits from 2-dimensional gels identified by partial sequencing", *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, 205, 1785-1789

- 
108. Krüger T, Schoor O, Lemmel C, Kraemer B, Reichle C, Dengjel J, Weinschenk T, Müller M, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee H-G und Stevanovic S: "Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy.", *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2005**, *54*, 826-836
109. Kubo RT, Sette A, Grey HM, Appella E, Sakaguchi K, Zhu N, Arnott D, Sherman N, Shabanowitz J, Michel H, Bodnar WM, Davis TA und Hunt DF: "Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles", *The Journal of Immunology* **1994**, *152*, 3913-3924
110. Lehmann WD, Bohne A und von der Lieth CW: "The information encrypted in accurate peptide masses - improved protein identification and assistance in glycopeptide identification and characterization", *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1335-1341
111. Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee H-G und Stevanovic S: "Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling", *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 450-454
112. Lev A, Denkberg G, Cohen C, Tzukerman M, Skorecki KL, Chames P, Hoogenboom HR und Reiter Y: "Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T-cell epitopes of the telomerase catalytic subunit", *Cancer Research* **2002**, *62*, 3184-3194
113. Li M, Zhai Q, Bharadwaj U, Wang H, Li F, Fisher WE, Chen C und Yao Q: "Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147", *Cancer* **2006**, *106*, 2284-2294
114. Linehan WM, Vasselli J, Srinivasan R, Walther MM, Merino M, Choyke P, Vocke C, Schmidt L, Isaacs JS, Glenn G, Toro J, Zbar B, Bottaro D und Neckers L: "Genetic Basis of Cancer of the Kidney: Disease-Specific Approaches to Therapy", *Clinical Cancer Research* **2004**, *10*, 6282S-6289S
115. Liu JJ, Huang BH, Zhang J, Carson DD und Hooi SC: "Repression of HIP/RPL29 expression induces differentiation in colon cancer cells", *Journal of Cellular Physiology* **2006**, *207*, 287-292
116. Luckey CJ, Marto JA, Partridge M, Hall E, White FM, Lippolis JD, Shabanowitz J, Hunt DF und Engelhard VH: "Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors", *The Journal of Immunology* **2001**, *167*, 1212-1221
117. Mann GJ, Musgrove EA, Fox RM und Thelander L: "Ribonucleotide reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation", *Cancer Research* **1988**, *48*, 5151-5156
118. Mann M, Højrup P und Roepstorff P: "Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases", *Biological Mass Spectrometry* **1993**, *22*, 338-345
119. Mann M und Wilm M: "Error Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags", *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 4390-4399
120. Marshall AG, Hendrickson CL und Jackson GS: "Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer", *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 1-35
121. Marshall AG und Hendrickson CL: "Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **2002**, *215*, 59-75



- 
122. Meng CK, Mann M und Fenn JB: "Of protons or proteins: "A beam's a beam for a' that." (O.S. Burns)", *Zeitschrift für Physik D Atoms, Molecules and Clusters* **1988**, 10, 361-368
123. Mildred-Scheel-Abschlussbericht **2003** (Müller CA, Müller GA und Spengler B): "MHC-Klasse I/II assoziierte Tumorpeptide auf renalen Karzinomzellen: Charakterisierung und Stimulation der zellulären Immunantwort *in vitro* und *in vivo*", 1-42
124. Mills GC: "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown", *Journal of Biological Chemistry* **1957**, 229, 189-197
125. Milner E, Barnea E, Beer I und Admon A: "The turnover kinetics of major histocompatibility complex peptides of human cancer cells", *Molecular & Cellular Proteomics* **2006**, 5, 357-365
126. Miwa JM, Ibanez-Tallon I, Crabtree GW, Sanchez R, Sali A, Role LW und Heintz N: "lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS", *Neuron* **1999**, 23, 105-114
127. Miwa JM, Stevens TR, King SL, Caldarone BJ, Ibanez-Tallon I, Xiao C, Fitzsimonds RM, Pavlides C, Lester HA, Picciotto MR und Heintz N: "The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival *in vivo*", *Neuron* **2006**, 51, 587-600
128. Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ und Jackson SP: "hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage", *Cell* **2005**, 123, 1065-1078
129. Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takahashi Y, Okami J, Yoshioka S, Yamasaki M, Marubashi S, Takemasa I, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M und Monden M: "Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer", *International Journal of Cancer* **2007**, 120, 1355-1363
130. Neufeld EF: "Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase", *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264, 10927-10930
131. Nielsen ML, Savitski MM und Zubarev RA: "Improving protein identification using complementary fragmentation techniques in fourier transform mass spectrometry", *Molecular & Cellular Proteomics* **2005**, 4, 835-845
132. Nothwang HG, Tamura T, Tanaka K und Ichihara A: "Sequence analyses and inter-species comparisons of three novel human proteasomal subunits, HsN3, HsC7-I and HsC10-II, confine potential proteolytic active-site residues", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1994**, 1219, 361-368
133. Oh HS, Kwon H, Sun SK und Yang CH: "QM, a putative tumor suppressor, regulates proto-oncogene c-yes", *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 36489-36498
134. Papayannopoulos IA: "The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides", *Mass Spectrometry Reviews* **1995**, 14, 49-73
135. Pappin DJC, Hojrup P und Bleasby AJ: "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting", *Current Biology* **1993**, 3, 327-332
136. Park S und Jeong DG: "Ribosomal protein L10 interacts with the SH3 domain and regulates GDNF-induced neurite growth in SH-SY-5y cells", *The Journal of Biological Chemistry* **2006**, 99, 624-634
137. Paul W und Steinwedel H: "Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld", *Zeitschrift für Naturforschung A* **1953**, 8a, 448-450

- 
138. Paul W und Raether M: "Das elektrische Massenfilter", *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **1955**, 140, 262-273
139. Paul W: "Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles (Nobel Lecture)", *Angewandte Chemie International Edition in English* **1989**, 29, 739-748
140. Pearson WR: "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology* (Ed.: Doolittle R), **1990**, 183 (*Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences*), 63-98
141. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ und Gygi SP: "Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome", *Journal of Proteome Research* **2003**, 2, 43-50
142. Qian WJ, Liu T, Monroe ME, Strittmatter EF, Jacobs JM, Kangas LJ, Petritis K, Camp II DG und Smith RD: "Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and SEQUEST analysis: the human proteome", *Journal of Proteome Research* **2005**, 4, 53-62
143. Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL und Clements JA: "Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display", *International Journal of Cancer* **2000**, 88, 726-732
144. Rammensee H-G, Friede T und Stevanovic S: "MHC ligands and peptide motifs: first listing", *Immunogenetics* **1995**, 41, 178-228
145. Rammensee H-G, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA und Stevanovic S: "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.", *Immunogenetics* **1999**, 50, 213-219
146. Rammensee H-G: "Immunology: Survival of the fitters", *Nature* **2002**, 419, 443-445
147. Rasala BA, Orjalo AV, Shen Z, Briggs S und Forbes DJ: "ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 17801-17806
148. Rejtar T, Chen HS, Andreev V, Moskovets E und Karger BL: "Increased identification of peptides by enhanced data processing of high-resolution MALDI TOF/TOF mass spectra prior to database searching.", *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 6017-6028
149. Roepstorff P und Fohlman J: "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides", *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, 11, 601
150. Rueckner W, Georgi J, Goodale D, Rosenberg D und Tavilla D: "Rotating saddle Paul trap", *American Journal of Physics* **1995**, 63, 186-187
151. Saarela J, Ylikarppa R, Rehn M, Purmonen S und Pihlajaniemi T: "Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts", *Matrix Biology* **1998**, 16, 319-328
152. Sandhoff K: "Variation of beta-N-acetylhexosaminidase-pattern in Tay-Sachs disease", *FEBS Letters* **1969**, 4, 351-354
153. Sandhoff K, Conzelmann E, Neufeld EF, Kaback MM und Suzuki K: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Ed.: Scriver C, Beaudet A, Sly W und Valle D), McGraw-Hill, New York, **1989**, 1807-1839
154. Savitski MM, Nielsen ML, Kjeldsen F und Zubarev RA: "Proteomics-grade de novo sequencing approach", *Journal of Proteome Research* **2005**, 4, 2348-2354

- 
155. Savitski MM, Kjeldsen F, Nielsen ML und Zubarev RA: "Complementary sequence preferences of electron-capture dissociation and vibrational excitation in fragmentation of polypeptide polycations", *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 5301-5303
156. Schag K, Schmidt SM, Müller MR, Weinschenk T, Appel S, Weck MM, Grünebach F, Stevanovic S, Rammensee H-G und Brossart P: "Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes", *Clinical Cancer Research* **2004**, *10*, 3658-3666
157. Schlosser A und Lehmann WD: "Patchwork peptide sequencing: Extraction of sequence information from accurate mass data of peptide tandem mass spectra recorded at high resolution", *Proteomics* **2002**, *2*, 524-533
158. Schmelzeisen-Redeker G, Bütfering L und Röllgen FW: "Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, *90*, 139-150
159. Schmidt SM, Schag K, Müller MR, Weinschenk T, Appel S, Schoor O, Weck MM, Grünebach F, Kanz L, Stevanovic S, Rammensee H-G und Brossart P: "Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis", *Cancer Research* **2004**, *64*, 1164-1170
160. Schrader W und Klein HW: "Liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LC-FTICR MS): an early overview", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *379*, 1013-1024
161. Seliger B, Fedorushchenko A, Brenner W, Ackermann A, Atkins D, Hanash S und Lichtenfels R: "Ubiquitin COOH-terminal hydrolase 1: a biomarker of renal cell carcinoma associated with enhanced tumor cell proliferation and migration", *Clinical Cancer Research* **2007**, *13*, 27-37
162. Shadforth I, Dunkley T, Lilley K, Crowther D und Bessant C: "Confident protein identification using the average peptide score method coupled with search-specific, ab initio thresholds", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 3363-3368
163. Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL und Li D: "Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry", *Cancer Research* **2004**, *64*, 9018-9026
164. Shi Y, Xiang R, Horváth C und Wilkins JA: "The role of liquid chromatography in proteomics", *Journal of Chromatography A* **2004**, *1053*, 27-36
165. Shibata T, Chuma M, Kokubu A, Sakamoto M und Hirohashi S: "EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma", *Hepatology* **2003**, *38*, 178-186
166. Skinnider BF, Folpe AL, Hennigar RA, Lim SD, Cohen C, Tamboli P, Young A, de Peralta-Venturina M und Amin MB: "Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors", *The American Journal of Surgical Pathology* **2005**, *29*, 747-754
167. Spengler B, Kirsch D und Kaufmann R: "Fundamental Aspects of Post-Source Decay in Matrix-Assisted Laser desorption Mass Spectrometry: I. Residual Gas Effects", *Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 9678-9684
168. Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R und Jaeger E: "Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, *6*, 105-108

169. Spengler B: "Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules", *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 1019-1036
170. Spengler B: "De novo sequencing, peptide composition analysis, and composition-based sequencing: A new strategy employing accurate mass determination by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, 15, 703-714
171. Stevanovic S und Schild H: "Quantitative aspects of T cell activation-peptide generation and editing by MHC class I molecules", *Seminars in Immunology* **1999**, 11, 375-384
172. Storkus WJ, Zeh 3rd HJ, Salter RD und Lotze MT: "Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution", *Journal of Immunotherapy* **1993**, 14, 94-103
173. Strupat K, Karas M und 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
174. Sutton J, Rowland-Jones S, Rosenberg W, Nixon D, Gotch F, Gao XM, Murray N, Spoonas A, Driscoll P, Smith M, Willis A und McMichael A: "A sequence pattern for peptides presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA B8 revealed by analysis of epitopes and eluted peptides", *European Journal of Immunology* **1993**, 23, 447-453
175. Takashi M, Zhu Y, Nakano Y, Miyake K und Kato K: "Elevated levels of serum aldolase A in patients with renal cell carcinoma", *Urological Research* **1992**, 20, 307-311
176. Takeichi M: "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator", *Science* **1991**, 251, 1451-1455
177. Tang L und Kebarle P: "Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution", *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 3654-3668
178. Taylor GK und Goodlett DR: "Rules governing protein identification by mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, 19, 3420
179. Thieu VA, Kirsch D, Flad T, Müller CA und Spengler B: "Direct Protein Identification from Nonspecific Peptide Pools by High-Accuracy MS Data Filtering", *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 3317-3319
180. Thompson RI, Harmon TJ und Ball MG: "The rotating-saddle trap: a mechanical analogy to RF-electric-quadrupole ion trapping?", *Canadian Journal of Physics* **2002**, 80, 1433-1448
181. Thomson BA und Iribarne JV: "Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure", *The Journal of Chemical Physics* **1979**, 71, 4451-4463
182. Tsukita S, Tsukita S, Nagafuchi A und Yonemura S: "Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions", *Current Opinion in Cell Biology* **1992**, 4, 834-839
183. Valaskovic GA, Kelleher NL, Little DP, Aaserud DJ und McLafferty FW: "Attomole-Sensitivity Electrospray Source for Large-Molecule Mass-Spectrometry", *Analytical Chemistry* **1995**, 67, 3802-3805
184. van der Bruggen P, Bastin J, Gajewski T, Coulie PG, Boel P, De Smet C, Traversari C, Townsend A und Boon T: "A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3.", *European Journal of Immunology* **1994**, 24, 3038-3043
185. Vorm O, Roepstorff P und Mann M: "Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation", *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 3281-3287

- 
186. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL und Humphery-Smith I: "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*", *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1090-1094
187. Wei ML und Cresswell P: "HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides", *Nature* **1992**, *356*, 443-446
188. Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S und Rammensee H-G: "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines", *Cancer Research* **2002**, *62*, 5818-5827
189. Werle B, Schanzenbacher U, Lah TT, Ebert E, Julke B, Ebert W, Fiehn W, Kayser K, Spiess E, Abrahamson M und Kos J: "Cystatins in non-small cell lung cancer: tissue levels, localization and relation to prognosis", *ONCOLOGY REPORTS* **2006**, *16*, 647-655
190. Widom J: "Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro", *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1998**, *27*, 285-327
191. Wierecky J, Müller MR, Wirths S, Halder-Oehler E, Dörfel D, Schmidt SM, Häntschel M, Brugger W, Schröder S, Horger MS, Kanz L und Brossart P: "Immunologic and Clinical Responses after Vaccinations with Peptide-Pulsed Dendritic Cells in Metastatic Renal Cancer Patients", *Cancer Research* **2006**, *66*, 5910-5918
192. Wilkins MR, Appel RD, Van Eyk JE, Chung MC, Görg A, Hecker M, Huber LA, Langen H, Link AJ, Paik YK, Patterson SD, Pennington SR, Rabilloud T, Simpson RJ, Weiss W und Dunn MJ: "Guidelines for the next 10 years of proteomics", *Proteomics* **2006**, *6*, 4-8
193. Wilm M und Mann M: "Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1994**, *136*, 167-180
194. Wilm M und Mann M: "Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source", *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 1-8
195. Wise MJ, Littlejohn TG und Humphery-Smith I: "Peptide-mass fingerprinting and the ideal covering set for protein characterisation", *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1399-1409
196. Yates III JR, Speicher S, Griffin PR und Hunkapiller T: "Peptide Mass Maps: A Highly Informative Approach to Protein Identification", *Analytical Biochemistry* **1993**, *214*, 397-408
197. Yewdell JW, Reits E und Neefjes J: "Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation", *Nature Reviews Immunology* **2003**, *3*, 952-961
198. Yost RA, Enke CG, McGilvery DC, Smith D und Morrison JD: "High efficiency collision-induced dissociation in an RF-only quadrupole", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1979**, *30*, 127-136
199. Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF und Neish AS: "Expression profiling of renal epithelial neoplasms - A method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers", *The American Journal of Pathology* **2001**, *158*, 1639-1651
200. Young MR, Liu SW und Meisinger J: "Differences in association of the serine/threonine protein phosphatase PP-2A with microtubules of metastatic and nonmetastatic tumor cells", *Clinical and Experimental Metastasis* **2001**, *18*, 407-413
201. Young MR, Kolesiak K und Meisinger J: "Protein phosphatase-2A regulates endothelial cell motility and both the phosphorylation and the stability of focal adhesion complexes", *International Journal of Cancer* **2002**, *100*, 276-282

- 
202. Zhang Y, Handy DE und Loscalzo J: "Adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress", *Circulation Research* **2005**, 96, 831-837
203. Zhou M, Peng JR, Zhang HG, Wang HX, Zhong ZH, Pan XY, Chen WF und Leng XS: "Identification of two naturally presented MAGE antigenic peptides from a patient with hepatocellular carcinoma by mass spectrometry", *Immunology Letters* **2005**, 99, 113-121
204. Zhu YY, Takashi M, Miyake K und Kato K: "An immunochemical and immunohistochemical study of aldolase isozymes in renal cell carcinoma", *The Journal of Urology* **1991**, 146, 469-472
205. Zubarev RA, Håkansson P und Sundqvist B: "Accuracy Requirements for Peptide Characterization by Monoisotopic Molecular Mass Measurements", *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 4060-4063
206. Zubarev RA, Kelleher NL und McLafferty FW: "Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, 120, 3265-3266

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 2-1: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers .....	2
Abb. 2-2: Schemazeichnung zum „Potentialsattel“ in der Paul-Falle .....	9
Abb. 2-3: Schema einer linearen Ionenfalle im <i>Finnigan LTQ</i> . .....	10
Abb. 2-4: Schematischer Aufbau und Prinzip zur FTICR-Falle. ....	11
Abb. 2-5: Schema zur Vorgehensweise einer DB-Suche mithilfe von DB-Suchprogrammen. ....	21
Abb. 2-6: Schematischer Aufbau eines MHC-I-Komplexes. ....	22
Abb. 3-1: Schema zum Aufbau der Kapillar-LC-Anlage .....	27
Abb. 3-2: Schema zum Aufbau der Nano-LC-Anlage .....	28
Abb. 3-3: Schema zum Aufbau der 3D-Ionenfalle.....	31
Abb. 3-4: Schema zum Aufbau des Hybridmassenspektrometers.....	32
Abb. 3-5: Fließschema zur Isolierung der MHC-I bindenden Peptide.....	34
Abb. 3-6: Fließschema zur unspezifischen Probenaufarbeitung.....	38
Abb. 4-1: Fragmentierungsschema des MAGE 3-Referenzpeptids mit der Sequenz FLWGPRALV.....	43
Abb. 4-2: MALDI- bzw. ESI-Übersichtsmassenspektrum und erfolgreiche ESI-MS/MS-Aufnahme von der gleichen Probe ....	44
Abb. 4-3: MS/MS-Aufnahmen des einfach geladenen Referenzpeptids (AP-MALDI + NSI am <i>Finnigan LCQ Deca XP</i> ).....	45
Abb. 4-4: MALDI-LIFT-MS <sup>2</sup> -Spektrum vom einfach geladenen MAGE 3-Peptid. ....	46
Abb. 4-5: MS/MS-Spektrum des zweifach geladenen Referenzpeptids (NSI am <i>Finnigan LCQ Deca X</i> ) .....	47
Abb. 4-6: MS <sup>3</sup> -Spektrum vom $y_7$ -Ion des Referenzpeptids (NSI am <i>Finnigan LCQ Deca XP</i> ).....	48
Abb. 4-7: MS <sup>3</sup> -Spektrum vom $y_7$ -Ion des MAGE 3-Peptids (unterschiedliche Aktivierungsamplituden) .....	49
Abb. 4-8: Fragmentationenspektrum des doppelt geladenen Referenzpeptids (NSI am <i>Finnigan LTQ FT</i> ) .....	50
Abb. 4-9: Ausgewählte Bereiche aus dem FT-Massenspektrum des Referenzpeptids (NSI am <i>Finnigan LTQ FT</i> ) .....	52
Abb. 4-10: AP-MALDI-MS/MS- und MS <sup>3</sup> -Spektrum aus Vorläuferion $m/z = 1009.6$ u bzw. $498.3$ u (Fraktion 31) .....	57
Abb. 4-11: NSI-MS/MS-Spektrum von $m/z = 1153.5$ u (Fraktion 30 bzw. synthetisches Referenzpeptid FLGENISNFL) .....	60
Abb. 4-12: NSI- MS/MS-Spektrum von $m/z = 954.6$ u (Fraktion 32 bzw. synthetische Vergleichspeptide).....	64
Abb. 4-13: Prinzip der MS-Datengenerierung anhand eines Beispiels (HPLC-Fraktion 5 der säureeluierten A498-Probe)....	77
Abb. 4-14: Ablaufschema zur neuen Methode mit Datenvalidierung .....	80
Abb. 4-15: Vergleich der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Analysemethoden auf <u>Peptidebene</u> .....	93
Abb. 4-16: Vergleich der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Analysemethoden auf <u>Proteinebene</u> .....	93

Die erste Zahl gibt die Hauptnummer des Kapitels an, worin die Abbildung zu finden ist.

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 3-1: Verwendete Chemikalien und Standard-Lösung zur Kalibrierung .....	24
Tab. 3-2: Verwendete Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien .....	24
Tab. 3-3: Synthetische Referenzpeptide .....	25
Tab. 3-4: Parameter für den Gradienten eines HPLC-Laufs .....	26
Tab. 3-5: Parameter für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme (Kapillar-LC-ESI-MS/MS; <i>Summit</i> + <i>LCQ Deca XP</i> ) .....	29
Tab. 3-6: Parameter 1 für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme (Nano-LC-NSI-MS/MS; <i>Ultimate</i> + <i>LTQ FT</i> ) .....	29
Tab. 3-7: Parameter 2 für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme (Nano-LC-NSI-MS/MS; <i>Ultimate</i> + <i>LTQ FT</i> ) .....	30
Tab. 3-8: Parameter für die datenabhängige MS/MS-Aufnahme (offline NSI-MS/MS; <i>Ultimate</i> + <i>LTQ FT</i> ) .....	30
Tab. 3-9: Filterparameter für die <i>TurboSEQUEST</i> -DB-Suche .....	40
Tab. 4-1: Vergleich der Massengenauigkeit und –auflösung an einigen Fragmentionen des MAGE3-Referenzpeptids .....	51
Tab. 4-2: Vergleich der Massengenauigkeit und –auflösung an den Quasimolekülonen des MAGE3-Referenzpeptids .....	52
Tab. 4-3: Mögliche Verwechslung von Inkrementmassen verschiedener Aminosäuren .....	61
Tab. 4-4: Beispiele für isobare Inkremente von Aminosäuren und einiger Aminosäurezusammensetzungen .....	61
Tab. 4-5: Ergebnisse aus der <i>de novo</i> -Sequenzierung anhand der <i>LCQ Deca XP</i> -Daten von RCC A498 .....	63
Tab. 4-6: Vor- und Nachteile der klassischen Methode mit Immunaффinitätschromatographie .....	73
Tab. 4-7: Vorschläge aus der DB-Suche für 878.46 u (HPLC-Fraktion 5 der säureeluierten A498-Probe) .....	78
Tab. 4-8: CBS-Methode veranschaulicht am Beispiel zu Abb. 4-13 (Teil 1) .....	78
Tab. 4-9: CBS-Methode veranschaulicht am Beispiel zu Abb. 4-13 (Teil 2) .....	79
Tab. 4-10: Vergleich der DB-Trefferanzahl bei Angabe unterschiedlicher Massenfehlertoleranzen bzw. MS-Genauigkeiten .....	82
Tab. 4-11: Ergebnisse aus der neuen Methode mithilfe CBS und DB-Suche (aus beiden RCC-Linien A498 + BN30) .....	84
Tab. 4-12: Ergebnisse aus den restlichen IAC-aufgereinigten A498-Proben mithilfe der neuen Vorgehensweise .....	96

Die erste Zahl gibt die Hauptnummer des Kapitels an, worin die Tabelle zu finden ist.



## Publikationen

**Angew. Chem. Int. Ed. 2006**, 45, 3317-3319 (online publiziert seit 18. Apr. 2006)

**V.A. Thieu**, D. Kirsch, Th. Flad, C. Müller, B. Spengler

*Direct protein identification from non-specific peptide pools by high accuracy MS data filtering*

## Vorträge und Abstracts (Vortragender unterstrichen)

**Thermo Electron GmbH - 1. FT Anwenderforum 2006**, Bremen, 04.04.2006

V.A. Thieu, M. Köstler, D. Kirsch, B. Spengler

*Kurzvortrag: Instrumentelle Methodenentwicklung in MS*

**IMSC 2006** (17. Jahrestagung), Prag, 27.08.-01.09.2006

D. Kirsch, **V.A. Thieu**, B. Spengler

*Accurate mass as a bioinformatic parameter: FT ICR MS in proteomics*

**DKFZ Heidelberg 2005**, Heidelberg, 12.10.2005

B. Spengler, D. Kirsch, **V.A. Thieu**

*More information from accurate masses - composition based de novo sequencing of peptides*

**European FTMS Workshop 2004**, Konstanz, 24.-27.03.2004

B. Spengler, D. Kirsch, W. Bouschen, **V.A. Thieu**

*Peptide composition analysis and composition based sequencing of peptides: the power and beauty of accurate mass values*

**DGMS 2004** (37. Jahrestagung), Leipzig, 07.-10.03.2004

D. Kirsch, **V.A. Thieu**, B. Spengler

*Höchstauflösende Fourier Transform Massenspektrometrie - Neue Perspektiven für die Bioanalytik*

**BMBF - 1. Proteomics Statusseminar 2003**, Bad Honnef, 12.-14.05.2003

H. Beck, J. Bernhagen, K. Borchers, W. Bouschen, H. Brunner, H. Dihazi, B. Elkin, Th. Flad, M. Furch, G. Geiger, J. Greenberg, D. Kirsch, T. Klatt, K. Maaß, C.A. Müller, G.A. Müller, M. Müller, Q. Ouyang, R. Pesch, Th. Schiestel, O. Schulz, B. Spengler, **V.A. Thieu**, J. Tolson, G. Tovar, A. Weber, J. Wessels

*I-SCAN: Charakterisierung des Immunoms renaler Karzinome*

**Posterpräsentationen + Abstracts**

**NGFN - Internationales Symposium 2006**, Gießen, 30.06.-02.07.2006

**V.A. Thieu**, D. Kirsch, B. Spengler

*Identification of proteins without specific enzymatic digestion*

**ASMS 2006** (54. Jahrestagung), Seattle (Washington, USA), 28.05.-01.06.2006

**V.A. Thieu**, D. Kirsch, B. Spengler

*Identification of proteins without specific enzymatic digestion*

**DGMS 2006** (39. Jahrestagung), Mainz, 05.-08.03.2006

**V.A. Thieu**, D. Kirsch, B. Spengler

*Identifizierung von Proteinen einer renalen Humankarzinomzelle*

**ASMS 2005** (53. Jahrestagung), San Antonio (TX, USA), 05.-09.06.2005

B. Spengler, D. Kirsch, A. Römpf, **V.A. Thieu**

*Compositional analysis and de novo sequencing of peptides by FT-ICR mass spectrometry*

**ASMS 2005** (53. Jahrestagung), San Antonio (TX, USA), 05.-09.06.2005

A. Römpf, M. Konijnenburg, I. Taban, M. Duursma, E. Amstalden, **V.A. Thieu**, D. Kirsch, T. Luider, B. Spengler, R. Heeren

*Strategies for the efficient use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry*

**DGMS 2005** (38. Jahrestagung), Rostock, 06.-09.03.2005

B. Spengler, D. Kirsch, **V.A. Thieu**

*Kompositionsanalyse und de novo-Sequenzierung von Peptiden*

**DGMS 2005** (38. Jahrestagung), Rostock, 06.-09.03.2005

A. Römpf, I. Taban, M. Duursma, **V.A. Thieu**, D. Kirsch, B. Spengler, R. Heeren

*New tools for nanoLC-FTICR-MS measurements*

**NGFN - Projektleitertreffen 2004**, Berlin, 20.-21.11.2004

B. Spengler, D. Kirsch, W. Bouschen, A. Leisner, M. Köstler, O. Schulz, C. Paschke, A. Hester, K. Maaß, **V.A. Thieu**, B. Commerscheidt, K.-P. Hinz

*Development of infrared scanning microprobe MALDI mass spectrometry for analytical imaging of tissue, molecular phenotyping and diagnostics ("IR-SMALDI")*

**DGMS 2004** (37. Jahrestagung), Leipzig, 07.-10.03.2004

**V.A. Thieu**, D. Kirsch, B. Spengler

*Structure determination of peptides on an AP-MALDI / ESI ion trap, a fourier transform mass spectrometer and a MALDI-PSD-TOF instrument*

---

**Posterpräsentationen + Abstracts** (Fortsetzung)

**IMSC 2003** (14. Jahrestagung), Edinburgh (Schottland), 31.08.-05.09.2003

**V.A. Thieu**, D. Kirsch, B. Spengler

*Structure determination and fragmentation pathway of MHC class I peptides using different ionization techniques on an AP-MALDI/ESI ion trap and a MALDI-PSD-TOF instrument*

**ASMS 2003** (51. Jahrestagung), Montreal (Kanada), 08.-12.06.2003

**V.A. Thieu**, D. Kirsch, Th. Flad, C.A. Mueller, B. Spengler

*Structure determination of MHC class I peptides of renal carcinoma cells on an AP-MALDI / ESI ion trap and a MALDI-PSD-TOF instrument*

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Thieu-Simchen (geborener Thieu)  
Vorname: Vinh An  
Geburtsdatum: 2. November 1975  
Geburtsort: Vientiane (Laos)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet seit 01.08.2006  
eine Tochter (Tara Sophie Xu Simchen)

### Werdegang:

2002 - 2007 **Promotion** am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

2001 **6-monatiges Industriepraktikum** bei „Unilever Research Colworth“, Sharnbrook (Großbritannien)

2001 **Wissenschaftliche Abschlussarbeit** am Institut für Lebensmittelchemie der TU „Carolo-Wilhelmina“ zu Braunschweig mit dem Titel:  
*Untersuchungen von Thearubigenen und Fermentationsprodukten des Epigallocatechins und Epigallocatechingallats in schwarzem Tee*

1996 - 2001 **Studium der Lebensmittelchemie** an der TU Braunschweig mit Abschluss des 1. Staatsexamens

1995 - 1996 **Wehrdienst** als Sanitätssoldat, Stadtoldendorf

1988 - 1995 **Bischöfliches Gymnasium Josephinum**, Hildesheim

1986 - 1988 **Orientierungsstufe der St.-Augustinus-Schule**, Hildesheim

1982 - 1986 **St.-Nikolaus-Grundschule**, Hildesheim

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Spengler danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion während der Tätigkeit am Institut durchführen und abschließen zu können. Seiner Weitsicht verdanke ich, dass ich mein Wissen in der Massenspektrometrie in großem Umfang weiterentwickeln durfte.

Mein Dank gilt auch Dr. Thomas Flad für die Bereitstellung der Nierenzellkarzinom-Proben, die meine Forschung im biomedizinischen Gebiet erst ermöglichten.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Dr. Dieter Kirsch für seine Fürsorge, Tipps und Diskussionsbereitschaft, die mich während meiner Arbeit am Institut begleiteten. Von seinem breiten Fachwissen und großen Engagement für unsere Arbeitsgruppe habe auch ich profitieren können.

Dr. Götz Pilarczyk und Dr. Andreas Römpp danke ich für die hilfreichen Diskussionen bei der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift.

Auch bei allen anderen Kollegen möchte ich mich für die wohl gesonnene Zeit in Gießen bedanken.

Für die Begutachtung meiner Arbeit danke ich außerdem Prof. Dr. Andrea Sinz.

Von den vielen, denen ich Dank schulde, möchte ich vor allem auch meine Eltern Thi-Nhung Nguyen und Van-Tru Thieu nennen, ohne die ich nicht zu dem geworden wäre, was ich heute bin. Ganz besonders möchte ich meiner Frau Simone Simchen danken, die mich auf jede erdenkliche Weise unterstützt hat.