

Struktureinflüsse auf das Fragmentierungs-Verhalten von Peptiden bei PSD-MALDI Massenspektrometrie

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Marco Wehofsky

aus Bremerhaven

Hannover, 18.08.2001

Inhalt

INHALT	1
1 EINLEITUNG	4
2 GRUNDLAGEN DER METHODEN	6
2.1 ALLGEMEINER ÜBERBLICK ÜBER DIE MASSENSPEKTROMETRIE	6
2.1.1 <i>Einleitung</i>	6
2.1.2 <i>Ionisations-Methoden</i>	6
2.1.3 <i>Massenanalysatoren</i>	11
2.1.4 <i>Strukturaufklärung mit MS-MS</i>	14
2.2 MALDI UND POST-SOURCE-DECAY	15
2.2.1 <i>Der Desorptions-Ionisations-Prozess</i>	15
2.2.2 <i>Ionen-Fokussierung und Delayed-Extraction</i>	17
2.2.3 <i>Reflektor</i>	19
2.2.4 <i>Trennung von Fragment-Ionen</i>	21
2.2.5 <i>Selektion einzelner Ionen (precursor selection)</i>	22
2.2.6 <i>Datenaufnahme</i>	24
2.3 FRAGMENTIERUNGS-MECHANISMEN	25
2.3.1 <i>Berechnung der Peptidmasse</i>	25
2.3.2 <i>Fragmentierungs-Schema bei Peptiden</i>	26
2.3.3 <i>Isotopenmuster und Bestimmung der Ladung</i>	27
2.3.4 <i>Prompt Decay / In-Source Decay / Post-Source Decay</i>	29
2.3.5 <i>Stoss-induzierter Zerfall (CID)</i>	30
2.3.6 <i>Modell zur Fragmentierung</i>	31
2.3.7 <i>RRKM-Modell</i>	32
2.3.8 <i>Vereinfachtes (exponentielles) Modell</i>	33
2.4 PRÄPARATIONS-VERFAHREN	34
2.4.1 <i>Dried droplet-Methode (mit DHB)</i>	34
2.4.2 <i>Layer-Methode (mit Zimtsäure, Sinapinsäure)</i>	34
2.4.3 <i>Probenaufreinigung / Trennung</i>	34
3 MATERIAL UND METHODEN	36

3.1	VERWENDETE PEPTIDE.....	36
3.2	MALDI-MASSENSPEKTROMETER.....	36
3.3	QSTAR ESI-MASSENSPEKTROMETER	37
3.4	VERWENDETE SOFTWARE	37
3.4.1	PEPSEQ.....	37
3.4.2	ULISSES.....	38
3.4.3	BioMultiview TM	38
3.4.4	MICROCAL ORIGIN TM	38
3.5	NEU ENTWICKELTE SOFTWARE.....	38
3.5.1	ISOCONV.....	39
3.5.2	ISOTOPE.....	40
3.6	ALLGEMEINE ALGORITHMEN.....	42
3.6.1	Identifikation von Peaks.....	42
3.6.2	Vergleich mit experimentellen Spektren.....	43
4	ERGEBNISSE	45
4.1	UNTERSUCHUNG DER EXPERIMENTELLEN EINFLÜSSE AUF DIE DESORPTION UND FRAGMENTIERUNG VON PEPTIDEN	45
4.1.1	Instrumentelle Einflüsse auf MALDI-PSD.....	46
4.1.2	Probenspezifische Einflüsse	49
4.1.3	Bewertung der Einflüsse auf die Fragmentierung	53
4.2	ISOTOPENVERTEILUNG UND FILTERUNG.....	54
4.2.1	Berechnung der Isotopenverteilung	54
4.2.2	Verteilung der Massen von Peptiden	57
4.2.3	Verteilung der Isotopenmuster bei Peptiden gleicher Masse.....	62
4.2.4	Variation der Isotopenmuster mit der Masse.....	65
4.2.5	Klassifizierungsmöglichkeiten der Isotopenmuster (Schwefelanteil)	73
4.3	ENTFALTUNG DES ISOTOPENMUSTERS	85
4.3.1	Entfaltungsalgorithmus für Massenspektren	85
4.3.2	Anwendung auf MALDI-Massenspektren.....	92
4.3.3	Anwendung auf PSD-Fragment-Ionen-Spektren.....	103
4.4	ENTFALTUNG VON ESI-MASSENSPEKTREN	106
4.4.1	Berücksichtigung der Ladung.....	106
4.4.2	Angiotensinogen (1-14) (porcine).....	110

4.4.3	<i>Insulin, Vergleich mit Hypermass</i>	114
4.4.4	<i>Fragment-Ionen-Spektren von Angiotensinogen (1-14)</i>	118
4.4.5	<i>Fragment-Ionen-Spektren von Melittin</i>	120
4.4.6	<i>Mischung aus Peptiden mit C-terminalen Amid- und Hydroxyl-Gruppen</i>	124
4.5	VORLÄUFERIONEN-SPEKTREN BEI MALDI	132
4.5.1	<i>Prinzip</i>	132
4.5.2	<i>Tandem-Modus im Reflektor-TOF-Massenspektrometer</i>	132
4.5.3	<i>Anwendungsmöglichkeiten</i>	133
4.5.4	<i>Kalibrierung</i>	134
4.5.5	<i>Transmissions-Profil</i>	135
4.5.6	<i>Kombination von Einzelspektren zu einem Gesamtspektrum</i>	136
4.5.7	<i>Analyse eines komplexen Peptid-Gemisches</i>	137
4.5.8	<i>Analyse einer Mischung aus synthetischen Peptiden</i>	139
4.5.9	<i>Analyse von Phosphopeptiden</i>	142
4.5.10	<i>Vergleich der unterschiedlichen Verfahren</i>	144
5	ZUSAMMENFASSUNG	146
	DANKSAGUNG	151
	LITERATURVERZEICHNIS	152
	ABBILDUNGEN	152
	ANHANG: LISTE DER PEPTIDE	167

1 Einleitung

Durch das zunehmende Interesse an der Strukturaufklärung von Biopolymeren in der biologischen und biomedizinischen Forschung haben massenspektrometrische Verfahren in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Die Masse eines Biomoleküls, wie zum Beispiel von Proteinen, Peptiden, Oligosacchariden oder Oligonucleotiden, ist ein aus der Struktur leicht zu ermittelnder, charakteristischer Parameter, der sich mit einem Massenspektrometer auch bei geringsten Probenmengen (fmol) noch äußerst präzise (Fehler < 10 ppm) bestimmen läßt.

Die thermisch labilen Biomoleküle lassen sich erst mit den in den 80er Jahren entwickelten „sanften“ Ionisationsverfahren wie *Matrix-Assisted-Laser Desorption/Ionization* (MALDI) und *Elektrospray-Ionisations* (ESI) Massenspektrometrie mit der nötigen Nachweisempfindlichkeit als intakte Moleküle ionisieren und mit ausreichender Präzision nachweisen.

Wegen der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten ist die Umkehrung, bei der aus einer ermittelten Masse die Primärstruktur oder Sequenz, z. B. eines Peptids, bestimmt werden soll, ist nicht mehr derart eindeutig, wie es die Berechnung der Masse eines bekannten Peptids ist. Zur Strukturaufklärung einzelner Moleküle wurden daher Tandem-Verfahren entwickelt, bei denen die Fragmentierung der Moleküle gezielt genutzt (*Post-Source Decay*, PSD) oder induziert (*Collision-Induced Dissociation*, CID) wird.

Zur Identifizierung komplexer Gemische aus Verdauen von Proteinen existieren inzwischen Methoden, die mit Hilfe von Proteindatenbanken nach Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen suchen. Andere Quellen für Informationen über ein Protein sind Datenbanken mit DNA-Sequenzen, die in hypothetische Proteinsequenzen übersetzt werden können. Dieser Schritt ist wesentlich, um die molekularbiologische Bedeutung der, in den DNA-Sequenzen gespeicherten, genetischen Informationen zu erkennen. Die Erzeugung von Massenlisten aus den Produkten eines Protein-Verdau ist erst durch MALDI- und ESI-Massenspektrometrie möglich geworden.

In komplexen Gemischen, wie dem Verdau eines Proteins, liegen jedoch zahlreiche Komponenten vor, die sich bei der massenspektrometrischen Analyse teilweise gegenseitig unterdrücken, so daß nur ein Teil der tatsächlichen Bestandteile nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus gibt es häufig Interferenzen von Molekülen gleicher Masse oder den Isotopenmustern der Moleküle ähnlicher Masse, wodurch die Spektren weiter verkompliziert werden und die Interpretation Fehler aufweisen kann.

Daher wurde in dieser Arbeit den Isotopenmustern von Peptiden große Aufmerksamkeit geschenkt. Es wurde ein analytisches Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe die Isotopenmuster, trotz Masseninterferenzen, aus einem MALDI-Massenspektrum heraus gefiltert werden, so daß bei einer anschließenden Peak-Identifikation die Fehlinterpretationen deutlich reduziert werden. Darüber hinaus stellte sich heraus, daß eine Erweiterung der Methode auf ESI-Massenspektren, bei denen mehrfache Ladungen pro Peptid berücksichtigt werden müssen, wertvolle zusätzliche Informationen liefert.

Die Unterdrückung von Signalen kann allerdings nicht durch eine nachgeschaltete Datenverarbeitung, wie es die Filterung darstellt, vermieden werden, sondern es muss eine Verbesserung der experimentellen „Rohdaten“ erfolgen. Ein Ansatz ist eine Optimierung der Präparation durch Fraktionierung der Bestandteile der Ausgangsprobe und getrennte massenspektrometrische Analyse. Lässt sich die Probe nicht fraktionieren, kann die Empfindlichkeit gesteigert werden, indem die stabilen Peptid-Ionen gezielt selektiert werden. Hierfür wird eine experimentelle Methode beschrieben.

Im einleitenden Kapitel „Grundlagen der Methoden“ wird ein kurzer Überblick über die verschiedenen massenspektrometrischen Verfahren gegeben, wonach schließlich ein MALDI Flugzeit-Massenspektrometer und der Desorptions-Prozess detailliert beschrieben wird. Außerdem wird auf die Fragmentierungs-Mechanismen von Peptiden eingegangen. Das anschließende Kapitel „Material und Methoden“ beschreibt die Massenspektrometer und die verwendete Software. Das Kapitel „Ergebnisse“ gliedert sich in vier Teile. Im ersten Abschnitt (Kapitel 4.1) werden die Einflüsse der experimentellen Bedingungen auf die quantitativen Ergebnisse (Signalintensitäten) untersucht. Der folgende Teil (Kapitel 4.2) behandelt die Grundlagen zur Beschreibung der Isotopenmuster von Peptiden. Unter anderem wird hier eine Methode zur Abschätzung des Schwefelgehaltes vorgestellt. Aus diesen Erkenntnissen wird im nächsten Abschnitt ein Filteralgorithmus vorgestellt (Kapitel 4.3) und auf MALDI- (Kapitel 4.3) und ESI-Massenspektren (Kapitel 4.4) angewendet. Die experimentelle Verbesserung der „Rohdaten“ der Massenspektren wird im letzten Abschnitt (Kapitel 4.5) beschrieben. Hierbei handelt es sich gleichzeitig um ein weiteres Anwendungsbeispiel für den Filteralgorithmus, da die Peptide mit Hilfe der fortgeschrittenen Peak-Identifikation aufgelistet werden.

2 Grundlagen der Methoden

2.1 Allgemeiner Überblick über die Massenspektrometrie

2.1.1 Einleitung

2.1.1.1 Wie ist ein Massenspektrometer aufgebaut?

Bei der Massenspektrometrie (MS) werden Atome und Moleküle im Vakuum anhand ihrer Masse analysiert und identifiziert. Dabei wird das Verhältnis aus Masse und Ladungszahl m/z eines Ions bestimmt. Zur Analyse müssen die Atome und Moleküle in einer Ionenquelle zunächst in die Gasphase überführt und ionisiert werden. Anschließend werden sie durch einen Massenanalysator geführt, durch den mit Hilfe von elektrischen und/oder magnetischen Feldern das Masse/Ladungsverhältnis bestimmt wird. Am Ausgang des Massenanalysators ist m/z schließlich bekannt, und die Häufigkeit der Ionen wird mit einem Detektor aufgezeichnet.

Da im Massenanalysator die Analyse mittels Beschleunigung in elektrischen und magnetischen Feldern erfolgt, aber die Maxwell-Gleichungen, die diese Bewegungen beschreiben, nur das Verhältnis aus Masse und Ladung m/z gemeinsam, aber niemals nur die Masse m oder die Ladung z des Ions allein enthalten, kann durch Bewegungen in diesen Feldern keine Unterscheidung zwischen einem einfach geladenen Ion einer bestimmten Masse und einem zweifach geladenen Ion der doppelten Masse getroffen werden. Diese Unterscheidung kann in der Tat nur durch zusätzliche Informationen, wie dem Auftreten von Isotopenmustern (chemisch gleiche Ionen, die sich aus verschiedenen Isotopen der Atome gleicher Ordnungszahl zusammensetzen) oder Gruppierungen verschiedener Ladungszustände (ein, zwei, mehrfach geladene Ionen der gleichen Masse) eindeutig getroffen werden. Die Häufigkeit von hoch geladenen Ionen hängt allerdings auch vom Ionisierungs-Verfahren in der Ionenquelle ab, so daß häufig $z = 1$ zu setzen ist und das gemessene m/z -Verhältnis direkt der Molekül-Ionen-Masse entspricht.

2.1.2 Ionisations-Methoden

In der Ionenquelle kann die Erzeugung der Ionen auf verschiedene Weise geschehen. Dabei muss in einer Ionenquelle Energie auf das zu analysierende Atom oder Molekül (den Analyten) übertragen werden, so daß dieses zwar in die Gasphase gelangt und ionisiert wird, aber Moleküle nicht vollständig in ihre atomaren Bestandteile zerfallen (fragmentieren). Bei einigen Methoden ist das Auftreten von Fragmentierungen wünschenswert, da dadurch Informationen über die chemische Struktur eines Analyten gewonnen werden können. Sofern die Moleküle nicht fragmentiert werden, läßt sich mit Hilfe der Molekülmasse eine Aussage über den Reinheitsgrad einer Probe treffen. Die endgültige Bestätigung eines Moleküls wird jedoch erst über eine Strukturaufklärung erreicht, da sehr viele verschiedene Molekülstrukturen bei gleicher Masse denkbar sind. Diese können entweder isomer sein, das heißt, sie besitzen die gleiche atomare

Zusammensetzung, oder aber die Massengenauigkeit des Instruments läßt keine exaktere Bestimmung zu.

Aus physikalischer Sicht erfolgt die Ionisation durch Entfernen oder Hinzufügen von Elektronen oder leichten Atomen (meist Protonen). Ein Elektron kann aus den äußeren Orbitalen entfernt oder hinzugefügt (Radikalbildung) werden. Ein anderer Mechanismus besteht in Säure/Base-Reaktionen, bei denen Protonen chemisch an das Molekül gebunden oder von diesem abgespalten werden. Mehrfachladungen werden gebildet, indem weitere Ladungsträger hinzugefügt oder entfernt werden. Durch Protonierung ändert sich die Gesamtmasse des Molekül-Ions, was beim Vergleich verschiedener Ladungszustände beachtet werden muss.

2.1.2.1 Thermische Ionisierung

Die ersten Versuche, die Masse von Atomen und Molekülen zu analysieren, erfolgten mit einer thermischen Ionisierung [1]. Bei diesem Verfahren wird durch Erhitzen der Probe Wärmeenergie auf den Analyten übertragen, wobei dieser in die Gasphase verdampft und ein geringer Anteil ionisiert wird. Die Ionisierung geschieht durch das Freisetzen eines Elektrons. Auf analoge Weise werden z. B. in Braunschens Röhren die Elektronen durch Erhitzen eines Metalldrahts erzeugt.

Bei der thermischen Ionisierung läßt sich jedoch nur ein geringer Teil der in die Gasphase gelangten Atome und Moleküle ionisieren. Darüber hinaus sind Moleküle größtenteils thermisch zu instabil, um auf die gleiche Weise intakte Ionen liefern zu können. Diese Methode ist daher lediglich zur Analyse von Atomen geeignet, erreicht aber auch hier nur eine geringe Nachweisempfindlichkeit, da aufgrund der geringen Ionisierungs-Ausbeute relativ viel Material benötigt wird.

2.1.2.2 Elektronen-Stoss

Effektiver als das thermische Verdampfen, ist es, die zur Ionisierung notwendige Energie durch Stöße mit Primärteilchen gezielter zu übertragen, was mit Elektronen- oder Ionenstrahlen erreicht werden kann. Bei der Elektronenstoss-Massenspektrometrie (*electron impact mass spectrometry* (EI-MS)) wird ein Elektronenstrahl auf die bereits gasförmige Probe gerichtet [1]. Das Gas wird entweder direkt eingelassen, oder durch Verdampfen einer festen oder flüssigen Probe erzeugt. Im zweiten Fall kann EI-MS als eine Art Erweiterung der thermischen Ionisierung verstanden werden. Durch Variation der kinetischen Energie des Elektronenstrahls kann der Ionisierungs-Querschnitt der Analyt-Moleküle angepaßt werden. Die Energien liegen im Bereich von 50-100 eV, typisch sind 70 eV. Die durch einen inelastischen Stoss übertragbare Energie kann somit die Ionisierungs-Schwelle der meisten Atome und Moleküle, welche im Bereich von etwa 10 eV liegt, übersteigen. Dadurch kann ein gebundenes Elektron freigesetzt werden, so daß ein angeregtes Radikal-Molekül-Ion zurückbleibt. Die Rate der Molekül-Ionen, die anschließend zerfallen, ist durch die starke Anregung relativ groß, was auf der einen Seite zur Strukturbestimmung der Moleküle genutzt wird, jedoch auf der anderen Seite die Anwendbarkeit auf Moleküle, die größer sind als einige 100 u, verhindert. Man spricht aufgrund der starken Fragmentierung auch von einer „harten“ Ionisierung.

2.1.2.3 Chemische Ionisierung (CI)

Die Anregung durch Elektronen-Stöße ist für zahlreiche Moleküle entweder zu intensiv, so daß diese zu stark fragmentieren, oder aber der Wirkungsgrad der Ionisation ist nicht befriedigend. Diese Moleküle können in der Ionenquelle durch ein Puffergas indirekt ionisiert werden. Dazu wird das Puffergas (z. B. CH₄, Methan) durch Elektronen-Stöße ionisiert, wobei eine chemische Reaktion zwischen den entstandenen Ionen und dem Analyt-Molekül stattfindet [1][2]. Diese chemische Reaktion führt schließlich zu Analyt-Ionen, welche als Pseudo-Molekül-Ionen bezeichnet werden, da sie das Reaktionsprodukt des Puffergases als Addukt binden.

Chemische Ionisierung wird häufig in Kombination mit EI-MS eingesetzt, da die Quelle für einen gemeinsamen Einsatz beider Methoden nicht modifiziert werden muss. In solchen Kombinationsexperimenten wird die Probe alternativ mit und ohne Puffergas analysiert.

2.1.2.4 Laserdesorption/Ionisation (LDI)

Die Anwendung von Lasern zur Ionisierung wurde bereits früh demonstriert [3]. Hier bietet sich die Kombination von gepulsten Lasern mit der Flugzeit-Analyse (*Time of Flight*; TOF) an. Der Begriff *Laserdesorption/Ionisation* umfasst zwei Prozesse. Unter Desorption versteht man die Sublimation einer festen Probe in die Gasphase. Dabei wird keine Aussage darüber gemacht, ob die Moleküle oder Atome bereits geladen sind, oder ob sie direkt durch den Laser ionisiert werden. Die Ionisation dagegen bezeichnet nur den Prozess der Ladungsträger-Trennung, welche entweder bereits in der festen Phase, oder in der Gasphase stattfinden kann. Neben der LDI, bei der eine feste Probe analysiert wird, existiert weiter die Laser-Ionisations-Massenspektrometrie, bei welcher bereits gasförmige Proben massenspektrometrisch analysiert werden.

Um bei LDI ein Molekül oder Atom ionisieren zu können, muss das Licht des Lasers von der Probe absorbiert werden. Ist die Energie des Photons größer als die Bindungsenergie eines Elektrons des Atoms/Moleküls, kann ein Elektron direkt freigesetzt werden und überschüssige Energie wird von der Probe aufgenommen. Reicht die Photonen-Energie nicht aus, kann die Energie ebenfalls in Form von Wärme von der Probe absorbiert werden. Durch die schnelle Erwärmung während des Laserpulses, können sich Moleküle und Molekül-Ionen explosionsartig von der Probenoberfläche lösen. Erst durch diesen kollektiven Prozess aus Ionisation und Desorption gelangen ionisierte Moleküle in die Gasphase.

Einige Verfahren der Laserionisation nutzen die mehrfache Absorption, um die Selektivität erhöhen zu können. Die sogenannte *Resonante Multi-Photonen-Ionisation* (REMPI) wird zur Spurengas-Analytik eingesetzt. Dabei wird mit einem ersten Laser zunächst der S₁-Zustand von Analyt-Molekülen besetzt, so daß diese schließlich durch einen zweiten Laser gezielt ionisiert werden können [4].

2.1.2.5 Fast-Atom-Bombardment (FAB) Massenspektrometrie

Zur Vermeidung der Fragmentierung ist es bei der Analytik von Biomolekülen notwendig, die Moleküle möglichst sanft in die Gasphase zu übertragen und zu ionisieren, was bedeutet, daß nicht wesentlich mehr Energie auf das Molekül übertragen werden sollte, als

zur Ionisierung notwendig ist. Bei den bislang hier beschriebenen Verfahren ist diese „Sanftheit“ nur bedingt gegeben oder die Anwendung auf Biomoleküle ist eher unpraktisch. Es hat sich hierfür als sinnvoll erwiesen, die zu analysierenden Moleküle in eine Matrix einzubetten, so daß die Primärenergie zunächst von dieser Matrix aufgenommen werden kann und erst in einem zweiten Schritt zur Desorption und Ionisierung des Analyten führt.

Bei der *Fast Atom Bombardment-Massenspektrometrie* (FAB-MS) [5][6], befindet sich die Probe gelöst in einem Tropfen flüssiger Matrix, z. B. in Glycerin. Hier liegen die Moleküle in gelöster Form bereits in ionisiertem Zustand vor und müssen dann in die Gasphase gebracht werden. Dies geschieht mittels eines Atomstrahls, der eine kinetische Energie von einigen keV besitzt und in der Regel aus Xenon-Atomen besteht. Häufig werden auch Argon-Atome zum Beschuss eingesetzt. Durch den „Beschuss“ mit den schnellen Atomen wird ein winziges Tröpfchen Glycerin herausgeschlagen und im Vakuum verdampft. Die in diesem Tröpfchen enthaltenen Analyt-Ionen bleiben somit im gasförmigen Zustand oberhalb der Probe zurück und können analysiert werden. Ein beträchtlicher Anteil der Moleküle bleibt neutral, was jedoch durch die Zugabe von Säuren bei der Präparation beeinflusst werden kann [6]. Bei dem FAB-Prozess existieren bereits vorgeformte Ionen (*preformed ions*) in der Probe.

Bei dem verwandten Verfahren der *Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie* (SIMS) [7], wird keine Matrix verwendet und der Beschuss wird statt mit neutralen Atomen, durch Primär-Ionen mit Energien von einigen keV durchgeführt. Dabei werden in der Regel Cäsium-Ionen (Cs^+) verwendet [8].

2.1.2.6 Plasma-Desorptions Massenspektrometrie (PDMS)

Bei der von Macfarlane im Jahre 1976 entwickelten *Plasma-Desorptions Massenspektrometrie* (PDMS) [9][10] wird der radioaktive Kernzerfall des Isotops ^{252}Cf (Californium) genutzt, der zwei Spaltfragmente mit Energien von etwa 100 MeV erzeugt. Eines der beiden symmetrisch auseinanderfliegenden Spaltfragmente löst auf einem Detektor einen Startpuls aus; während das zweite auf die Probe trifft und in seinem Durchschussskanal ein Elektronenplasma erzeugt, welches sich radial nach aussen ausbreitet und die Moleküle in der Nähe der Probenoberfläche ionisiert, so daß diese in die Gasphase gelangen. Dieser Prozess ist selbst ohne Matrix schon für Moleküle bis etwa 1000 u geeignet, jedoch kann die Effektivität durch den Einsatz einer Matrix aus Nitrocellulose noch gesteigert werden. Diese Verbesserung ist durch die schwammartige Struktur der Nitrocellulose möglich, da hierdurch die Analyt-Moleküle stärker vereinzelt werden und sich bei der Ionisierung weniger beeinflussen.

Neben der Nutzung des Kernzerfalls eines Californium-Isotops, führt auch der Beschuss mit schnellen atomaren Ionen oder Cluster-Ionen (Kohlenstoff-Cluster), die in Beschleunigern mit Energien von einigen MeV erzeugt werden können, zu einer ähnlich sanften Ionisierung.

FAB-MS und SIMS auf der einen Seite, und PDMS sowie der Beschuss mit MeV-Primär-Ionen auf der anderen Seite ähneln sich methodisch auf den ersten Blick zwar sehr stark, allerdings findet die Energieübertragung auf verschiedene Weise statt. Während bei

Primärteilchen Energien im keV-Bereich die Energie in das Elektronensystem der Moleküle aufgenommen wird, finden im MeV-Bereich Stöße mit Atomkernen statt [11].

2.1.2.7 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Eine Ionisierungs-Methode, die sich vom Aufbau her grundsätzlich von den anderen hier beschriebenen Methoden unterscheidet ist die Elektrospray-Ionisation (ESI). Bei dieser Methode befindet sich die Probe in gelöster Form und wird durch eine Glaskapillare gesprüht, deren Innendurchmesser typischerweise zwischen 10 μm und 100 μm liegt [12][13]. Die Kapillar-Spitze ist von einer Metall-Kapillare ummantelt, die auf einem elektrischen Potential von etwa 1 kV bis 6 kV gegenüber einer Blende liegt, die eine Öffnung in den Vakuumbereich des Massenspektrometers besitzt. Durch das elektrische Feld zwischen Kapillar-Spitze und Blende entsteht in den gesprühten feinen Tröpfchen eine Ladungstrennung, so daß durch das Verdampfen des Lösungsmittels hoch geladene Tröpfchen entstehen, die schließlich durch die Ladungs-Abstossung explosionsartig (*Coulomb-Explosion*) in einzelne Ionen zerfallen. Die Ionen gelangen durch die Öffnung in der Blende in das Massenspektrometer und werden dort analysiert.

Die Ionen sind hoch geladen, und liegen als protonierte Molekül-Ionen in der Form $(M+nH)^{n+}$ vor, so daß grosse Biomoleküle, wie Proteine und Oligonucleotide, als stabile Molekül-Ionen bei einem Masse/Ladungs-Verhältnis im Bereich bis etwa $m/z = 1000$ u nachgewiesen werden können.

Im Gegensatz zu den anderen Methoden, die hier beschrieben wurden, findet die Ionisierung bei der ESI nicht im Vakuum, sondern unter Atmosphärendruck (*Atmospheric Pressure Ionization*) statt. Hinter der Blenden-Öffnung befindet sich nicht direkt ein Hochvakuum, sondern es folgen mehrere differentiell gepumpte Stufen.

Die Auswahl des Lösungsmittels (häufig eine Mischung aus Methanol und Wasser) bestimmt die Grösse der entstehenden Tropfen. Durch einen Gasstrom in Sprühhichtung wird das Lösungsmittel beim Sprühen zusätzlich getrocknet, wodurch ebenfalls die Tröpfchen-Grösse beeinflusst werden kann.

Der Vorteil der direkten Injektion aus dem Lösungsmittel besteht in der Möglichkeit ESI-MS unmittelbar an HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) [14] oder CE (*Capillary Electrophoresis*) zu koppeln (Online-Kopplung), wodurch das Massenspektrometer als hochempfindlicher Detektor für die chromatografische oder elektrophoretische Trennung verwendet werden kann.

2.1.2.8 Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation (MALDI)

Gegen Ende der 80er Jahre wurde die Idee der Matrix-Unterstützung auch auf die Laserdesorption angewendet. Bei der von Hillenkamp und Karas als Matrix-Assisted Laserdesorption Ionisation (MALDI) bezeichneten Methode, wird der Analyt in einer Matrix, die aus einer organischen Säure besteht, eingebettet [15]. Ursprünglich wurden bei MALDI hauptsächlich UV-Laser (UV-MALDI) eingesetzt. Nachdem in der Anfangsphase verschiedene Anregungswellenlängen von 266 nm, 337 nm und 354 nm eingesetzt wurden [16], haben sich Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm und Pulslängen von 3-10 ns durchsetzen können und finden insbesondere in kommerziellen Geräten breite

Verwendung. Inzwischen sind aber auch Anwendungen mit Infrarot-Lasern (IR-MALDI) üblich [17][18].

Die Matrix liegt üblicherweise in einem molaren Überschuss von etwa 1000:1 vor und muss mehrere Eigenschaften erfüllen:

1. Die Matrix muss das Laserlicht absorbieren, wodurch sich für verschiedene Laserwellenlängen unterschiedliche Matrizes eignen. Insbesondere werden für IR-MALDI andere Matrizes eingesetzt als für UV-MALDI.
2. Die Matrix muss die Analyten einbetten können, indem sich eine Mischkristall aus Matrix und Analyt bildet.
3. Die Matrix muss Ladungsträger liefern können, um den Analyten zu ionisieren.

Auf den Desorptions-Ionisations-Prozess bei MALDI-MS wird in Kapitel 2.2.1 detaillierter eingegangen.

Die Moleküle werden in der Regel als protonierte, einfach geladene Molekül-Ionen nachgewiesen, so daß das Masse/Ladungs-Verhältnis zum Teil sehr grosse Werte (bis 10^6) annehmen kann. Bei Proteinen treten neben den einfach geladenen Molekül-Ionen teilweise höher geladene Ionen auf.

Auch bei MALDI existieren Anwendungsbeispiele für die Kopplung mit chromatografischen Trennverfahren [19], wobei hier in der Regel nicht direkt gekoppelt wird, sondern die Proben zunächst auf einem Target gesammelt werden (*offline Kopplung*).

2.1.3 Massenanalysatoren

Nach der Ionisation in der Ionenquelle erfolgt die Massenanalyse der Ionen. Die gebräuchlichsten Massenanalysatoren werden im Folgenden kurz beschrieben.

2.1.3.1 Sektorfeld-Analysator

Sektorfeld-Analysatoren gehören zu den ältesten Massenanalysatoren. Sie beruhen auf dem Prinzip, daß ein statisches elektrisches und magnetisches Feld orthogonal zur Flugrichtung eines geladenen Teilchens eine Kraft auf das Teilchen bewirken und die Flugrichtung ablenken. Der Umlenkwinkel ist abhängig vom Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) des Teilchens und der Feldstärke, so daß abhängig vom Detektions-Ort hinter dem Umlenkefeld Ionen verschiedener m/z -Verhältnisse nachgewiesen werden können. Wird ein Detektor an einer festen Position plaziert, kann durch Verändern der Feldstärke der nachzuweisende m/z -Wert eingestellt werden. Bei konstantem Feld kann mit einer Fotoplatte das Massenspektrum orts aufgelöst dargestellt werden.

Grundsätzlich gibt es zwei Typen von Sektorfeld-Geräten, je nachdem, ob ein elektrisches oder magnetisches Feld zur Ablenkung verwendet wird. Die Auflösung wird in beiden Fällen durch die Verbreiterung des Ionenstrahls begrenzt. Um die Auflösung zu erhöhen, oder auch um Strukturaufklärung durchzuführen, werden ein magnetisches und ein elektrisches Sektorfeld zu einem sogenannten doppelt-fokussierenden Massenspektrometer miteinander kombiniert [1]. Bei der Mattauch-Herzog Geometrie werden die Ionen auf eine Fotoplatte fokussiert. Bei einer Nier-Johnson Geometrie werden die Energieverteilung und die Masse durch ein elektrisches und ein magnetisches Feld auf den Detektor

fokussiert, wobei das elektrische Feld im normalen Modus die kinetische Energie selektiert und konstant gehalten wird. Das Spektrum wird aufgenommen, indem die magnetischen Feldstärken gescannt werden. Die Ionisierung sollte hier kontinuierlich erfolgen und über die Meßdauer konstant sein.

Das Auflösungsvermögen eines Massenspektrometers kann durch das Verhältnis aus Masse (bzw. m/z -Verhältnis) und Breite eines Peaks, $M/\Delta M$ bestimmt werden, wobei die Peak-Breite bei verschiedenen Analysatoren unterschiedlich definiert wird.

Bei einem Sektorfeld-Analysator wird das Auflösungsvermögen durch die Baugröße und die verwendbaren Feldstärken begrenzt, wodurch jedoch auch der erreichbare Massenbereich eingeschränkt wird (auf etwa $m/z = 3000$ u), da der Ablenkwinkel für schwere Ionen nicht mehr ausreicht, um diese auf den Detektor zu lenken. Bei einem einfach fokussierenden Gerät sind maximal $M/\Delta M = 1000$ erreichbar, während ein doppelt-fokussierendes Gerät ein Auflösungsvermögen bis $M/\Delta M = 100000$ besitzen kann.

2.1.3.2 Quadrupol-Massenfilter

Ein Quadrupol-Massenfilter besteht aus einer Anordnung von vier Stäben, die sich parallel zur Flugrichtung der Ionen befinden [20]. Die Stäbe liegen auf einer Basisspannung, die von einer Wechselspannung überlagert wird, wobei gegenüberliegende Stäbe mit der jeweils gleichen Phase und die anderen zwei Stäbe mit der dazu entgegengesetzten Phase betrieben werden. Bei definierten Werten der Amplitude und der Frequenz der überlagerten Wechselspannung treten nur Ionen aus einem engen m/z -Bereich geradlinig aus dem Quadrupol-Massenfilter hinaus und können nachgewiesen werden. Ionen mit anderen Massen werden so stark abgelenkt, daß sie nicht mehr den Detektor erreichen.

Auch bei Quadrupol-Massenfiltern wird ein Massenspektrum aufgenommen, indem die Parameter des Filters (Frequenz, Amplitude) variiert werden, so daß die m/z -Werte gescannt werden. Die Ionisierung sollte kontinuierlich erfolgen.

Der Massenbereich ist ebenfalls durch die einsetzbaren Frequenzen und Amplituden auf etwa 3000 u beschränkt. Die Auflösung wird durch die Breite des Filters meist auf 1 u begrenzt, was als Einheitsauflösung bezeichnet wird (Ionen mit Abstand 1 u werden getrennt). Eine Verbesserung der Auflösung führt zu einem Verlust an Nachweisempfindlichkeit.

2.1.3.3 FT-ICR-Ionenfalle

Bei einer *Fourier-Transformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz* (FT-ICR) Ionenfalle werden Ionen aus einer Ionenquelle zunächst gesammelt und durch ein starkes Magnetfeld (bis zu 9 Tesla) auf eine Kreisbahn geleitet. Die Kreisfrequenz des Ions ist durch die Zyklotron-Frequenz aus m/z -Verhältnis des Ions und Stärke des Magnetfeldes gegeben und wird induktiv gemessen [20].

Das resultierende Zeitspektrum, das sich aus der Überlagerung der Zyklotron-Frequenzen aller in der Falle enthaltenen Ionen ergibt, wird durch Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum und durch Kalibrierung in ein Massenspektrum umgewandelt.

Bei FT-ICR-MS ist es notwendig, die Ionen gepulst in die Falle einzubringen, da nach dem Einfangen der Ionen eine Messung über eine längere Zeit andauert. Je länger die Mess-

Dauer ist, um so mehr Perioden der Ionen werden aufgezeichnet, so daß die Frequenz-Bestimmung und damit die Massenbestimmung exakter ausfallen. Die Auflösung bei FT-ICR-MS liegt mit bis zu 10^6 deutlich über der erreichbaren Auflösung der anderen Analysatoren.

2.1.3.4 Flugzeit-Analysatoren

Bei der Flugzeit-Analyse (*Time of Flight*; TOF) wird ausgenutzt, daß Ionen unterschiedlicher Masse durch die Beschleunigung in einem elektrischen Feld, abhängig von der Masse, gleiche kinetische Energien und damit unterschiedliche Geschwindigkeiten erlangen. Im einfachsten Fall setzt sich ein Flugzeit-Analysator aus einer Probe, die auf dem Beschleunigungspotential liegt, einer Elektrode (oder auch einem Gitter), die sich auf Nullpotential befindet, und bis zu der die Beschleunigung stattfindet, sowie einem Detektor, der sich in einigem Abstand zur Elektrode am Ende einer feldfreien Driftstrecke befindet, zusammen (Bild 2-1).

Auch bei der Flugzeit-Analyse ist eine gepulste Ionen-Erzeugung notwendig, da die Flugzeit-Messung einen definierten Startzeitpunkt benötigt. Dafür bieten sich vor allem Laserdesorptions-Ionisation oder Plasmadesorption an, da die definierten Ionen-Pulse hierbei bereits durch das Ionisations-Prinzip entstehen. Bei der Kopplung mit anderen Ionenquellen ist man auf die Verwendung von gepulsten elektrischen Feldern angewiesen, durch welche die Ionen orthogonal zum Ionen-Strom in den Flugzeit-Analysator transportiert werden (orthogonales TOF) [21].

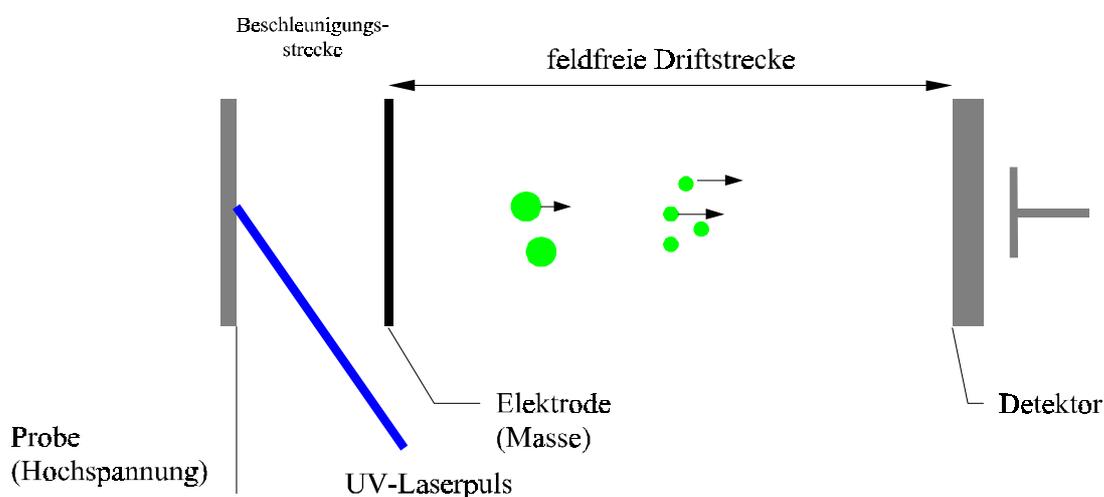


Bild 2-1: Schematischer Aufbau eines Flugzeit-Massenspektrometers. In diesem Beispiel dient ein Laserpuls zur Ionisierung und zum Start der Zeitmessung.

Die ersten von Wiley und McLaren entwickelten Flugzeit-Massenspektrometer [22] bestanden ebenfalls aus einer gepulsten Anordnung, durch die ein kontinuierlicher Ionen-Strom in gepulste Pakete zerlegt und auf den Detektor fokussiert wird. Eine ähnliche gepulste Anordnung dient in modernen MALDI Flugzeit-Massenspektrometern zur weiteren Verbesserung der Auflösung (*Delayed Extraction*, siehe Kapitel 2.2.2).

Prinzipiell ist bei der Flugzeit-Analyse der erreichbare Massenbereich nicht nach oben eingeschränkt. Jedoch wird bei zu schweren Ionen der Nachweis durch die üblichen Detektoren problematisch. Aufgrund der Zeitmessung hängt die Auflösung in hohem Maße

von den Bedingungen in der Ionenquelle ab, da die erzeugten Ionen verschiedene Anfangsgeschwindigkeiten besitzen. Aus diesem Grund müssen fokussierende Elemente die Geschwindigkeitsverteilung und die Zeitverteilung der Ionisierung kompensieren (Reflektor, Ionen-Linsen; siehe Kapitel 2.2.2 und 2.2.3).

2.1.4 Strukturaufklärung mit MS-MS

Wie bereits oben erwähnt, führt die reine Bestimmung der Masse eines Molekül-Ions nicht unmittelbar zur eindeutigen Bestimmung einer Substanz. Erst die Analyse der Fragmente, die aus einem Molekül-Ion entstehen, kann zur vollständigen Strukturaufklärung beitragen. Die Methoden mit harter Ionisierung, wie EI- oder CI-MS, führen häufig zu einer sehr weitreichenden Fragmentierung. Der Nachteil hierbei ist, daß Mischungen oder Verunreinigungen der Probe nicht von den Fragmenten einer nicht verunreinigten Substanz unterschieden werden können.

Zwar führen die weicheren Ionisations-Methoden (FAB-, MALDI-, ESI-MS) überwiegend zu stabilen Molekül-Ionen, so daß Mischungen und Verunreinigungen erkannt werden, dafür kann jedoch keine Strukturinformation durch Fragmente gewonnen werden.

Um bei diesen Methoden Strukturinformation über ein detektiertes stabiles Molekül-Ion gewinnen zu können, muss auf die erste Massenanalyse eine Anregung erfolgen, die zur gezielten Fragmentierung führt. Daraufhin erfolgt schließlich eine zweite Massenanalyse. Der erste Massenanalysator dient hier als Filter, um die ungewünschten Ionen zu unterdrücken. Eine solche Kombination aus Analysator/Fragmentierung/Analysator wird als Tandem-Massenspektrometrie oder MSMS-Analyse bezeichnet [23].

Die bei einem Tandem-Massenspektrometer am häufigsten verwendeten Kombinationen sind entweder Triple-Quadrupol-Geräte [20], oder kombinierte Sektorfeld-Geräte. Die Analyse von Fragment-Ionen über einen Reflektor hat sich bei MALDI-MS in der sogenannten Post-Source-Decay (PSD) Analyse etabliert und wird in Kapitel 2.2.3 detailliert beschrieben [24].

Betrachten wir den Aufbau eines Triple-Quadrupol-Gerätes, so befinden sich drei Quadrupol-Massenfilter hintereinander in Reihe. Im ersten Filter erfolgt die Trennung der stabilen Ionen in einer gewöhnlichen Analyse. Die anderen zwei Quadrupol-Massenfilter werden hierfür nicht benötigt. Zur Fragment-Ionen-Analyse wird der erste Quadrupol-Massenfilter fest auf die Masse des zu untersuchenden Molekül-Ions eingestellt. In dem zweiten Quadrupol-Massenfilter, der nicht den Massenbereich scannt, sondern zur Fokussierung dient, wird ein Stoss-Gas eingelassen. Die durch den ersten Quadrupol-Filter gelangten Ionen werden durch Stöße mit dem Stoss-Gas - für das meist Stickstoff verwendet wird - angeregt und fragmentieren. Dabei wird die Stoss-Energie durch die Geschwindigkeit der Ionen bestimmt. Diese Art der Fragmentierung wird als stossinduzierte Dissoziation (*Collision-Induced Dissociation CID*) [25] bezeichnet. Die Stoss-Energien liegen hierbei unter 100 eV, weshalb auch von *low-energy CID* gesprochen wird. Liegen die Energien durch die kinetische Energie der Ionen darüber, spricht man von *high-energy CID* (siehe Kapitel 2.3.5) [25][26]. Im dritten Quadrupol-Massenfilter wird der Massenbereich der Fragment-Ionen-Massen gescannt.

Die MSMS-Analyse mit Sektorfeld-Geräten verläuft in ähnlicher Weise, jedoch werden hierbei statt der Quadrupol-Massenfilter an erster und dritter Position jeweils magnetische und/oder elektrische Sektorfeld-Analysatoren eingesetzt.

Es existieren auch Kombinationen aus Quadrupol-Massenfiltern und Flugzeit-Analysatoren („Q-TOF“ der Firma Micromass, „Qstar“ der Firma Applied-Biosystems) [27]. Bei diesen Geräten wird der dritte Quadrupol-Massenfilter eines Triple-Quadrupol-Gerätes durch einen orthogonal angeordneten Flugzeit-Analysator ersetzt, in den die Ionen gepulst eingelassen werden. Diese Kombination hat gegenüber einem Triple-Quadrupol-Gerät den Vorteil einer schnelleren Datenaufnahme und höheren Empfindlichkeit, da mit einem Puls im Massenanalysator der gesamte Massenbereich aufgenommen werden kann, während bei einem Massenfilter der Großteil der Ionen herausgefiltert wird. Darüber hinaus liefern Flugzeit-Analysatoren eine höhere Auflösung und Massengenauigkeit als ein Quadrupol-Massenfilter.

2.2 MALDI und Post-Source-Decay

2.2.1 Der Desorptions-Ionisations-Prozess

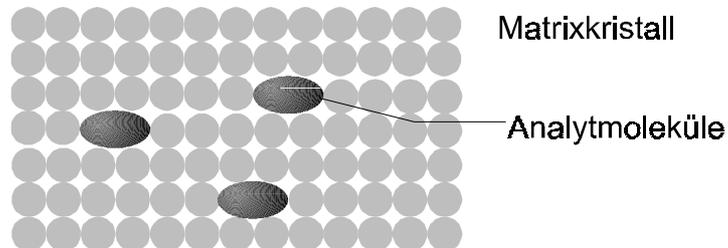
Bei der *Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation* (MALDI) Massenspektrometrie liegt die Probe als Mischung aus einer Matrix und dem Analyten vor, wobei die Matrix im molaren Überschuss von etwa 1000:1 vorliegt [15]. Eine grundlegende Vorstellung des Prozesses besteht in einem Mischkristall aus Analyt-Molekülen und Matrix-Molekülen (Bild 2-2(a)). Die Energie der Photonen des Laserpulses wird bevorzugt von den Matrix-Molekülen absorbiert und nicht von den Analyt-Molekülen. Die im Kristall aufgenommene Energie kann durch Energieübertragung zu einer Desorption sowohl der Analyt- als auch der Matrix-Moleküle führen [28] (Bild 2-2(b)).

Wie die Energie übertragen wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Möglichkeit von Multiphoton-Absorption zur direkten Bildung eines Radikal-Ions kann wegen der dafür zu geringen Energiedichte des Lasers und wegen des bevorzugten Auftretens von protonierten Molekül-Ionen, ausgeschlossen werden [16] [29][30]. Wahrscheinlicher ist ein Prozess des *energy pooling*, bei dem durch mehrere angeregte Matrix-Moleküle die zur Ionisierung notwendige Energie übertragen wird [29][31]. Dieses Pooling kann auch zur Bildung und Desorption von geladenen Clustern führen, die in der Gasphase dissoziieren [29][28]. Es wird alternativ diskutiert, daß die Ladung erst durch Ladungsübertragung von der Matrix auf die Analyt-Moleküle, entweder innerhalb eines Clusters [32] oder durch Stöße der desorbierten und vereinzelt neutralen Moleküle mit geladenen Matrix-Ionen in der Gasphase stattfindet [33][34][35].

Eine andere Vorstellung von der Ionisation ist das Modell in der Probe vorgeformter Ionen (*preformed ions*) [36][37], bei dem bereits im Kristall Analyt-Ionen vorliegen. Die Matrix/Analyt-Cluster werden durch den Laserpuls kollektiv in die Gasphase mitgerissen, wo sie schließlich in Einzel-Ionen zerfallen. Für dieses Modell spricht die Tatsache, daß eine Veränderung des pH-Wertes der Probenlösungen mit Zitronensäure oder Trifluor-Essigsäure (TFA) zu einer vermehrten Bildung von protonierten Analyt-Ionen, im Vergleich zu Salz-Addukten, führt [37]. In einer Lösung liegen Ionen, abhängig vom pH-

Wert, mit unterschiedlicher Nettoladung vor. Durch die als Matrix verwendeten organischen Säuren, wird die Gesamtmischung angesäuert, so daß Analyt-Moleküle in ionischer Form auskristallisieren.

(a) vor dem Laserpuls



(b) nach dem Laserpuls

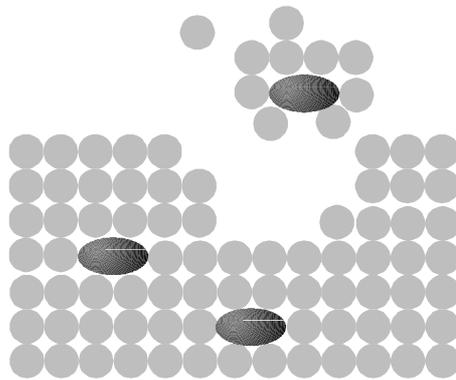
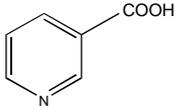
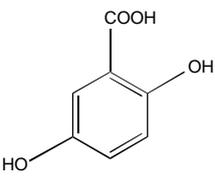
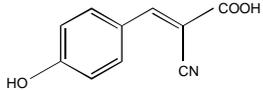
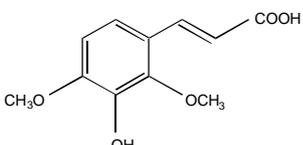


Bild 2-2: (a) Einbau der Analyt-Moleküle in den Matrix-Kristall. (b) Desorption eines Clusters aus Matrix- und Analyt-Molekülen durch den Laserpuls

Abhängig von der verwendeten Laserwellenlänge bieten sich unterschiedliche Matrizes an, da diese das Licht bei verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich stark absorbieren. Die typischen Laserwellenlängen sind 266 nm (Nd:YAG Frequenz-vervierfacht), 337 nm (Stickstofflaser) und 355 nm (Nd:YAG Frequenz-verdreifacht). In Tabelle 2-1 sind die häufig bei UV-MALDI verwendeten Matrizes aufgeführt.

Für verschiedene Matrizes gibt es unterschiedliche Einsatzgebiete. So wird die 3,5-Dimethoxy-4-hydroxizimtsäure bevorzugt für die Analyse von Proteinen eingesetzt, während die 4HCCA besser für Peptide geeignet ist [16]. Wegen ihrer verschiedenen Wasserlöslichkeiten müssen die Matrizes zum Teil unterschiedlich präpariert werden. Die gängigsten Präparations-Verfahren sind die *dried-droplet* und die Layer-Methode, von denen es verschiedene Varianten gibt [38][15], deren unterschiedliches Kristallisationsverhalten in [39] dargestellt wird. Die Präparations-Verfahren werden in Kapitel 2.4 näher beschrieben.

Tabelle 2-1: Übersicht über die am häufigsten verwendeten Matrizes bei UV-MALDI-MS (Tabelle aus [16])

Matrix / Präparations-Methode		Wellenlänge	Bevorzugt verwendet für
Nicotinsäure		266nm	Proteine, Peptide
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), dried droplet		266nm, 337nm, 355nm	Proteine, Peptide
α -Cyano-4-hydroxycinnamsäure (4HCCA), layer Technik		337nm, 355nm	Peptide
3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamsäure		266nm, 337nm, 355nm	Proteine

2.2.2 Ionen-Fokussierung und Delayed-Extraction

Die desorbierten Moleküle und Ionen driften nach dem Laserpuls nicht in nur eine Richtung, sondern es tritt eine breite Richtungsverteilung der Teilchen auf. Zusätzlich ist eine breitere Geschwindigkeitsverteilung zu erwarten, so daß eine Molekülwolke (*plume*) entsteht, die vom Desorptions-Ort auf der Probe wegdriftet. Weitere Effekte, welche die Ausdehnung der Molekülwolke vergrößern, sind der ausgedehnte Desorptions-Ort und die Zeitdauer des Laserpulses von bis zu 10 ns. Der Durchmesser des Laserpulses auf der Probenoberfläche beträgt typischerweise etwa 100 μm [40], kann aber auch auf bis 1 μm reduziert werden, was jedoch auf Kosten der Ionen-Ausbeute geht [41].

Die Richtungsverteilung von Matrix-Ionen und Analyt-Ionen wurde in [33][34] für DHB als Matrix und das Peptid Substanz P (RPKPQQFFGLM-NH₂) als Analyt bestimmt. Es wurde eine weitgehend homogene Richtungsverteilung beobachtet, wobei sich die Geschwindigkeiten im Bereich von etwa 500 – 1500 m/s für die Analyt-Ionen und 1200 – 2500 m/s für die DHB-Ionen bewegen. Die initialen Geschwindigkeiten der Matrix und der Analyt-Ionen wurden von Beavis und Chait [42], Glückmann [43], Juhasz [44] und Ens [45] im Vergleich zu Laserdesorption der Analyt-Ionen (ohne Matrix) bestimmt. Es fällt auf, daß die initialen Geschwindigkeiten der Analyt-Ionen bei MALDI eine Geschwindigkeit von 200 – 600 m/s (von der Probenoberfläche weg) erreichen. Dies spricht für einen Jet, dessen Teilchen sich mit einer hohen Anfangsenergie ausbreiten und nicht thermisch angeregt wurden.

Für Substanz P-Ionen ((M+H)⁺ = 1347,74 u), die mit 20 kV in der Quelle beschleunigt werden und eine initiale Geschwindigkeit von 500 m/s besitzen, ergibt sich bei einer Driftstrecke von 2 m eine Flugzeit von 36,711 μs und eine Verbreiterung auf einen Durchmesser von maximal 36,7 mm (wenn die Ionen im ungünstigsten Fall radial zur Probenoberfläche driften). Die zeitliche Variation zwischen einem axial von der

Probenoberfläche driftendem Ion und einem radial driftenden Ion beträgt bis zu 333 ns, während ein um 1 u schwereres Isotop mit der gleichen Startrichtung nur um 14 ns verzögert den Detektor erreicht. Dieses Beispiel soll zeigen, wie stark sich die Startbedingungen auf die Massenanalyse auswirken.

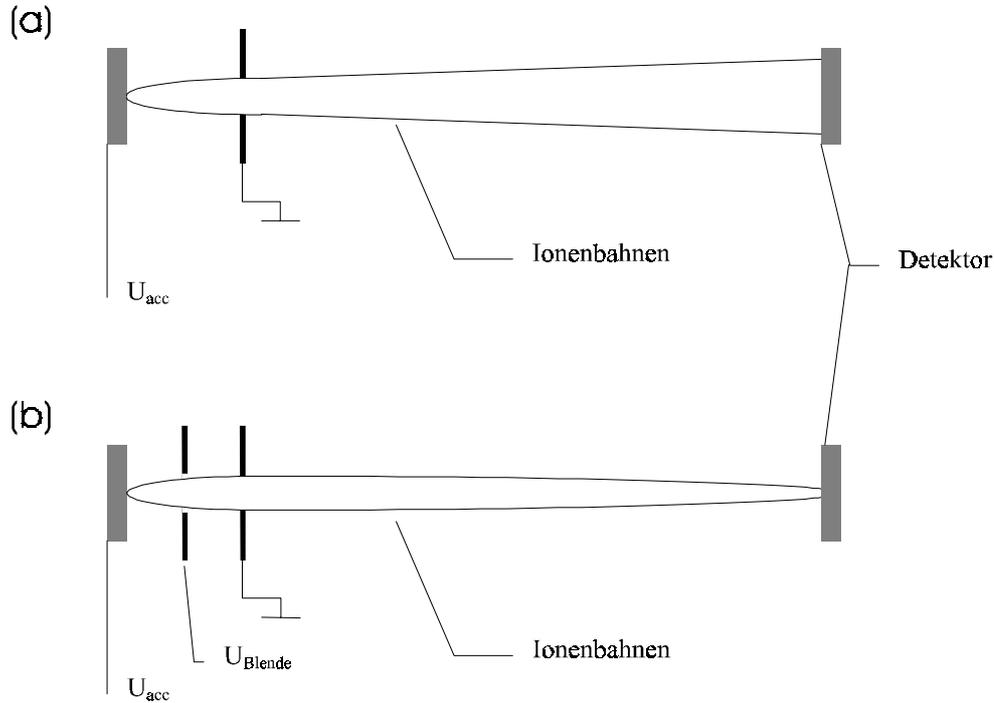


Bild 2-3: Funktionsweise einer Ionenlinse. (a) Flugzeit-Massenspektrometer ohne und (b) mit Ionenfokussierung in der Quelle

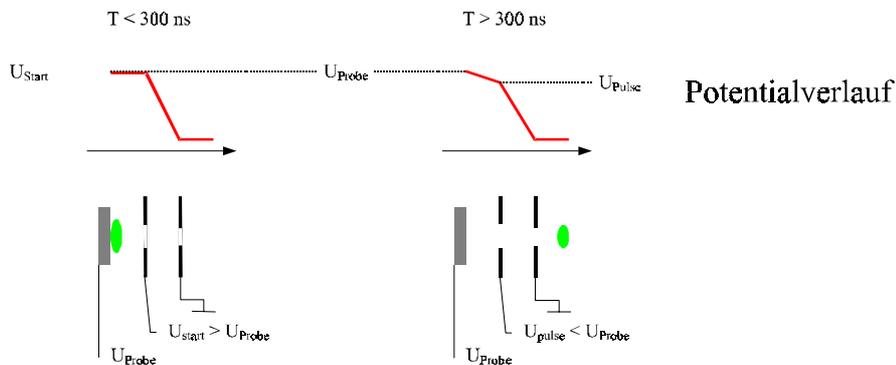


Bild 2-4: Funktionsweise der verzögerten Ionen-Extraktion

Bei der massenspektrometrischen Analyse liegt im einfachsten Fall ein permanentes beschleunigendes elektrisches Feld zwischen Probe und Elektrode vor (*prompt extraction*), so daß entstehende Ionen sofort beschleunigt werden. Ist das elektrische Feld homogen, so daß die Kraft nur senkrecht zur Probenoberfläche wirkt, können Verbreiterungseffekte, durch eine radiale Geschwindigkeitskomponente nicht kompensiert werden. Dadurch bekommen die Ionen eine breite räumliche Ausbreitung, welche sich auf der Driftstrecke weiter vergrößert. Es ist aber das Ziel, ein möglichst intensives und zeitlich eingeschränktes Signal von Ionen des selben Typs (m/z -Verhältnis) am Detektor zu erzeugen, da auf diese Weise die Nachweisempfindlichkeit für die Ionen optimal wird.

Darüber hinaus kann nur durch eine zeitliche Fokussierung eine hohe Massengenauigkeit erreicht werden.

Daher muß zum einen die räumliche und zum anderen die zeitliche Verteilung korrigiert werden. Die räumliche Verbreiterung wird im wesentlichen durch die initiale Richtungsverteilung der Ionen und den ausgedehnten Desorptions-Ort bestimmt. Die Dauer der Laserbestrahlung, die Geschwindigkeitsverteilung der Ionen und der Entstehungszeitpunkt der Ionen erzeugen eine zeitliche Verbreiterung des Signals am Detektor.

Zur Kompensation der räumlichen Verteilung kann die Beschleunigungsspannung erhöht werden, so daß der Anteil der radialen Anfangsgeschwindigkeit relativ zur axialen Geschwindigkeit (in Richtung Detektor) kleiner wird, und der Ionenstrahl dadurch eine kleinere Fläche am Detektor trifft. Beschleunigungsspannungen höher als 20 – 30 kV sind jedoch nicht üblich. Besser als ein homogenes elektrisches Feld in der Ionenquelle zu erzeugen, ist es eine zusätzliche radial wirkende Komponente der Feldstärke zu verwenden, mit deren Hilfe die radiale Geschwindigkeit der Ionen derart kompensiert wird, daß der Ionenstrahl den Detektor fokussiert trifft. Die Wirkungsweise einer solchen „Ionenlinse“ ist in Bild 2-3 dargestellt [46]. Durch eine Ionenlinse kann jedoch nur die räumliche Verteilung des Ionenstrahls korrigiert werden. Die Korrektur der zeitlichen Verbreiterung bedarf anderer Maßnahmen. Hierfür werden ein Reflektor [47][48](Kapitel 2.2.3) oder die verzögerten Ionen-Extraktion (*delayed extraction*) [49][50] eingesetzt.

Mit der verzögerten Ionen-Extraktion (*delayed extraction*) (Bild 2-4) ist es möglich, entstehende Ionen zunächst in der Nähe der Probenoberfläche zu sammeln und erst nach einer Verzögerungszeit T_{Delay} zu extrahieren [49][50][51][52]. Ionen mit einer hohen initialen Geschwindigkeit sind bis zum Beginn der Extraktion weiter gedriftet als langsamere Ionen. Sie erhalten durch das Durchlaufen des Feldes bis zur Elektrode weniger zusätzliche kinetische Energie, als ein langsames Ion, welches das Feld vollständig durchläuft, so daß nach der Ionenquelle die ursprünglich langsamen Ionen die ursprünglich schnelleren bis zum Detektor einholen können. Die Verzögerungszeit und das Potential der Elektrode müssen so eingestellt werden, daß die Geschwindigkeitsverteilung und die Verteilung der Entstehungszeiten optimal kompensiert werden, und schnelle und langsame Ionen gleichzeitig den Detektor erreichen.

Durch den Einsatz einer Anordnung mehrerer Elektroden zur räumlichen und der verzögerten Extraktion zur zeitlichen Fokussierung ist es möglich, eine Massenaufösung von $M/\Delta M = 3000$ zu erreichen.

2.2.3 Reflektor

Bei der Flugzeit-Analyse ist ein wesentlicher Parameter, der zur Trennung von Massen beiträgt, die Gesamtflugzeit der Ionen und damit die Entfernung zwischen Probe und Detektor. Um diese zu erhöhen, aber gleichzeitig die Baugröße des Gerätes kompakt zu halten, wird ein Reflektor (*reflector* oder auch *ion mirror* (=Ionenspiegel)) verwendet (Bild 2-5). Ein Reflektor besteht aus einem homogenen Bremsfeld, das häufig unter einem Kippwinkel zur Richtung des Ionenstrahls ausgerichtet ist [47][48]. Die Ionen werden im Bremsfeld abgebremst und kehren um, wobei sie durch eine Neigung des Reflektors

Reflektors liegt in der einfacheren Bauweise. Allerdings ist die Auflösungsverbesserung höher, je kleiner die Feldstärke ist, da in diesem Fall die Energieunterschiede über eine längere Strecke kompensiert werden können. Ein einstufiger Reflektor muss, um die gleiche Auflösung zu erreichen, eine größere Länge besitzen als ein zweistufiger Reflektor.

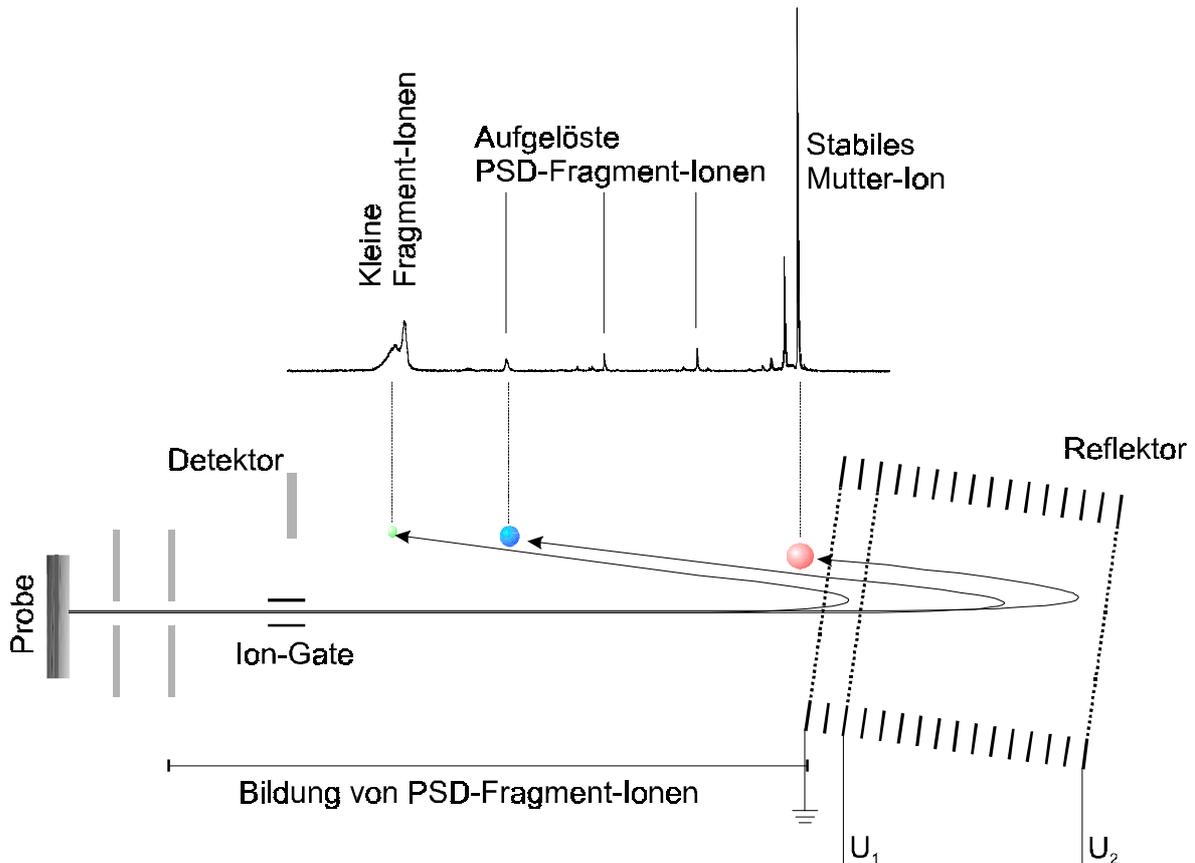


Bild 2-6: Auftrennung der PSD-Fragment-Ionen in einem zweistufigen Reflektor. Ionen mit einer kinetischen Energie kleiner als eU_1 werden nicht aufgelöst, während Ionen mit Energien zwischen eU_1 und eU_2 aufgelöst werden können (nach [53]).

Andere Reflektor-Geometrien sind sogenannte *curved-field* Reflektoren, bei denen sich die Feldstärke quadratisch oder exponentiell mit dem Ort ändert [54]. Diese bieten vor allem bei der Trennung von Fragment-Ionen (Kapitel 2.2.4) Vorteile gegenüber ein- oder zweistufigen Reflektoren, da mit einem einzigen Spektrum auch die Fragment-Ionen aufgelöst werden können, während bei einem zweistufigen Reflektor hierfür mehrere Spektren mit variierenden Reflektor-Spannungen benötigt werden. Jedoch erreicht die Auflösung eines *curved-field* Reflektor-Massenspektrometers nicht die eines zweistufigen Reflektors.

2.2.4 Trennung von Fragment-Ionen

In einem Reflektor dringen Ionen abhängig von ihrer kinetischen Energie unterschiedlich tief ein. Dies wird zunächst zur Auflösungsverbesserung genutzt. Fragmentieren Molekül-Ionen auf der Driftstrecke zwischen Ionenquelle und Reflektor (*Post-Source Decay*, siehe Kapitel 2.3.4)[55], so haben Fragment-Ionen die gleiche Geschwindigkeit wie das Mutter-Ion, aber wegen der geringeren Masse besitzen sie eine kleinere kinetische Energie. Daher kehren Fragment-Ionen an einem früheren Ort im Reflektor um, so daß ihre

Aufenthaltsdauer im Reflektor kürzer ist, je geringer die kinetische Energie und damit die Fragment-Ionen-Masse ist (Bild 2-6)[47]. Nach Verlassen des Reflektors driften alle Fragment-Ionen und das Mutter-Ion erneut mit der selben Geschwindigkeit, wodurch die Fragment-Ionen den Detektor zu einem früheren Zeitpunkt erreichen.

Bei einem zweistufigen Reflektor werden die Fragment-Ionen, deren kinetische Energie E kleiner als die potentielle Energie eU_1 am Ende der ersten Stufe ist, nicht aufgelöst, während die Fragment-Ionen mit einer höheren kinetischen Energie ($eU_1 < E < eU_2$) aufgelöst werden können. Durch Verändern der Potentiale U_1 und U_2 des Reflektors können auch leichtere Fragment-Ionen aufgelöst werden. Schwerere Fragment-Ionen (mit $E > eU_2$) treten bei dieser Einstellung durch den Reflektor hindurch. Ein gesamtes PSD-Fragment-Ionen-Spektrum wird erzeugt, indem die Einzelspektren bei verschiedenen Einstellungen der Potentiale zu einem Gesamtspektrum zusammengesetzt werden [24][56][57][58].

2.2.5 Selektion einzelner Ionen (precursor selection)

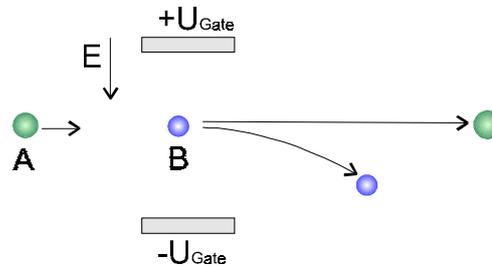
Bei der Aufnahme von PSD-Fragment-Ionen ist die Zuordnung der Flugzeit zur Masse eines Ions nicht mehr eindeutig, sondern es können in Mischungen stabile Ionen und PSD-Fragment-Ionen verschiedener Mutter-Ionen zur selben Zeit den Detektor erreichen. Um diese Masseninterferenz zu vermeiden, ist es notwendig alle anderen stabilen Ionen, außer dem Interessierenden, experimentell zu unterdrücken. Diese Unterdrückung wird durch ein gepulstes elektrisches Ablenkkfeld (*ion gate*) erreicht. Ein Ion-Gate besteht prinzipiell aus zwei Elektroden, zwischen denen orthogonal zur Flugbahn der Ionen ein elektrisches Feld anliegt (Bild 2-7(a)). Auf diese Weise erfahren *alle* Ionen eine Ablenkung ihrer Flugbahn, so daß sie nicht den Detektor erreichen. Wird nun das Ablenkkfeld für eine kurze Zeit ($\sim 80 - 100$ ns) ausgeschaltet (Schema in Bild 2-7(b)), werden alle Ionen, die in dieser Zeit in das Ion-Gate eindringen und es wieder verlassen haben, unbehindert den Detektor erreichen, während alle anderen Ionen abgelenkt werden.

Es ist notwendig die räumliche Länge des Ablenkkfeldes möglichst kurz zu wählen, so daß die Ionen im offenen Zustand vollständig durch das Gate driften können. Beispielsweise benötigt ein Substanz P Ion, das mit 20 kV beschleunigt wurde für eine 10 mm lange Strecke 180 ns, so daß bei einem 10 mm langen Gate und einem 100 ns Puls dieses Ion in jedem Fall beeinflußt wird. Das Gate dürfte hier maximal etwa 5 mm lang sein. Eine längere Öffnungszeit von etwa 200 ns würde das Substanz P Ion zwar ungehindert durchlassen, allerdings würden dadurch auch Ionen aus einem größeren Massenintervall teilweise beeinflußt. Eine teilweise Beeinflussung führt zu einer unvollständigen Unterdrückung des Signals und folglich zu einer geringeren Auflösung des Ion-Gate.

Die Schaltzeiten des Ion-Gate werden durch die Geschwindigkeit der verfügbaren Speziesschalter begrenzt. Die kürzesten erreichbaren Öffnungszeiten mit einem Push-Pull Hochspannungsschalter (BEHLKE HTS 30 PGSM) liegen für einer Spannungen von etwa 1000 V bei 80 ns, wobei die ansteigende und abfallende Flanke des Pulses etwa 20 ns ausmachen. Schnellere Schalter sind nicht in der Lage Spannungen in dieser Höhe zu schalten.

In Bild 2-8 ist der experimentelle Aufbau des Ion-Gate dargestellt. Anstatt, wie in Bild 2-7(a) dargestellt, zwei Ablenkplatten zu verwenden, werden bei dem Ion-Gate eine Reihe paralleler Drähte alternierend auf positivem und negativem Potential geschaltet. Dadurch herrscht lokal zwischen den Drähten eine große orthogonale Kraft auf die Ionen und das Feld wird in Flugrichtung vor und hinter der Anordnung gut abgeschirmt [55][59].

(a)



(b)

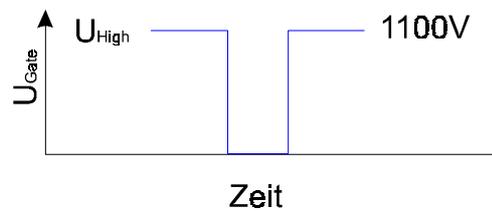


Bild 2-7: *Prinzipielle Funktionsweise eines Ion-Gate. (a) Flugbahn eines leichten Ions B, welches abgelenkt wird, und eines schweren Ions A, das durchgelassen wird. (b) Zeitlicher Verlauf der Spannung U_{Gate} .*

Das Auflösungsvermögen eines Ion-Gate kann als Quotient aus Masse und Breite des durchgelassenen Massenintervalls definiert werden:

$$R = M/\Delta M.$$

Die erreichbaren Auflösungen liegen bei etwa $M/\Delta M = 200$. In [59] wird durch die Kopplung von zwei sequentiellen Ion-Gates eine Verbesserung der Auflösung auf bis zu $M/\Delta M = 2000$ erreicht, wobei jedoch die Transmission des Ion-Gate und damit die Empfindlichkeit des Massenspektrometers reduziert werden.

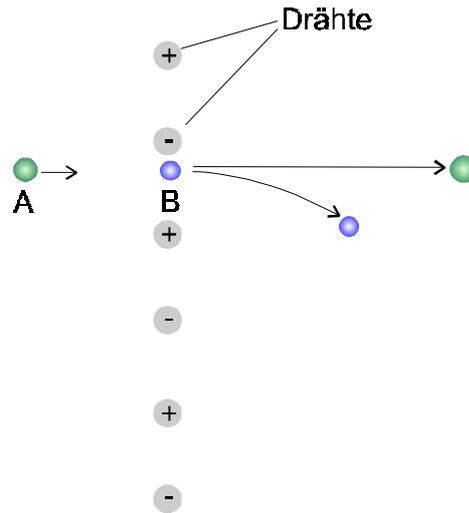


Bild 2-8: Aufbau eines Ion-Gate. Die Drähte liegen alternierend auf einer positiven (+) oder negativen Spannung. Für Ion B sind die Spannungen eingeschaltet, so daß das Ion abgelenkt wird. Bei Ion A sind beide Spannungen auf 0V, so daß Ion A nicht abgelenkt wird.

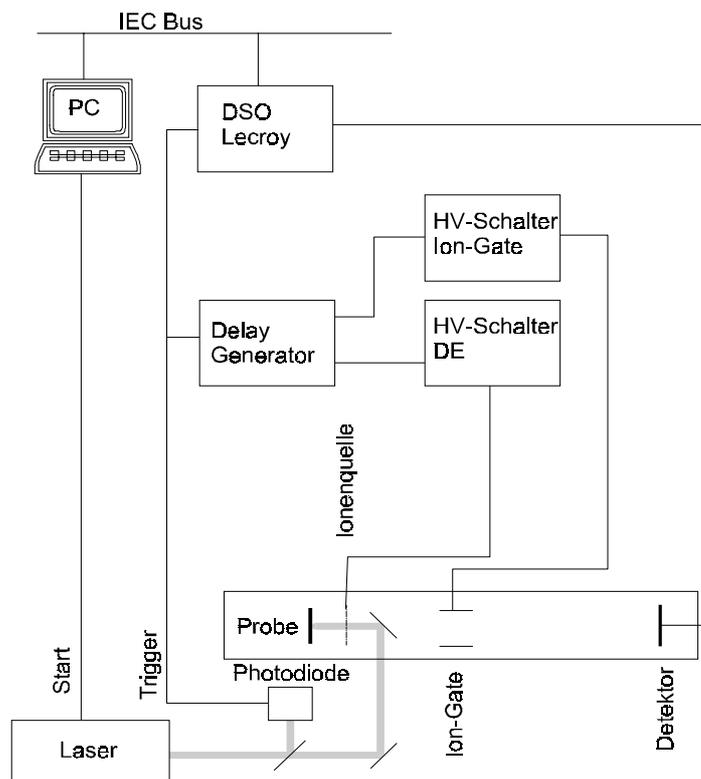


Bild 2-9: Blockscha der Datenaufnahme [55].

2.2.6 Datenaufnahme

Bei der Flugzeit-Analyse wird eine genaue Zeitmessung gefordert. In Bild 2-9 ist ein Blockscha bild der Datenaufnahme dargestellt. Als initiales Ereignis, auf das alle Zeiten bezogen werden, dient der Laserpuls, der durch den Messrechner gestartet wird. Dieser löst an einer Photodiode ein Signal aus, mit dem ein Delay-Generator (DG 535, Scientific Instruments) und das digitale Oszilloskop (Lecroy 9384) gestartet werden. Der Delay-

Generator dient zur zeitgenauen Erzeugung von Startsignalen für die verzögerte Ionen-Extraktion in der Quelle (Kapitel 2.2.2) und, bei Bedarf, für die Ionen-Selektion (Kapitel 2.2.4).

Die Ionen werden durch den Laserpuls auf der Probe erzeugt und gelangen durch die Ionenquelle und Driftstrecke bis zum Detektor, dessen Signal vom Oszilloskop aufgezeichnet wird. Nach vollendeter Aufzeichnung wird der Datensatz über die IEC-Bus Schnittstelle vom Oszilloskop auf den PC übertragen, wo die Daten weiter verarbeitet werden (Massen-Kalibrierung, Summierung, etc.).

Die Genauigkeit wird durch die Zeitauflösung des digitalen Oszilloskops vorgegeben. Die kürzeste hier erreichbare Zeit beträgt 1 ns, wobei typischerweise mit 2 ns pro Kanal gearbeitet wird.

2.3 Fragmentierungs-Mechanismen

2.3.1 Berechnung der Peptidmasse

Peptide setzen sich aus sich wiederholenden Basiseinheiten, den Aminosäuren, zusammen. Eine Aminosäure besteht aus einem zentralen Kohlenstoff-Atom mit einer Amino-Seitengruppe (-NH₂), einer Carboxyl-Seitengruppe (Säuregruppe) (-COOH) und einer funktionalen Gruppe, nach der die Aminosäure benannt wird. Die Amino-Gruppe und die Carboxyl-Gruppe von zwei Aminosäuren können sich unter Abspaltung von Wasser zu der sogenannten Peptid-Bindung verbinden. Daraus entsteht ein neues Molekül (ein Dipeptid), welches an den Enden wiederum eine Amino- und eine Carboxyl-Seitenkette besitzt, an denen sich weitere Aminosäuren unter Abspaltung von Wasser verbinden können. Somit lassen sich längere lineare Aminosäure-Ketten bilden, die als Peptide bezeichnet werden. Proteine bestehen ebenfalls aus Aminosäureketten, besitzen jedoch häufig eine komplexere Struktur als die einer linearen Kette. Die Struktur wird zum Beispiel über Disulfid-Brücken oder post-translationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen oder Glycosylierungen, gebildet.

Die Masse eines Peptids läßt sich bei bekannter Sequenz leicht aus den Inkrementmassen der Aminosäuren berechnen. Unter Inkrementmasse einer Aminosäure versteht man die Masse, um die sich die Peptidmasse erhöht, wenn man die Aminosäure anfügt oder einfügt. Dazu müssen die Inkrementmassen aller Aminosäuren der Sequenz, die Masse der N-terminalen (bei einer Amino-Seitengruppe ist dies ein Proton H ($m = 1,00782$ u)) und der C-terminalen Seitengruppe addiert werden. Die C-terminale Seitengruppe ist bei einer Säure ein -OH ($m = 17,00275$ u) und bei einem Amid ein -NH₂ ($m = 16,01872$ u). Bei der Berechnung der im MALDI-Massenspektrometer detektierten Masse muss außerdem beachtet werden, daß das (M+H)⁺-Ion nachgewiesen wird, das heißt, zusätzlich die Masse eines Protons ($m = 1,00782$ u) hinzu addiert werden muss. Bei ESI-MS werden höher geladene Ionen von Peptiden nachgewiesen, die sich durch die Anlagerung mehrerer Protonen bilden, so daß ein (M+nH)ⁿ⁺-Ion bestimmt wird, die Masse folglich um n Protonen erhöht wird. Im Massenspektrometer nachgewiesen wird das Ion jedoch bei dem Masse/Ladungs-Verhältnis, das heißt bei $m/z = (M+nH)/n$.

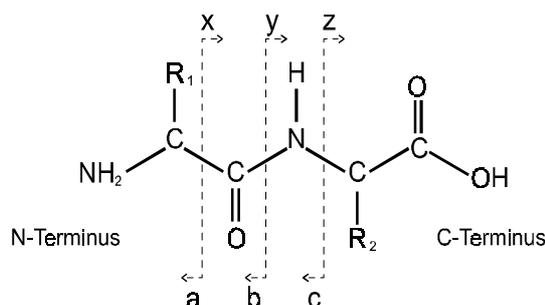


Bild 2-10: Schematischer Aufbau der Peptid-Bindung

2.3.2 Fragmentierungs-Schema bei Peptiden

Peptide fragmentieren vor allem entlang der Hauptkette an der Peptid-Bindung (Bild 2-10). Dadurch sind die entstehenden Massen der Fragment-Ionen bei einer bekannten Peptid-Sequenz leicht berechenbar. Die Fragmente werden entsprechend ihrer Bruchstelle nach der Notation von Roepstorff und Fohlman, sowie Johnson und Biemann [60][61] mit einem Buchstaben für die Art des Bruches und einem Index für die Anzahl der Aminosäuren im Fragment gekennzeichnet. Der Index wird demnach für N-terminale Fragmente vom N-Terminus und für C-terminale Fragmente vom C-Terminus ausgehend hochgezählt.

Als Basis für die Bestimmung der Masse eines Fragments dient wiederum die Inkrementmasse der Aminosäuren. Dazu wird die Masse aus der Summe der Inkrementmassen der im Fragment-Ion enthaltenen Aminosäuren bestimmt, wobei noch zusätzlich Beiträge für das N-terminale und C-terminale Ende, sowie für das ladungsgebende Proton hinzu addiert werden müssen. Zum Beispiel berechnet sich die Masse für ein N-terminales b-Ion aus der Summe der Inkrementmassen zuzüglich je eines Wasserstoffatoms für die Protonierung und für die Komplettierung des N-Terminus. Da das Peptid am C-Terminus des b-Fragment-Ions direkt an der Stelle bricht, an der die Inkrementeinheit endet, tritt hier kein Beitrag auf. Die Rechenregeln für die weiteren Fragmente sind in der Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2: Die Tabelle zeigt die Berechnungsformeln für verschiedene Fragment-Typen eines Peptids mit N Aminosäuren (Position 1 ist N-terminal, Position N ist C-terminal). In der ersten Spalte steht der Fragment-Typ, in der zweiten Spalte die zu addierenden Aminosäure-Positionen. In der dritten bis fünften Spalte folgen die Inkrementeinheiten am N-, bzw. C-Terminus und der Ladung. Schließlich folgt die Berechnungsformel in der letzten Spalte

Fragment-Typ	Inkrement	N-Terminus	C-Terminus	Proton	Summe
a-Ion	Summe 1..n Inc	H (+1)	- C=O (-28)	H (+1)	Inc - 26
b-Ion	Summe 1..n Inc	H (+1)	-	H (+1)	Inc + 2
c-Ion	Summe 1..n Inc	H (+1)	+ NH ₂ (+16)	H (+1)	Inc + 18
x-Ion	Summe n+1..N Inc	+ C=O (+28)	OH (+17)	H (+1)	Inc + 46
y-Ion	Summe n+1..N Inc	H (+1)	OH (+17)	H (+1)	Inc + 19
z-Ion	Summe n+1..N Inc	- NH ₂ (-16)	OH (+17)	H (+1)	Inc + 2

Interne Fragmente entstehen aus je zwei Brüchen: Einem Bruch mit einem N-terminalen Muster und einem zweiten mit einem C-terminalen Muster. In der Bezeichnung (AY, BY, CY, usw.) beziehen sich die Buchstaben auf diese jeweiligen Bruchtypen. BY bedeutet einen b-Bruch auf der C-terminalen Seite und einen y-Bruch auf der N-terminalen Seite. BY-Brüche haben demnach die gleichen Massen, wie N-terminale b-Ionen der gleichen Sequenz (Tabelle 2-2). Dies kann bei der Interpretation unbekannter Peptide durchaus zu Mehrdeutigkeit führen. Zur eindeutigen Bezeichnung eines internen Fragments werden die Indizes des N-terminalen und des C-terminalen Bruches mit angegeben. Zum Beispiel beschreibt A_4Y_3 das Fragment-Ion GF im Peptid YGGFM, welches aus einem a_4 -Bruch und einem y_3 -Bruch gebildet wird.

Nicht alle hier aufgelisteten Fragment-Typen sind jederzeit beobachtbar, so treten beispielsweise x-Ionen bei PSD-MALDI kaum auf.

Neben den hier beschriebenen Fragmenten treten noch Abspaltungen von Ammoniak (NH_3 (17 u)) oder Wasser (H_2O (18 u)) von den Seitenketten der Aminosäuren relativ häufig auf.

2.3.3 Isotopenmuster und Bestimmung der Ladung

2.3.3.1 Anwendungen von Isotopenmustern in der Massenspektrometrie

Anhand vorliegender Daten aus Proteindatenbanken oder mit Hilfe von Kombinatorik lassen sich statistische Informationen über Isotopenverteilung und Häufigkeitsverteilung der Peptidmassen gewinnen.

Die natürliche Isotopenverteilung der Atome führt bei Massenspektren von organischen Substanzen zu Signalmustern, die mit steigender Masse – und damit steigender Anzahl der Atome – immer komplexer werden [62]. Setzt sich ein Molekül aus den leichtesten Isotopen zusammen so ist dieses Signal der monoisotopische Peak und dessen Masse die monoisotopische Masse des Moleküls. In organischen Substanzen treten hauptsächlich die Isotope ^{12}C , ^{13}C , ^1H , ^2H , ^{14}N , ^{15}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S auf [63][64]. Das Molekül mit der monoisotopischen Masse (der monoisotopische Peak), ist nur bis zu einer Masse von etwa 1800 u am häufigsten. Bei höheren Massen wird zunächst der nächst höhere Isotopenpeak der intensivste Peak sein, während die Intensität des monoisotopischen Peaks immer stärker abnimmt und bei großen Massen nicht mehr detektiert werden kann. Dieser Effekt führt dazu, daß z. B. bei *Fourier-Transformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz Massenspektrometrie* (FT-ICR-MS) das Signalmuster von Proteinen im Bereich von 20 kDa zwar isotopenaufgelöst gemessen und auch die Masse der einzelnen Signale mit einer Genauigkeit von 1 ppm bestimmt werden kann, die monoisotopische Masse aber aus der genauen Isotopenverteilung um 1-2 u zu groß bestimmt wird [65].

Es gibt einige Ansätze, das Isotopenmuster entweder zu unterdrücken oder durch gezieltes Einbringen von bestimmten Isotopen weitere Informationen zu gewinnen. Die Autoren in [66] züchten Zellen in ^{13}C und ^{15}N isotopisch angereicherten Zellkulturen, um schließlich Proteine mit angereicherten Isotopen-Anteilen isolieren zu können und dadurch das Isotopenmuster zu vereinfachen. Allerdings ist dieser Ansatz nicht allgemein anwendbar.

Mit Markierungsverfahren möchte man zusätzliche Informationen über die Probe erhalten, wie z.B. bei der Deuterierung von Peptiden [67], bei der die Anzahl der aciden Protonen

bestimmt wird. Ein anderes Beispiel ist die ^{18}O Markierung bei einem enzymatischen Verdau [68][69], wodurch die verdauten Spalt-Peptide durch einen Doppelpick auffallen.

Auch in der Vergangenheit gab es bereits Ansätze, das Isotopenmuster bei der Datenauswertung zu berücksichtigen. Zubarev et al. [70] haben eine Umrechnung präsentiert, mit der aus der Schwerpunktmasse die monoisotopische Masse bestimmt werden kann. Hierzu braucht das Signal bei einem großen Protein nicht aufgelöst zu sein, da sich die Schwerpunktmasse auch über die einhüllende Kurve bestimmen läßt. Der von Zubarev ermittelte Umrechnungsfaktor ist :

$$M_{\text{Mono}} = M_{\text{Schwerpunkt}} * (1 - 1/1463).$$

Andere Methoden des Isotopenmuster-Vergleichs (*isotope pattern matching*) wurden eingesetzt, um die Atomkomposition von Molekülen zu bestimmen [71][72][73]. Allerdings sind die dort vorgestellten Verfahren, wegen des hohen rechnerischen Aufwandes, auf relativ kleine Massen beschränkt (300 u), und es werden reine Proben ohne Masseninterferenzen vorausgesetzt.

Erste Versuche, den Isotopenmuster-Vergleich auch auf komplexe Gesamtspektren anzuwenden, sind erst in neuerer Zeit präsentiert worden [74][75][76][77][78]. Während Gras et al. eine relativ zeitaufwendige Methode zur automatischen Peak-Erkennung in Massen-Screenings von Verdau-Produkten verwenden [76], ist Ziel der vorliegenden Arbeit, eine einfache und schnelle Methode zur Entfaltung von Massenspektren zu entwickeln, mit welcher der Informationsgehalt des Spektrums auf die monoisotopischen Massen in komplexen Mischungen reduziert wird und standardmäßig angewendet werden kann. In Peptid-Gemischen findet man häufig bei nahezu jeder Masse ein Molekül-Ionen-Signal, was zu starken Interferenzen der Isotopen-Signale benachbarter Peptide führt.

In Kapitel 4.2 werden die statistischen Eigenschaften der massenabhängigen Häufigkeitsverteilung und der Isotopenmuster von Peptiden untersucht. Mit diesen Informationen wurde ein Filteralgorithmus entwickelt, der durch Berücksichtigung der Isotopenmuster die Interpretation von Massenspektren erleichtert.

Allen in der Literatur beschriebenen Verfahren ist gemeinsam, daß primär eine Massenliste mit den monoisotopischen Massen erzeugt wird und nicht das gefilterte Spektrum betrachtet werden kann. Der in Kapitel 4.2 gezeigte Algorithmus bietet dagegen die Möglichkeit, ein Spektrum der monoisotopischen Massen zu analysieren. Er kann aber auch dazu genutzt werden, eine verbesserte und präzisere Peak-Erkennung durchzuführen, da Fehlinterpretationen durch andere Isotopenpeaks vermieden werden.

2.3.3.2 Methoden zur Entfaltung von ESI-Massenspektren

Im Gegensatz zur MALDI-Massenspektrometrie, treten bei *Elektrospray-Ionisation* (ESI) Massenspektrometrie nicht nur einfach geladene Molekül-Ionen auf, sondern es entstehen bevorzugt eine Reihe höher geladener Molekül-Ionen vom Typ $(M+nH)^{n+}$, welche bei einem m/z-Wert nachgewiesen werden, so daß sich daraus nicht mehr direkt wie bei MALDI-MS die Molekül-Ionen-Masse ablesen läßt. Die Anwendung einer Entfaltung der Massenspektren, analog zu der in Kapitel 2.3.3.1 für MALDI beschriebenen Prozedur, ist nicht ohne Anpassung möglich, da von einer Peak-Gruppe der Ladungszustand bekannt sein muss, um sie mit einem gemittelten Isotopenmuster zu vergleichen. Bei einem einfach

geladenen Ion haben die Isotopenpeaks auf der m/z -Skala den Abstand 1 u, während beispielsweise die Peaks eines zweifach geladenen Ions den Abstand 0,5 u besitzen.

Es existieren bereits einige Methoden, um die Molekülmasse aus dem ESI-Massenspektrum zu bestimmen. Eine dieser Methoden kennzeichnet die Suche nach Peaks von verschiedenen Ladungszuständen desselben Moleküls. Diese Suche erfolgt dadurch, daß im Spektrum zu einer Zielmasse eines einfach geladenen Molekül-Ions nach Signalen bei den m/z -Werten der dazu gehörenden, höher geladenen Molekül-Ionen gesucht wird. Durch intensive Peaks im experimentellen Spektrum entstehen hierbei im Ausgabespektrum Peaks bei einer falschen Masse, sogenannte Geisterpeaks, indem den intensiven Peaks eine falsche Ladung zugeordnet wird. Die Intensität der Geisterpeaks übersteigt teilweise die Intensität des Signals bei der *richtigen* Masse, so daß auch die erzeugten Spektren noch einer genauen Interpretation bedürfen. Darüber hinaus ist die Massengenauigkeit der erzeugten Spektren nicht sehr hoch (etwa 1 u bei einer Masse von 5000 u). Ein Vorteil dieser Methode liegt jedoch darin, daß sie auch anwendbar ist, wenn die Isotopenpeaks des Massenspektrums nicht mehr aufgelöst sind. Dadurch findet dieses Verfahren bei Proteinen eine Anwendungsmöglichkeit. Bei größeren Massen ist das Problem der Geisterpeaks von geringerer Bedeutung, da zahlreiche Ladungszustände auf die richtige Masse deuten, während auf Geisterpeaks immer nur wenige Peaks hinweisen.

Bei dem ZSCORE-Algorithmus von Zhang und Marshall [79] werden für den intensivsten Peak im Spektrum als erstes die Ladung bestimmt und alle Isotopenpeaks zu dieser Ladung bei der neutralen Masse aufsummiert. Alle Peaks werden anschließend aus dem Spektrum entfernt. Dadurch ist es nicht möglich Peptide mit nahe zusammenliegenden Massen, deren Isotopenmuster interferieren, zu identifizieren, da durch das Abziehen der Isotopenpeaks des Peptids mit kleinerer Masse ebenfalls die Peaks des schwereren Peptids aus dem Spektrum entfernt werden. Zusätzlich wird für grosse Massen die monoisotopische Masse zu hoch erkannt, da von der maximalen Intensität ausgegangen wird.

Eine andere von McLafferty vorgestellte Methode [80] stellt den Ladungszustand eines Molekül-Ions anhand der aufgelösten Isotopenpeaks fest und bestimmt die monoisotopische Masse des Peak-Clusters, indem ein gemitteltes Isotopenmuster mit den Maxima des experimentellen Peak-Clusters verglichen wird. Die Autoren haben diese Methode auf ESI-FTICR Massenspektren von Proteinen angewendet.

Der in der vorliegenden Arbeit in Kapitel 4.4 vorgestellte Filteralgorithmus ist mit seiner Erweiterung auf Mehrfachladungen in der Lage, die monoisotopischen Massen aus ESI-Massenspektren zu bestimmen. Dabei wird insbesondere auf das Auftreten von Geisterpeaks und deren Beseitigung eingegangen. Darüber hinaus können mit diesem Verfahren Masseninterferenzen von Peptiden mit 1 u Massenunterschied noch getrennt werden. Es ist auch möglich, ESI-Massenspektren nach Einzelladungen getrennt zu untersuchen.

2.3.4 Prompt Decay / In-Source Decay / Post-Source Decay

Die Fragmentierung von Molekülen findet auf verschiedenen Zeitskalen statt. Bei den „harten“ Ionisierungsmethoden, wie z. B. EI-MS, erlangt das Molekül bereits durch die Ionisierung eine derart starke Anregung, daß es innerhalb kürzester Zeit (wenige ns)

fragmentiert. Dieser Zerfallsprozess wird als *prompt decay* bezeichnet. Dagegen sind bei „weicheren“ Methoden, zu denen MALDI zählt, die Anregungsenergien geringer, und es entstehen Ionen, die über eine längere Zeitdauer stabil sind. Steigt die Bestrahlungsstärke an, wird der Energieüberschuss erhöht, so daß ein Teil der Molekül-Ionen bereits nach kurzer Zeit fragmentiert [81][82][83]. Da dieser Prozess noch in der Ionenquelle stattfindet, spricht man von *In-Source Decay* (ISD) [49][81]. In einem Flugzeit-Massenspektrometer lassen sich ISD-Produkt-Ionen nicht von stabilen Molekül-Ionen unterscheiden. Sie werden jedoch bevorzugt bei verzögerter Ionen-Extraktion beobachtet, da die Ionen durch das permanent anliegende Feld bei statischer Ionen-Extraktion nicht auf den Detektor fokussiert werden können.

Das einzige Erkennungsmerkmal der ISD-Ionen ist ihre im Vergleich zu stabilen Ionen geringere Massenauflösung, da diese über einen längeren Zeitraum (bis ~100 ns) entstehen. Zusätzlich ist die Häufigkeit der Fragment-Ionen abhängig von der Bestrahlungsstärke.

Liegt die Anregungsenergie niedriger, bleibt der Großteil der Ionen über längere Zeit stabil und zerfällt erst nach einigen μs . Zu dieser Zeit haben die Molekül-Ionen bereits die Ionenquelle verlassen und befinden sich auf der feldfreien Driftstrecke, so daß die Fragmente nicht mehr defokussiert werden. Hier entstehende Fragmente werden daher nach ihrem Entstehungsort als *Post-Source Decay*-Fragmente (PSD-Fragmente) bezeichnet [55]. Die PSD-Analyse wurde auf zahlreiche verschiedene Substanzklassen angewendet, wie Peptide [24], Oligosaccharide [84][85] oder Oligonucleotide [86]. Die PSD-Analyse negativer Peptid-Ionen wurde von Jainhuknan und Cassady demonstriert [87].

PSD-Fragmente lassen sich nachweisen, da ihre Geschwindigkeit gleich der des Mutter-Ions sind, und sie daher in einem Reflektor kürzere Durchlaufzeiten besitzen (Kapitel 2.2.4). Die Bestimmung der Masse eines PSD-Fragment-Ions ist komplexer als für ein ISD-Fragment-Ion, da eine Kalibrierungsfunktion auf das zugehörige Mutter-Ion bezogen werden muss. Im Falle von ISD-Fragment-Ionen unterscheidet sich die Massen-Kalibrierung nicht von der für stabile Ionen.

2.3.5 Stoss-induzierter Zerfall (CID)

Die eben beschriebenen Fragmentierungs-Typen finden spontan nach der Ionisierung statt. Reicht dieser spontane Zerfall nicht aus, kann durch Stöße mit einem inerten Gas eine Anregung erzeugt werden, die zu einer Fragmentierung führt. In diesem Fall spricht man von stoss-induziertem Zerfall (*collision induced dissociation*; CID). Bei der CID wird versucht durch eine große Dichte des Stoss-Gases eine möglichst große Häufigkeit von Stößen zwischen Molekül-Ionen und dem Stoss-Gas zu erreichen. Demgegenüber steht die Notwendigkeit ein hohe Transmission für Molekül-Ionen und deren Fragment-Ionen zu erhalten. Die Rate der Fragmentierung wird durch die relative Geschwindigkeit der Stosspartner beeinflusst. Fragmentierungen bei Stoss-Energien bis etwa 100 eV werden als *low-energy* CID und bei Stoss-Energien in keV-Bereich als *high-energy* CID bezeichnet [25]. CID wird in der Regel bei FAB in Sektorfeld-Geräten [26] oder bei ESI in Triple-Quadrupol Geräten (im zweiten Quadrupol) [88] eingesetzt. Es gibt jedoch auch einige wenige Anwendungen im MALDI-TOF Massenspektrometer [89][90][91].

2.3.6 Modell zur Fragmentierung

2.3.6.1 Charge Remote und Charge Induced Fragmentierung

Bei der Fragmentierung von Ionen kann zwischen verschiedenen Mechanismen unterschieden werden. Abhängig davon, ob der auf dem Molekül vorhandene Ladungsträger (im Falle von MALDI eine positive Ladung, meist ein Proton) die Fragmentierung induziert, oder keinen Einfluß nimmt, spricht man von *charge induced* und *charge remote* Fragmentierung [92]. Als ein Beispiel für die unterschiedlichen Mechanismen kann das Fragmentierungs-Verhalten von Prolin und Asparaginsäure einander gegenübergestellt werden. Gemeinsam ist beiden Aminosäuren eine äußerst labile Bruchstelle, die beim Prolin auf der N-terminalen und bei der Asparaginsäure auf der C-terminalen Seite der Aminosäure auftritt.

Bei der Asparaginsäure sind die Intensitäten der Fragment-Ionen-Signale relativ gleichmäßig auf b- und y-Ionen verteilt. Dagegen beobachtet man für Prolin eine Konzentration der Ionensignale entweder auf ein b- oder ein y-Fragment, abhängig davon, auf welcher Seite der Peptidkette die an der Fragmentierung unbeteiligte („*remote*“) Ladung lokalisiert ist. Besitzt ein Peptid beispielsweise ein N-terminales Arginin, überwiegt das b-Fragment-Ion der Prolin-Bruchstelle und das y-Fragment-Ion tritt kaum auf. Befindet sich ein Arginin, bei sonst gleicher Sequenz, am C-terminalen Ende, kehrt sich das Bild um, und das Signal des y-Fragment-Ions ist intensiver. Die Mechanismen, die bei Prolin und Asparaginsäure zur Fragmentierung führen sind folglich offensichtlich unterschiedlich.

Der Bruch bei Asparaginsäure wird durch die Ladung induziert. Wenn sich das Proton vor dem Bruch in der Nähe der Aminosäure befindet, bleibt es nach der Fragmentierung zufällig, aber mit ähnlichen Wahrscheinlichkeiten, auf der einen oder anderen Seite des Fragments. Die große Häufigkeit der Fragment-Ionen ist durch die große Protonenaffinität von Asparaginsäure bedingt. In diesem Fall spricht man von einer ladungsinduzierten (*charge induced*) Fragmentierung.

Der Bruch bei Prolin findet unabhängig von der Position der Ladung statt. Welches der Fragmente die Ladung behält, hängt von den Aminosäure-Sequenzen der Fragmente ab. Hier führt nicht die Protonenaffinität von Prolin zur Fragmentierung, sondern die sterische Instabilität der Prolin-Bindung. Aus diesem Grund wird ein solcher Mechanismus als ladungsunabhängige (*charge remote*) Fragmentierung bezeichnet.

Bei anderen Aminosäuren ist die Polarisierung zwischen beiden Mechanismen nicht so stark ausgeprägt, sondern es findet eine Überlagerung statt.

2.3.6.2 Stabilität der Bruchstellen

Zunächst einmal bricht jede Peptid-Bindung, unabhängig von der Position des Ladungsträgers, auf dem Peptid unterschiedlich leicht oder schwer auf. Ein Maß für die Stabilität einer spezifischen Peptid-Bindung ergibt sich aus der Summe der Intensitäten aller Fragmente, die diese Bruchstelle enthalten, also im einfachsten Fall der b- und y-Ionen. Ein weiterführendes Modell sollte darüber hinaus auch alle internen Fragmente berücksichtigen, bei denen neben der untersuchten Bruchstelle noch eine weitere Bindung im Peptid bricht. Es kann davon ausgegangen werden, daß die an der Bruchstelle

benachbarten Aminosäuren die Bruchstärke beeinflussen. Da es 20 proteinogene Aminosäuren gibt, erhält man auf diese Weise insgesamt 400 verschiedene Kombinationen mit unterschiedlichen Bruchstärken [93].

2.3.6.3 Einflüsse auf die Stabilität

Die Stabilität einer Peptid-Bindung kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Am auffälligsten sind *sterische Faktoren* (z.B. Prolin), bei denen durch die räumliche Struktur des Moleküls eine „Sollbruchstelle“ entsteht. Ein weiterer Faktor wird durch die Seitenketten der Aminosäuren geliefert. Benachbarte Seitenketten können eine Peptid-Bindung entweder stabilisieren oder aber auch destabilisieren (Tryptophan, Tyrosin). Die Position des Ladungsträgers beeinflusst die Stabilität ebenfalls.

2.3.6.4 Lokalisierung der Ladung

Der Ladungsträger kann auf bestimmten Seitenketten des Peptids lokalisiert werden. Verschiedene Aminosäuren haben unterschiedliche Protonenaffinitäten [94][95][96], d.h. die Chance ein Proton dort anzutreffen, variiert abhängig von der Seitenkette. Davon hängt auch die Verteilung der detektierten Fragment-Ionen ab, da eine sehr stark Protonen anziehende Aminosäure im Vergleich mit anderen Aminosäuren die (geladenen) Fragmente zu solchen verschiebt, die diese Aminosäure enthalten (z.B. Arginin, Lysin).

Die Lokalisierung der Ladungen führt zum einen zu der Verteilung von N- und C-terminalen Fragmenten (*charge remote* Fragmentierung), und zum anderen zu einer Beeinflussung der Fragmentierung einzelner Bindungen (*charge induced* Fragmentierung) (siehe Kapitel 2.3.6.1).

2.3.7 RRKM-Modell

Unter dem Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus (RRKM) Modell versteht man eine Beschreibung des Zustands eines Moleküls, mit dessen Hilfe sich die möglichen Fragmentierungswege oder Reaktionen beschreiben lassen [97][99][100]. Es hängt für ein Molekül nicht davon ab, auf welche Weise es aktiviert wurde, so daß man sich ein Molekül als eine Reihe von s identischen harmonischen Oszillatoren vorstellen kann. Einer dieser Oszillatoren stellt die interessierende Bindung dar (kritischer Oszillator). Des weiteren wird in dem Modell vorausgesetzt, daß die Energie sich frei über alle Schwingungsmoden des Moleküls verteilen kann. Jeder Zustand, bei dem der kritische Oszillator mehr Energie enthält, als die Bindungsenergie E_0 , ist ein möglicher Übergangszustand. Für den Grenzfall, daß die Anzahl der Quanten n sehr viel größer als die Anzahl der Oszillatoren s ist, ergibt sich die Ratengleichung

$$k(E) = \nu \left(\frac{E-E_0}{E} \right)^{s-1},$$

wobei E_0 die Aktivierungsenergie einer Bindung, und E die Energie des Moleküls darstellt. ν ist die Frequenz des Oszillators. An dieser Gleichung läßt sich gut erkennen, daß die Rate steigt, wenn die Energie zunimmt. Wenn die Zahl der Oszillatoren steigt, nimmt die Rate ab. Zur direkten Berechnung von Raten ist diese Gleichung allerdings nicht sehr gut geeignet. Hierfür ist ein Ansatz, bei dem die Zustandssumme und die Zustandsdichte

eingehen, besser geeignet. Diese lassen sich aus den diskreten harmonischen Oszillatoren direkt abzählen, oder auch näherungsweise bestimmen.

2.3.8 Vereinfachtes (exponentielles) Modell

Zur vereinfachten Beschreibung der Dynamik der Fragmentierungs-Reaktionen komplexer Moleküle kann ein Ratenmodell verwendet werden. Nach diesem Modell besitzt jede mögliche Bindung in dem Molekül, eine bestimmte konstante Fragmentierungs-Rate k_i , welche die Wahrscheinlichkeit angibt, daß diese Bindung aufbricht. Die Rate hat die Dimension Brüche/Sekunde (s^{-1}) und kann aus der inneren Energie und der Bindungsenergie einer Bindung bestimmt werden. Je größer der Überschuss an innerer Energie des Moleküls, um so höher steigt die Zerfallsrate. Ist die innere Energie kleiner als die Bindungsenergie einer Bindung, kann diese im Molekül nicht brechen.

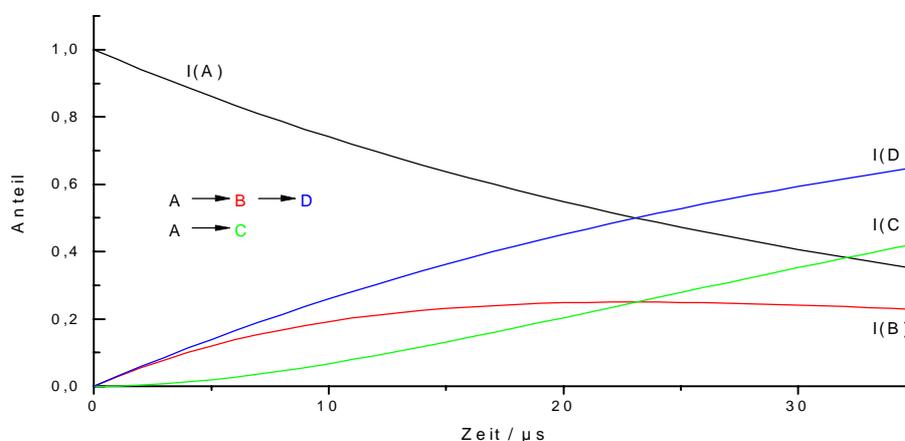


Bild 2-11: Zerfallsmodell mit einer Beispiel-Reaktion aus drei Fragmenten B, C und D und dem Mutter-Ion A. Die Raten sind für alle Reaktionswege gleich groß ($k = 30000 / s$) (aus [98])

Ähnlich wie bei dem RRKM-Modell verteilt sich die gesamte innere Energie gleichmäßig auf alle Freiheitsgrade des Moleküls. Dies ist plausibel, da das Molekül nicht direkt nach der Aufnahme der Energie zerfällt, so daß die Energie relaxieren und sich auf alle Freiheitsgrade verteilen kann [97]. Nachdem sich die Energie verteilt hat, finden für das Ion keine weiteren Wechselwirkungen mehr statt, und es fragmentiert spontan bei einem unimolekularen Zerfall. In Bild 2-11 sind für drei Fragmente und das Mutter-Ion die Häufigkeiten aufgetragen [98]. Die Häufigkeit des Mutter-Ions (A) nimmt exponentiell mit der Zeit ab, während die Fragmente (B, C, D) entsprechend ansteigen. Falls noch weitere Reaktionen der Fragmente stattfinden (interne Fragmentierungen), kann ein Fragment nach einer längeren Zeit wieder abnehmen (B).

Die Intensität des Mutter-Ions kann als Exponentialfunktion

$$I_A(t) = \frac{e^{-k_{AB}t} + e^{-k_{AC}t}}{2}$$

geschrieben werden, deren Verlauf in Bild 2-11 zu sehen ist. Die Indizes bei den Raten bezeichnen den Reaktionsweg, das heißt, k_{AB} ist die Rate für die Reaktion $A \rightarrow B$, usw.

Die Bestimmung der Raten kann in diesem Modell analog zum RRKM-Modell verstanden werden. Hier soll es aber im wesentlichen auf die Beschreibung der Dynamik und die empirische Bestimmung von Raten ankommen, während das RRKM-Modell hauptsächlich zur theoretischen Bestimmung der Raten verwendet wird.

2.4 Präparations-Verfahren

2.4.1 Dried droplet-Methode (mit DHB)

Die dried droplet-Präparation kann bei wasserlöslichen Matrices verwendet werden und wird häufig mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. Matrix und Analyt befinden sich in einer wässrigen Lösung (Matrix: $c \approx 6,5 \cdot 10^{-2}$ mol/l, Analyt: $c \approx 10^{-4} - 10^{-8}$ mol/l) und werden auf dem Target miteinander vermischt (ca. 0,5 µl Matrix + 0,25 µl Analyt), so daß sich ein Matrix/Analyt-Verhältnis von etwa 1000:1 ergibt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Zufuhr von Wärme verdampft, wobei ein Mischkristall aus Matrix und Analyt entsteht. Das Wasser trocknet zunächst am Rand des Tropfens, wodurch dort ein Ring aus größeren Kristallen entsteht, während sich in der Mitte ein amorpher Bereich bildet. Durch die unterschiedliche Wasserlöslichkeit von Salzen und DHB, bleiben die Salz-Ionen (z.B. Na^+) länger gelöst und sind in der Mitte der Probe gesammelt. Der Probenrand ist durch diesen Effekt häufig frei von Salz-Addukten, so daß ausschließlich protonierte Molekül-Ionen nachgewiesen werden können, während von der Probenmitte der Anteil der Natrium- und Kalium-Addukte zunimmt. Neben der hier beschriebenen Methode gibt es noch ähnliche Verfahren, die in [39] näher erläutert werden.

An der Ausprägung von kristallinem Rand und amorpher Mitte läßt sich bereits erkennen, ob ein günstiges Matrix-Analyt-Verhältnis vorliegt. Ist die Probe glasig und es bilden sich kaum Kristalle, so ist entweder die Analyt-Konzentration zu hoch, oder die Probe ist sehr stark mit Salzen oder Detergenzien versetzt. In diesem Fall kann es hilfreich sein, die Probe erneut mit der Matrix-Lösung anzulösen und neu zu kristallisieren.

2.4.2 Layer-Methode (mit Zimtsäure, Sinapinsäure)

Anders als DHB sind Zimtsäure und Sinapinsäure nicht wasserlöslich, so daß die Matrix nicht mit den in wässriger Lösung vorliegenden Analyt-Molekülen gemischt werden kann. Zur Präparation wird hier eine Schichtmethode eingesetzt: Zuerst wird die Matrix auf das Target gegeben. Da diese in Aceton oder Methanol gelöst ist, verdampft das Lösungsmittel schnell und es bildet sich eine dünne Schicht sehr feiner Kristalle. Auf diese Schicht wird anschließend ein Tropfen der Analyt-Lösung gegeben. Das Wasser löst die Matrix nicht an, und die Analyt-Moleküle lagern sich beim Trocknen auf der Oberfläche der Matrix-Kristalle an.

Der Vorteil dieser Präparation liegt in der wesentlich homogenen Verteilung der Analyt-Moleküle auf der Probenoberfläche [39].

2.4.3 Probenaufreinigung / Trennung

Falls Proben stark mit Salzen oder Detergenzien beladen sind, bzw. Mischungen aus einer großen Anzahl an Peptiden vorliegen, muss eine vorherige Aufreinigung durchgeführt

werden. Eine einfache Methode zur Trennung sind ZipTips™ (Millipore Corporation, USA). Bei diesen handelt es sich um Pipettenspitzen, in denen sich ein Filter aus C18-Material (auch C4-Material für Proteine) in der Spitze befindet. Das Filtermaterial ist ein Polymer, an dessen Oberfläche sich die hydrophoben Seitengruppen von Peptiden bevorzugt anlagern.

Salze und Detergenzien sind sehr gut wasserlöslich, so daß diese in einer reinen Wasserumgebung nicht an dem Material des Filters haften bleiben und ausgewaschen werden.

In einer reinen Wasserumgebung bleiben dagegen alle Peptide an der Oberfläche haften, erst wenn sich der Anteil des hydrophoben Lösungsmittels erhöht, ist die Bindungskonstante für die Peptide zu klein und die Peptide lösen sich im Lösungsmittel. Dies wird durch Spülen mit einer Elutionslösung aus 50 % Acetonitril und 50 % Wasser erreicht. Anschließend wird die mit Peptiden angereicherte Elutionslösung zur üblichen Präparation verwendet.

Häufig ist bei Protein-Verdauen die Anzahl verschiedener Peptide zu hoch, so daß eine Fraktionierung notwendig ist. Dies kann erreicht werden, indem nicht in einer Stufe, sondern in mehreren Schritten der Acetonitril-Gehalt erhöht wird. Von jeder einzelnen Elution kann später ein MALDI-Massenspektrum aufgenommen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Peptide

Die Proben, die zur Analyse verwendet wurden, stammen aus verschiedenen Quellen. Zum Aufbau der Peptid-Datenbank wurden synthetische Peptide eingesetzt, die zum Teil gekauft wurden (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) oder im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ, Universität Düsseldorf) von Dr. Ralf Hoffmann und Carsten Böhnke synthetisiert wurden. Eine vollständige Liste aller Peptide mit Bezeichnung, Sequenz, Molekulargewicht und Herkunft ist im Anhang (Seite 162) aufgeführt.

Neben den synthetischen Peptiden wurden auch Proben aus Protein-Verdaus verwendet. Die Proteine wurden mit Trypsin oder Chymotrypsin (jeweils von Sigma) verdaut und anschließend mit ZipTips Pipettenspitzen (C18, Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt. Die eluierten Fraktionen wurden mit der dried-droplet Methode mit DHB (10 µg/µl in Wasser) auf dem MALDI-Target präpariert (typischerweise 0,5 µl DHB-Stammlösung + 0,25 µl Analyt-Lösung).

3.2 MALDI-Massenspektrometer

Die MALDI-Massenspektren in dieser Arbeit wurden an dem im Institut für Lasermedizin der Universität Düsseldorf entwickelten Flugzeit-Massenspektrometer ALADIM 1 (*Advanced Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometer*) durchgeführt [57][107]. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein UV-MALDI Massenspektrometer mit einem Stickstofflaser. Neben der mehrstufigen Ionenquelle mit verzögerter Extraktion (*delayed extraction DE*) wird ein zweistufigen Reflektor zur Zeit-Fokussierung und für die Aufnahme von PSD-MALDI Massenspektren [55] eingesetzt.

Ionen können sowohl in einem linearen Modus mit einem MSP-Detektor (*micro sphere plate*) hinter dem Reflektor in 1,4 m Entfernung von der Ionenquelle, als auch im Reflektor-Modus nach etwa 2,3 m Driftstrecke mit einem Hybrid-Detektor nachgewiesen werden. Bei dem Hybrid-Detektor erzeugen Ionen auf einer Konversionsdynode Sekundärelektronen, die beschleunigt werden und durch ein Magnetfeld, welches von außerhalb des Vakuums befindlichen Spulen erzeugt wird, auf einen rechtwinklig zur Konversionsdynode befindlichen MCP-Detektor umgelenkt werden.

Eine Besonderheit des ALADIM 1 ist der vollständig koaxiale Aufbau. Der Laserpuls (N₂ Laser Modell ND 337, Laser Science, Cambridge, MA, USA) fällt durch einen durchbohrten Spiegel und Linse senkrecht auf die Probe und wird dort fokussiert. Dadurch entsteht eine Ionenwolke, die sich symmetrisch zu der senkrecht auf der Probenoberfläche stehenden Achse ausbreitet. Die Ionen werden durch die Elektroden mit verzögerter Ionen-Extraktion extrahiert und gelangen durch die Bohrung der optischen Elemente auf die

Driftstrecke. Der Reflektor läßt die Ionen umkehren und auf die Konversionsdynode treffen.

Direkt hinter der Ionenquelle befindet sich ein Ion-Gate, deren Drähte mit zwei Push-Pull Hochspannungsschaltern (HTS 31 PGSM, Behlke) mit einer Pulsdauer $T \geq 80$ ns und Spannungen bis maximal etwa ± 1400 V geschaltet werden können.

Die Spannung in der Ionenquelle beträgt auf der Probe etwa 20 kV. Die erste Blende wird mit einem Hochspannungsschalter (HTS 30, Behlke) zwischen 20 kV und etwa 18 kV für die verzögerte Ionen-Extraktion geschaltet. Die Zeitsteuerung der Schalter wird über einen Delay-Generator (DG 535, Scientific Instruments) durchgeführt. Die Hochspannungen des Reflektors können für die PSD-Analyse über den Meßrechner mit Hilfe eines Digital/Analog-Wandlers (Probus III, FUG) an der IEC-Bus Schnittstelle eingestellt werden. Die Datenaufnahme geschieht durch die zeitliche Aufzeichnung der Detektor-Signale mit einem digitalen Oszilloskop (Modell 9384; 1 GSample; 4 Datenkanäle, LeCroy, Chestnut Ridge, NY, USA). Die Daten werden über die IEC-Bus Schnittstelle auf den Messrechner übertragen.

3.3 Qstar ESI-Massenspektrometer

Für die Aufnahme der Elektrospray-Ionisations Massenspektren wurde das „Qstar“ der Firma Applied-Biosystems (Framingham, MA, USA) verwendet. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Hybrid-Massenspektrometer mit zwei Quadrupol-Filtern und einem Reflektor-Flugzeit-Analysator. Im ersten Quadrupol kann eine Selektion eines Ions ausgeführt werden, welches im zweiten Quadrupol durch ein Stoss-Gas fragmentiert wird. Die Massenanalyse erfolgt im Flugzeit-Massenspektrometer [88].

3.4 Verwendete Software

3.4.1 PEPSEQ

Mit der Software PEPSEQ [110][55] können die Originaldaten eines PSD-Spektrums, die mit ULISSES aufgezeichnet werden, zu einem kombinierten Fragment-Ionen-Spektrum zusammengesetzt werden. Dazu wird in ULISSES in den Einzelspektren eine Kalibrierung der Fragment-Ionen-Massen durchgeführt und in der Datei gespeichert. In PEPSEQ wird eine komplette Serie von Einzelspektren, die den gesamten Massenbereich der Fragment-Ionen eines Mutter-Ions abdecken, geladen und grafisch dargestellt. Die Schnittstellen der überlappenden Massenbereiche in den Einzelspektren können entweder manuell oder automatisch gesetzt werden. Auf diese Weise kann eine einzige Datei für das gesamte Fragment-Ionen-Spektrum mit der Massen-Kalibrierung der Fragment-Ionen erzeugt und weiterverarbeitet werden.

Neben diesem Zusammensetzen der PSD-Spektren bietet PEPSEQ noch Funktionen zur Auswertung der Spektren an. Insbesondere gibt es eine Funktion zum Darstellen und Ausdrucken von Fragment-Ionen-Listen von Peptiden, auf denen sämtliche Einfach- und Mehrfachbrüche angegeben werden.

3.4.2 ULISSES

Das MS-DOS-Programm ULISSES (*Universal Laser Ionisation Spectrometry System's Evaluation Software*) (aktuelle Version 7.3) wird zur Datenaufnahme und ersten Auswertung der MALDI-Massenspektren verwendet. Das Programm wurde von B. Spengler entwickelt. Mit ULISSES kann das digitale Oszilloskop initialisiert und ausgelesen werden, sowie der Laser, über eine im Rechner befindliche digital IO-Karte, getriggert werden. Zusätzlich kann für die Aufnahme von Fragment-Ionen-Spektren der DA-Wandler für die Reflektor-Spannungen (FUG PROBUS III) angesteuert werden.

Mit dem Programm wird die Massen-Kalibrierung sowohl für stabile Ionen, als auch für PSD-Fragment-Ionen durchgeführt und in den Dateien gespeichert.

3.4.3 BioMultiview™

Bei der Software BioMultiview™ (Sciex, Toronto, Canada) handelt es sich um eine Auswertesoftware für Elektrospray-Massenspektrometer. Von den zahlreichen Funktionen wurde insbesondere die *Hypermass* Funktion verwendet. Mit dieser Funktion werden die hochgeladenen Peak-Cluster der ESI-Massenspektren zu einfach geladenen Massen hochgerechnet. Vor der Berechnung wird die Massengenauigkeit eingegeben (typisch 1 u) und die Gewichtung der Massenbereiche durch eine einhüllende Kurve definiert. In Kapitel 4.2 ist ein Vergleich der *Hypermass* Funktion mit dem dort entwickelten Algorithmus zu sehen.

Das Programm bietet die Möglichkeit Spektren in einem ASCII-Format abzulegen, so daß die Daten mit anderen Anwendungen (z. B. ORIGIN, ISOCONV) weiterverarbeitet werden können.

3.4.4 MICROCAL ORIGIN™

Zur Datenauswertung wurde MICROCAL ORIGIN™ Version 4.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA). verwendet. Die Fit-Funktionen basieren auf einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus. Die hier angegebenen Fehler der Näherung sind die von Origin angegebenen Werte. Die Fit-Operation wurde immer so oft wiederholt, bis sich die Abweichung (χ^2) nicht mehr geändert hat. χ^2 ist definiert als die Summe der quadratischen Abweichungen zwischen Datenpunkten und Näherungsfunktion.

3.5 Neu entwickelte Software

Der Großteil der Software wurde mit Borland Delphi 3.0 unter Windows 95/NT entwickelt. Dies gilt insbesondere für die Entfaltungsprozedur, sowie für die Software zur Erfassung und Bearbeitung der Fragment-Ionen-Spektren. Aus Gründen der Rechengeschwindigkeit wurden die aufwendigeren Berechnungen, wie die Bestimmung der Isotopenmuster aller Aminosäure-Kombinationen, mit Hilfe von C-Programmen durchgeführt.

3.5.1 ISOCONV

Für den in Kapitel 4.2 beschriebenen Algorithmus wurde das Programm ISOCONV entwickelt (Bild 3-1). Über die Buttons können die Ein- und Ausgabedateien ausgewählt, sowie die Berechnungen gestartet werden. Weitere Parameter lassen sich direkt in den Eingabefeldern einstellen.

Mit *Source-File* wird die Eingabedatei angegeben. Das Dateiformat darf entweder eine ULISSES oder PepSeq Binärdatei sein oder eine ASCII-Textdatei mit zwei durch Tabulatoren getrennten Spalten (Masse, Intensität). Unter *Destination File* wird der Name der Ausgabedateien angegeben, wobei durch die einzelnen Schritte noch individuelle Erweiterungen angehängt werden. *Pattern File* gibt die Definition der gemittelten Isotopenmuster an. Im Bereich *Spectrum Parameter* wird der Massenbereich und die höchste erwartete Ladung (für ESI-Massenspektren) angegeben. Zusätzlich wird dort ausgewählt, ob ein Untergrundsignal abgezogen werden soll. Im Bereich *Deconvolution Parameter* werden die relativen Schwankungsbereiche der Intensitäten der Isotopenmuster in Prozent angegeben. Die Schwankung des n-ten Isotopenpeaks ist $(Intensity\ Tolerance) + (n-2) * (Error\ Growth)$. Der Parameter *Accuracy* gibt an, in welches Massenraster die Einzelspektren der Einzelladungen zusammengefaßt werden sollten (siehe Kapitel 4.4.1).

Mit *Run* wird der Isoconv Algorithmus gestartet. Die Buttons am unteren Fensterrand werden für die Abschätzung der Schwefelanzahl eines Peptids (*Guess Sulfur*), die Bildung von Produktspektren (*Produkt*) (Kapitel 3.6.2), und die Speicherung der Originalspektren als Textdatei mit (*Background*) und ohne (*Save Source*) Untergrundabzug, verwendet.

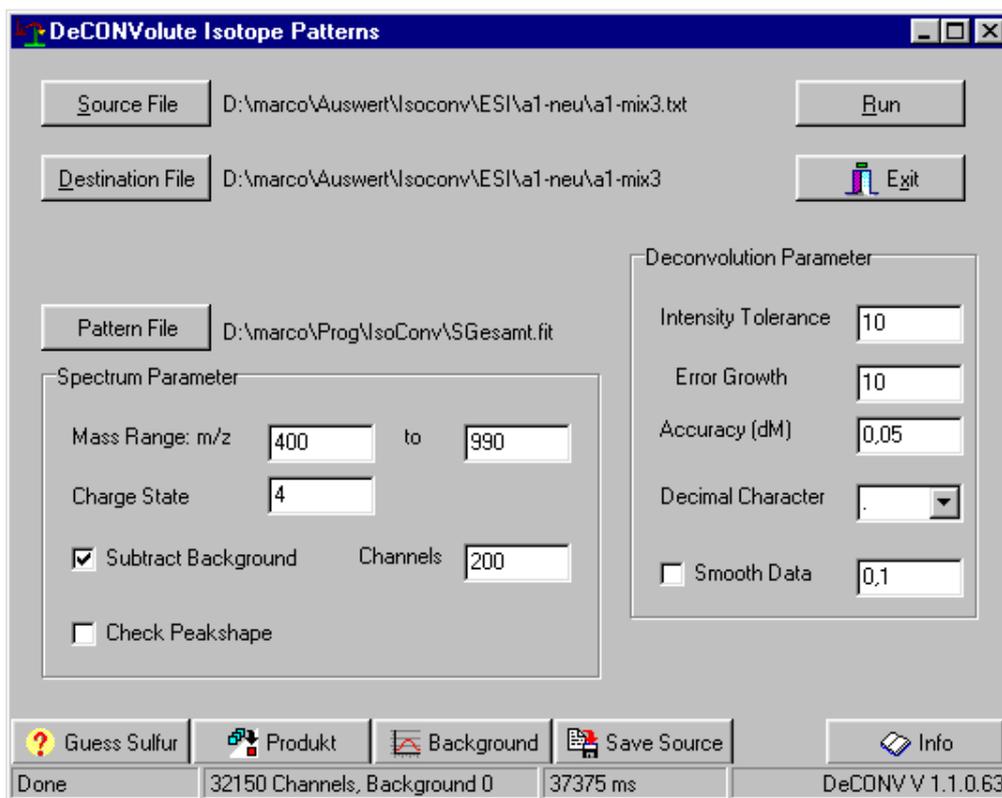


Bild 3-1: Bildschirmausschnitt der Benutzeroberfläche des Programms ISOCONV

3.5.2 ISOTOPE

Mit der Delphi-Entwicklungsumgebung lassen sich zwar unter Windows relativ leicht Bedieneroberflächen entwickeln, allerdings ist die Rechenleistung der Prozeduren durch das objektorientierte Design beschränkt. Aus diesem Grund wurden die rechenaufwendigen, numerischen Prozeduren mit Hilfe von C-Programmen realisiert. Die Programme sind in Standard-C gehalten und wurden mit GNU-C (GCC Version 2.7.2.1 auf Windows 95/NT) compiliert. Es handelt sich hier um zwei Programme, die jeweils über Kommandozeilen-Parameter bedient werden.

3.5.2.1 ISOTOPE

Wie der Name bereits aussagt, dient das Programm ISOTOPE zur Berechnung von Isotopenmustern. Hierbei ist dieses Programm speziell auf Peptide, bzw. die Atome, die in organischen Molekülen vorkommen (C, H, N, O, S, P), beschränkt. Insgesamt sind maximal 6 Atomsorten und ihre Isotope zur Berechnung vorgesehen, wobei sich dies leicht erweitern läßt. Darüber hinaus liegt eine Tabelle der Aminosäuren und ihrer atomaren Zusammensetzung vor, so daß über die Eingabe einer Peptid-Sequenz ebenfalls ein Isotopenmuster und die Molekül-Ionen-Masse bestimmt werden können.

Neben der Funktion einer einzelnen Berechnung des Isotopenmusters aus Summenformel oder Sequenz bietet ISOTOPE eine Routine zur kombinatorischen Bestimmung sämtlicher Aminosäure-Kombinationen in einem Massenintervall. Als ein Nebeneffekt dieser Routine werden alle Aminosäure-Kombinationen mit einer Masse unterhalb des Massenintervalls

ermittelt. Diese können in einem Histogramm mit vorgegebener Massengenauigkeit summiert werden.

Als Ausgabe des Programms erfolgt die Speicherung aller Aminosäure-Kombinationen einzeln in einer Datei. Optional können die Isotopenmuster und Peptidmassen berechnet und ebenfalls gespeichert werden. Diese Daten werden anschließend weiterverarbeitet.

Die Kommandozeilen-Parameter zur Berechnung des Isotopenmusters einer Einzelverbindung sind:

- m masse für eine Einzelmasse
- s Summenformel für eine Atomzusammensetzung
- p Sequenz für eine Peptid-Sequenz

Folgende zwei Beispiele sollen den Aufruf des Programmes verdeutlichen. Bei dem Schalter `-s` wird eine Summenformel erwartet, wobei keine Leerzeichen enthalten sein dürfen. Der Schalter `-p` benötigt eine Sequenz im Single-Letter-Code für die Aminosäuren. Alle Buchstaben für Sequenzen oder Summenformeln müssen als Großbuchstaben eingegeben werden.

```
E:\Prog\CQUELL\isoprogs>ISOTOPE -s C6H12
# monoisotopic Mass [M] =      84.094 u
# C 6 H 12
#Nr.   Int      Int/100%
0      0.933029   100.000000
1      0.065032    6.970007
2      0.001907    0.204472
3      0.000030    0.003254
4      0.000000    0.000030
5      0.000000    0.000000
6      0.000000    0.000000

Fertig. Dauer      0.0 sec
```

```
E:\Prog\CQUELL\isoprogs>ISOTOPE -p YGGFM
# Sequenz = YGGFM
# monoisotopic Mass [M] =      573.227 u
# C 27 H 35 N 5 O 7 S 1
#Nr.   Int      Int/100%
0      0.673639   100.000000
1      0.228985   33.992334
2      0.076691   11.384693
3      0.017020    2.526650
4      0.002883    0.427994
5      0.000394    0.058549
6      0.000045    0.006737

Fertig. Dauer      0.0 sec
```

Zur Berechnung der Gesamtzahl der Peptide bis zur angegebenen Masse, bzw. innerhalb eines Massenintervalls wird der Schalter „-allxxx masse deltam“ verwendet. Der Parameter

„masse“ stellt die Maximalmasse, bis zu der die Kombinationen berechnet werden dar, „deltam“ hat verschiedene Bedeutungen, abhängig von den Funktionen, die bei xxx eingestellt werden. Es gibt insgesamt drei Routinen, die alle beliebig miteinander kombiniert werden dürfen:

xxx=

- h Ausgabe eines Histogramms mit der Intervall-Breite Δm bis zu der angegebenen Masse. Es werden maximal 10000 Kanäle gespeichert, so daß bei großen Massen nach unten nur ein Teil des Massenbereichs summiert wird. Die Ausgabe erfolgt in die Datei `hist.txt`
- s Es wird eine Datei `out.txt` erzeugt, in der alle Peptid-Summenformeln stehen, die im Intervall $masse \pm \Delta m$ liegen.
- i Zu jeder Peptid-Summenformel die im Massenintervall $masse \pm \Delta m$ liegt, wird das Isotopenmuster berechnet und gemeinsam mit der monoisotopischen Masse und der Peptid-Summenformel, sowie der Atom-Summenformel in der Datei `iso.txt` gespeichert.

Es wird bei keinem Parameter geprüft, ob die jeweilige Ausgabedatei bereits existiert. Eine bereits bestehende Datei wird ohne Prüfung überschrieben.

3.5.2.2 ISOSTAT

Das Programm ISOSTAT dient ausschließlich dazu, die Ausgabedateien von ISOTOPE, in denen eine vollständige Liste der Isotopenmuster eines Massenintervalls gespeichert ist, statistisch zu untersuchen. Die Eingabedatei heißt immer `iso.txt` und muss im aktuellen Ordner liegen. Die Ausgabedatei wird `stat.txt` genannt.

Die einzelnen Isotopenpeaks werden nach der Peakhöhe sortiert und in ein 0,01% Intervall-Raster summiert. Daraus ergibt sich eine Häufigkeitsverteilung der Isotopen-Intensitäten für die in der Eingabedatei vorkommenden Peptide.

Das Programm ISOSTAT benötigt keinerlei Parameter und setzt nur das Vorhandensein einer Datei `iso.txt` im richtigen Format voraus (welches von ISOTOPE geliefert wird). Die Ausgabedatei wird ohne Überprüfung überschrieben, falls sie bereits existiert.

3.6 Allgemeine Algorithmen

3.6.1 Identifikation von Peaks

Um als Peak erkannt zu werden, müssen mehrere Kriterien erfüllt werden, die nacheinander geprüft werden. Wird ein Kriterium nicht erreicht, wird die Masse verworfen.

Die zur Peak-Identifikation benötigten Parameter sind: eine Intensitätsschwelle, oberhalb der ein Signal mindestens liegen muss, die Höhe des Untergrundes (UG), sowie die erwartete minimale (MinRes) und maximale (MaxRes) Auflösung des Peaks, aus denen die Peak-Breite ΔM abhängig von der Masse berechnet werden kann.

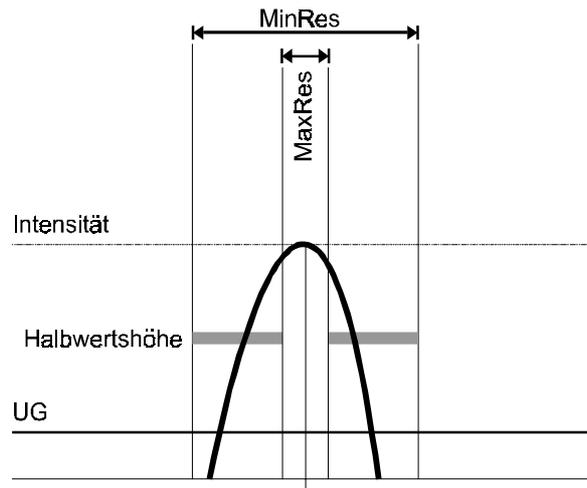


Bild 3-2: Schematische Darstellung der Peak-Identifikation. Der Peak muß auf der Halbwertshöhe die grauen Balken berühren, damit die Auflösung im zulässigen Bereich liegt.

Zunächst muss in der Intensitätsskala des Spektrums bei der Masse M ein lokales Maximum vorliegen (d. h. die Intensitäten der benachbarten Datenkanäle sind kleiner), welches größer als die vorgegebene Intensitätsschwelle ist. Schwankungen der Intensität durch Rauschen müssen gegebenenfalls vorher geglättet werden. Anschließend wird geprüft, ob die Halbwerts-Breite zwischen Peakintensität (Intensität) und Untergrund (UG) eine Massenauflösung ergibt, die im zulässigen Bereich liegt. Ist die Halbwerts-Breite zu groß, ist der Peak nicht gut genug aufgelöst; ist sie zu klein, handelt es sich nicht um einen Peak, sondern um ein Rausch-Signal. Dies ist in Bild 3-2 schematisch dargestellt. Hier muss der Peak auf der Halbwertshöhe die grauen Balken auf der linken und rechten Seite berühren.

3.6.2 Vergleich mit experimentellen Spektren

Um zwei experimentelle Spektren miteinander vergleichen zu können, oder um ein theoretisches Spektrum mit einem experimentellen Spektrum zu vergleichen, muss eine Vergleichsmethode entwickelt werden, die eine Art Bewertungszahl für die Qualität des Vergleichs liefert. Für den Vergleich wurden zwei Ansätze erprobt:

- Bildung der Differenz
- Bildung der Schnittfläche

Beide Ansätze haben unterschiedliche Eigenschaften, die im folgenden kurz beschrieben werden. In jedem Fall werden zunächst die zwei zu vergleichenden Spektren, die mit $A(m)$ und $B(m)$ bezeichnet werden, auf die Gesamtfläche 1 normiert.

3.6.2.1 Differenzspektren

Bei der Differenzbildung werden beide Spektren bei gleichen Massen voneinander abgezogen und der Betrag dieser Differenz wird über alle Massen summiert. Die Bewertungszahl ist damit:

$$\text{BEW} = \int_m |A(m) - B(m)| .$$

Durch die Normierung auf gleiche Gesamtfläche heben sich Signale, die in beiden Spektren mit gleicher Intensität vorkommen auf, während bei dem Fehlen des Signals in einem der beiden Spektren ein großer Beitrag geliefert wird. Hat man zwei identische Spektren, ist die Differenz an jeder Stelle 0 und damit die Bewertungszahl ebenfalls 0, während bei zwei völlig verschiedenen Spektren die Bewertungszahl maximal die Summe der Einzelflächen der Spektren ist ($BEW = 2$).

3.6.2.2 Schnittfläche von Spektren

Bei der Bildung der Schnittfläche werden die Intensitäten beider Spektren bei gleichen Massen miteinander multipliziert und dieses Produkt über alle Massen summiert. Hier kann noch verallgemeinert werden, indem die Signale des einen Spektrums um eine beliebige Massenverschiebung Δm verschoben mit dem anderen Spektrum multipliziert werden. Daraus ergibt sich eine Art Faltungsfunktion:

$$F(\Delta m) = \int_m \sqrt{A(m) * B(m+\Delta m)}$$

Bei einer mathematischen Faltungsfunktion wird allerdings die verschobene Funktion zusätzlich gespiegelt, das heißt, es ergibt sich statt dessen $B(\Delta m - m)$. Dadurch wird noch die Achsensymmetrie und Periodizität der Funktionen getestet. Da Massen allerdings immer positiv sind liefert eine Spiegelung keine zusätzlichen Informationen.

Die Verschiebung um eine Massendifferenz Δm kann sinnvoll sein, wenn die Massenkalisierung der zwei Spektren nicht genau übereinstimmt. Wichtiger ist aber die Möglichkeit dadurch Addukte zu identifizieren. Hierzu bietet sich auch die Bildung eines Produktspektrums an. Wird auf die Integration verzichtet und das Spektrum

$$P(m, \Delta m) = A(m) * B(m + \Delta m)$$

erzeugt, entsteht ein Spektrum $P(m, \Delta m)$ in dem nur dort Peaks auftreten, wo sowohl in Spektrum A bei der Masse m als auch in Spektrum B bei der Masse $m + \Delta m$ ein Signal vorliegt.

Wird dies auf ein Spektrum angewendet, das heißt $B=A$, läßt sich zum Beispiel mit $P(m, \Delta m = 22 \text{ u})$ ein Spektrum der Ionen darstellen, die neben einem protonierten Ion auch ein Natrium-Ion bilden. Bei einer Faltungsfunktion ist im Gegensatz zur Differenzbildung die Funktion maximal, wenn die Übereinstimmung am Größten ist. Die Werte liegen hier zwischen 0 und 1.

4 Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse dieser Arbeit präsentiert. Ein Schwerpunkt ist die Untersuchung von Strukturen, wie Isotopen-Häufigkeiten bei Peptiden, bei PSD-MALDI und MALDI Massenspektrometrie. Um diese Strukturen untersuchen zu können, mußte zunächst sichergestellt werden, wie stark sich die Spektren durch die Parameter des Experiments beeinflussen lassen (Kapitel 4.1).

Das Vorhandensein von Isotopenmustern in Massenspektren von Molekülen erschwert die Interpretation, da Masseninterferenzen zwischen Isotopen verschiedener Moleküle zu Fehlinterpretationen führen können. Daher wurde den Isotopenmustern von Peptiden in Kapitel 4.2 Aufmerksamkeit geschenkt. Mit den dort erlangten allgemeinen Erkenntnissen über Isotopenmuster von Peptiden wurde in Kapitel 4.3 ein Algorithmus zur Filterung der Isotopenmuster entwickelt und auf MALDI Massenspektren angewendet. Im Laufe der Arbeit an dieser Methode zeigte sich eine Erweiterungsmöglichkeit auf Elektrospray-Ionisations Massenspektren, bei denen Mehrfachladungen berücksichtigt werden müssen. Diese Erweiterung und ihre Anwendungen sind in Kapitel 4.4 zu finden. Ein besonderer Vorteil der Methode ist hierbei die Möglichkeit, die Fragment-Ionen-Spektren auch von höher geladenen Peptiden ($q > 2$) übersichtlich zu studieren und zusätzlich nach Ladungszustand zu trennen.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel für den Filteralgorithmus wird in Kapitel 4.2 vorgestellt. In dem dort beschriebenen Scan des Ion-Gate werden alle Einzelspektren mit dem Filteralgorithmus behandelt, um ausschließlich die monoisotopischen Massen von Peptiden zu speichern. Diese Kombination aus Isotopen-Filterung und Peak-Erkennung führt zu einer Reduzierung der Daten auf das Wesentliche, nämlich die Massen und Intensitäten von in der Probe enthaltenen Peptiden.

4.1 Untersuchung der experimentellen Einflüsse auf die Desorption und Fragmentierung von Peptiden

Die experimentellen Rahmenbedingungen spielen bei der Bewertung eines Massenspektrums eine grosse Rolle. Das Ergebnis der Analyse einer Probe kann durch verschiedene Parameter, wie z. B. Bestrahlungsstärke des Lasers, eingestellten Beschleunigungsspannungen in der Ionenquelle, Pulszeiten bei verzögerter Ionen-Extraktion oder die verwendete Matrix bei MALDI-MS, beeinflusst oder verändert werden. Da MALDI-PSD-Massenspektren verschiedener Peptide miteinander verglichen werden sollen, ist es unerlässlich, diese Parameter so weit wie möglich zu verstehen. In diesem Kapitel werden zwei Gruppen von Einflüssen unterschieden: Ein Bereich sind die instrumentellen Einflüsse (Kapitel 4.1.1), welche vor allem durch die Bestrahlungsstärke des Desorptions-Lasers und durch die Beschleunigungsspannungen in der Ionenquelle gegeben sind. Den zweiten Bereich machen die probenspezifischen Einflüsse aus (Kapitel 4.1.2). Diese sind als Präparations-Parameter ebenso maßgebend, wie die verwendete Matrix und Präparations-Methode. Des weiteren sind gegenseitige Beeinflussungen der

Ionisierungs-Intensitäten verschiedener Analyt-Moleküle festzustellen. Hierzu sei auch auf das Beispiel in Kapitel 4.5.8 verwiesen.

4.1.1 Instrumentelle Einflüsse auf MALDI-PSD

4.1.1.1 Verlauf der Bestrahlungsstärke

Mit Hilfe eines pyroelektrischen Detektors kann die Bestrahlungsstärke des Stickstofflasers außerhalb des Massenspektrometers gemessen werden. Für eine Messung innerhalb des Massenspektrometers direkt auf der Probenebene reicht die Nachweisempfindlichkeit des pyroelektrischen Detektors nicht aus. Darüber hinaus ist eine genaue Fixierung des Detektors in der Probenebene aus Platzgründen nicht möglich. Die Bestrahlungsstärke wird über einen Abschwächer durch den Aufttrittswinkel eingestellt. Der an der Oberfläche reflektierte Anteil geht verloren, und ein Teil des Lichts geht ohne nennenswerten Strahlversatz gradlinig durch den Abschwächer. In Bild 4-1 ist die Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke vom Drehwinkel des Abschwächers dargestellt. Bei senkrechtem Einfall ist die Transmission maximal und nimmt mit zunehmendem Drehwinkel ab. Die Transmission läßt sich näherungsweise über

$$I(\alpha) = A \cos^2(\alpha)$$

beschreiben. Die Bestrahlungsstärke, ab der bei einer DHB-Probe Ionen nachweisbar sind, ist durch eine waagerechte Linie gekennzeichnet und liegt bei 1058 Jm^{-2} . Hierfür ist ein Durchmesser des Laserfokus auf der Probe von $100 \mu\text{m}$ bestimmt worden.

Zur Bestimmung des Durchmessers des Laserfokus wurde der amorphe Bereich einer DHB-Probe mit intensiven Laserpulsen bestrahlt, so daß sichtbar Material abgetragen wird. Anschließend wurde unter einem Mikroskop der Durchmesser der „Löcher“ mit $100 \mu\text{m}$ bestimmt. Dieser Wert muss als Obergrenze für den Durchmesser angesehen werden, da das Erzeugen von Löchern ein stark nichtlinearer Prozess ist, der die (als gaussförmig angenommene) Intensitätsverteilung des Strahles nicht gut abbildet.

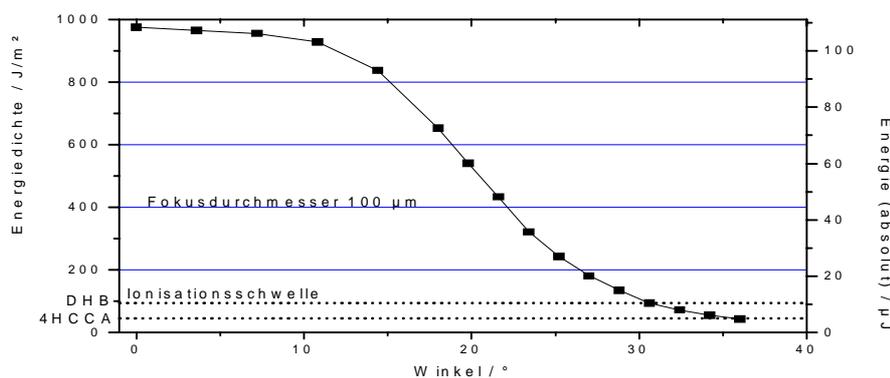


Bild 4-1: Transmission des Lasers hinter dem Abschwächer als Energiedichte (J/cm^2) für einen geschätzten Fokus-Durchmesser von $100 \mu\text{m}$ und als absolute Energie (rechte Achse)

Für die Abschätzung der Bestrahlungsstärke auf der Probenoberfläche sind die Oberflächenverluste an Linsen und Spiegeln noch nicht berücksichtigt. Man kann von 5 % Verlust an jeder Oberfläche ausgehen (6 Grenzflächen). Der Verlust am Umlenkspiegel

und an dem teildurchlässigen Spiegel für die Zusammenführung von Laser und Beobachtungsoptik liegt bei je etwa 50 %. Die Verluste durch die durchbohrte Linse und den Spiegel in der Ionenquelle reduzieren die gesamte deponierte Energiemenge. Insgesamt werden etwa 50 % der Energie von der Bohrung abgeschattet, da das Intensitätsmaximum im abgeschatteten Bereich liegt. Insgesamt folgt aus allen Faktoren eine Transmission von etwa 9 – 10 %. Dadurch ergibt sich mit einem Laserfokus von 100 μm für DHB-Kristalle eine Ionisationsschwelle von 97 Jm^{-2} und für 4HCCA eine Schwelle von etwa 50 Jm^{-2} .

Nach den Untersuchungen von Dreisewerd [40] ist die Ionisationsschwelle von der bestrahlten Fläche auf der Probe abhängig. Daher wird bei kleinerem Laserfokus die notwendige Energiedichte zunehmen und die benötigte deponierte Energie abnehmen. Legt man diese Ergebnisse für DHB zugrunde, ist die Ionisationsschwelle bei 100 μm Laserdurchmesser hier zu klein. Dies hängt damit zusammen, daß dieser Wert eine Obergrenze darstellt. Der tatsächliche Fokus-Durchmesser liegt zwischen 60 μm und 100 μm .

Da die tatsächliche Energiedichte durch die Unsicherheit bei der Bestimmung des Fokus-Durchmessers nicht exakt bestimmt werden konnte, wird in den folgenden Abschnitten für die Pulsenergie des Lasers immer die relative Energiedichte angegeben. Diese ergibt sich als Verhältnis aus der in Bild 4-1 dargestellten Energiedichte und der Ionisationsschwelle $E_{\text{S/Matrix}}$ ergibt. Dabei ist die Ionisationsschwelle immer abhängig von der verwendeten Matrix. Diese „qualitative“ Bestrahlungsstärke ist bei gleicher Konfiguration unabhängig vom Fokus-Durchmesser.

4.1.1.2 Bestrahlungsparameter des Lasers

Hier soll untersucht werden, wie sich die verschiedenen Bestrahlungsstärken auf die Signalintensität und auch auf die Fragmentierung auswirken. Zum direkten Vergleich verschiedener Massenspektren ist es notwendig den Einfluß der Variation der Bestrahlungsstärke abschätzen zu können. Es ist nur schwer möglich Massenspektren einer größeren Zahl verschiedener Peptide über einen längeren Zeitraum mit gleichbleibender Bestrahlungsstärke aufzunehmen. In dieser Auswertung wird der Einfluß der Fragmentierungs-Rate auf das Muster der Fragment-Ionen untersucht.

Bild 4-2 zeigt den relativen Anteil der neutralen Fragmente an der Gesamtintensität für ein Peptid ($\text{AIGEFYGR-OH (M+H)}^+ = 954,5 \text{ u}$) abhängig von der deponierten Laserenergie. Als Matrix wurde DHB verwendet und die Ionen wurden mit verzögerter Ionen-Extraktion beschleunigt. Die Messungen wurden mit dem linearen Detektor des ALADIM 1 durchgeführt (siehe [57][107]), wobei die neutralen Fragmente durch ein konstantes Bremsfeld im Reflektor von den geladenen Ionen getrennt werden. Die Sättigung des Verhältnisses oberhalb der 4-fachen Energiedichte der Schwelle ist auf eine Sättigung des Detektorsignals, sowohl für neutrale Fragmente als auch für die Ionen, zurückzuführen. Die Intensitäten der Einzel-Peaks sind in Bild 4-2(b) dargestellt. Der Anteil der neutralen Moleküle $[\text{I}^0]$ berechnet sich aus

$$[\text{I}^0] = \frac{[\text{M}^0]}{[(\text{M+H})^+] + [\text{M}^0]},$$

wobei $[M^0]$ und $[(M+H)^+]$ die gemessenen Intensitäten der neutralen Fragmente und der geladenen Molekül-Ionen sind.

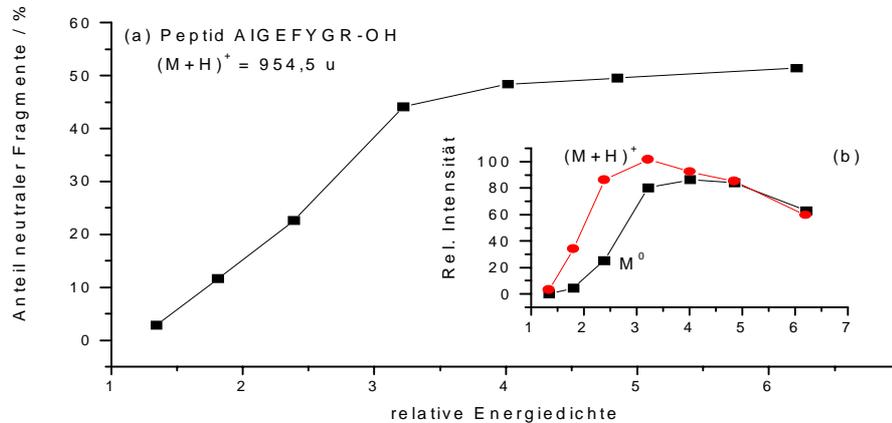


Bild 4-2: Abhängigkeit der Signalintensität von der relativen Energiedichte. (a) Anteil der neutralen Fragmente an der Gesamtintensität, für das Peptid AIGEFYGR-OH ($(M+H)^+ = 954,5$ u). (b) Relative Intensitäten der Einzelsignale von Molekül-Ion ($(M+H)^+$) und neutralen Fragmenten (M^0)

Nach einem unimolekularen Fragmentierungs-Modell zerfallen die Moleküle mit konstanten Zerfallsraten k nach einem Exponentialgesetz, wobei sich die Raten abhängig von der eingebrachten inneren Energie verändern. Im einfachsten Fall gilt $k \sim E_i - E_0$, wenn die innere Energie E_i größer als die Bindungsenergie E_0 ist. Da bei größerer Bestrahlungsstärke des Lasers eine höhere Energie in der gleichen Probenfläche deponiert wird, steigt die Rate k an. Jedoch besitzen die verschiedenen Bruchstellen des Peptids alle ähnliche Bindungsenergien [93], so daß die Variation der Fragmentierungs-Raten kleiner als die statistische Schwankung der detektierten Intensitäten ist. Wäre dies nicht der Fall, dürfte man Fragment-Ionen-Spektren verschiedener Peptide nur bei exakt gleichen Bestrahlungsbedingungen miteinander vergleichen.

Bei dem Experiment aus Bild 4-2 wurde die Gesamtrate gemessen, da nicht nach einzelnen Fragmenten unterschieden wurde. Diese ändert sich mit der Bestrahlungsstärke. Die Rate k läßt sich aus

$$\frac{I}{I_{\text{Ges}}} = 1 - e^{-kt}$$

bestimmen, indem nach k aufgelöst wird. Daraus erhält man für die Rate

$$k = -\log\left(1 - \frac{I}{I_{\text{Ges}}}\right) \frac{1}{t}$$

I/I_{Ges} ist der Anteil der neutralen Fragmente und t ist die Flugzeit bis zum Eintreten in den Reflektor, da bis zu diesem Zeitpunkt Fragmentierungen zum Signal beitragen können. Die Flugzeit kann aus der detektierten Flugzeit bestimmt werden und beträgt hier $24,11 \mu\text{s}$. Die Raten liegen zwischen 1200 s^{-1} und 27400 s^{-1} (Tabelle 4-1), wobei die letzten zwei Werte aus Bild 4-2 nicht berücksichtigt werden, da die Signalintensitäten bereits gesättigt sind.

Tabelle 4-1: Zerfallsraten für das Peptid AIGEFYGR-OH ($(M+H)^+ = 954,5$ u) bei variierender Bestrahlungsstärke des Lasers.

<i>Bestrahlungsstärke (rel. Einheiten)</i>	<i>Zerfallsrate 1/s</i>
1,34	1202
1,81	5159
2,39	10642
3,22	24133
4,02	27423
4,85	28397
6,21	29954

In [53] wird die Zerfallsrate mit einer ähnlichen Methode bestimmt. Allerdings werden dort nicht die Bestrahlungsstärke des Lasers, sondern der Restgasdruck im Massenspektrometer und die Beschleunigungsspannung der Ionen variiert. Aus der Variation des Druckes wird dort die Fragmentierungs-Rate bei totalem Vakuum (Druck = 0) extrapoliert. Es ergibt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Fragmentierungs-Rate und Feldstärke.

Im hier beschriebenen Experiment liegen andere Bedingungen vor, da die Ionen mit verzögerter Ionen-Extraktion beschleunigt werden. Dadurch ist die Fragmentierungs-Rate nur noch unwesentlich von der Feldstärke in der Quelle abhängig. Bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV wäre demnach eine Fragmentierungs-Rate von rund 30000 s^{-1} zu erwarten. Gemessen wurden jedoch nur etwa 10000 s^{-1} (bei einer Bestrahlungsstärke von $2,5 \cdot \text{Schwelle}$). Diese Abnahme ist bei verzögerter Ionen-Extraktion durch die zu Beginn ungestörte Expansion der Ionenwolke erklärbar. Es finden hier deutlich weniger Anregungen durch Stöße in der Quelle statt, als bei prompter Ionen-Extraktion. Eine weitere Quelle für Fragmentierungen können Stöße mit Restgas sein, jedoch sind diese bei dem Druck (10^{-6} mbar), wegen der großen freien Weglängen der Ionen, unwahrscheinlich.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Rate der Fragmentierung mit zunehmender Bestrahlungsstärke ansteigt. Bei verzögerter Ionen-Extraktion ist die Rate durch die selteneren Stöße in der Quelle, die auch mit geringerer Energie stattfinden, reduziert.

4.1.2 Probenspezifische Einflüsse

In diesem Abschnitt sollen die präparativen Einflüsse auf das Fragment-Ionen-Spektrum näher untersucht werden. Zunächst wird auf die Abhängigkeit der Signalintensität der PSD-Fragment-Ionen von der verwendeten Matrix eingegangen. Anschließend wird die Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke untersucht. Während in Kapitel 4.1.1 nur auf die totale Fragmentierungs-Rate eingegangen wurde, wird hier die Rate einzelner Fragmente als Funktion der Laserenergie genauer betrachtet.

4.1.2.1 Fragmentierung bei verschiedenen Matrizes

Es soll verglichen werden, ob bei Verwendung verschiedener Matrizes das Fragmentierungs-Muster im PSD-Spektrum identisch ist, oder ob dort Unterschiede auftreten. Dazu werden PSD-Spektren verschiedener Peptide jeweils mit DHB und 4HCCA (α -Cyano-4-hydroxymizsäure) aufgenommen. Hängt die Fragmentierung nicht von der Matrix ab, bietet dies für ein Analyse-Verfahren den Vorteil, gewonnene Ergebnisse auf Fragment-Ionen-Spektren mit beliebigen Matrizes anwenden zu können. Ergeben sich jedoch signifikante Unterschiede, wird die Anwendbarkeit der gewonnenen Musterspektren eingeschränkt.

Die nachgewiesenen PSD-Fragment-Ionen entstehen erst nach der Ionenquelle. Die für den Zerfall benötigte Anregungsenergie wird in der Probenebene oder in der Ionenquelle auf die Moleküle übertragen, wobei bei verzögerter Ionen-Extraktion die Anregung an der Oberfläche überwiegt [110]. Dadurch wird zwar die innere Energie der Moleküle von den Bedingungen der Probe bestimmt, aber der Zerfallsprozess ist von der speziellen Matrix unabhängig, da jede Matrix vergleichbare Anregungsenergien in den Analyt-Molekülen erzeugen kann.

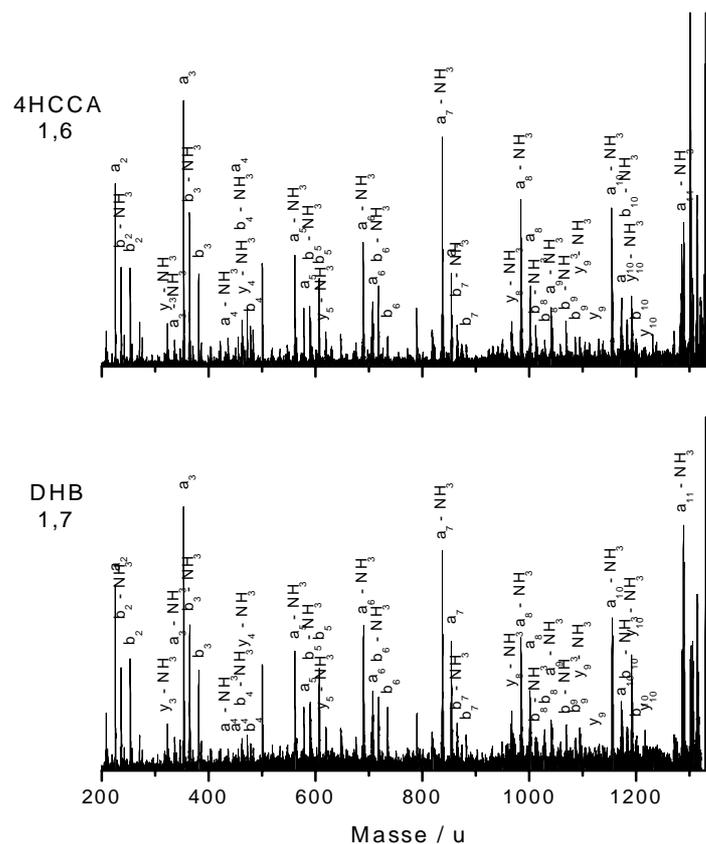


Bild 4-3: Vergleich des PSD Fragment-Ionen-Spektrums von Substanz P bei den Matrizes 4HCCA (oben) und DHB (unten). Die relativen Bestrahlungsstärken sind bei beiden Messungen ähnlich.

Als Beispiel sind in Bild 4-3 für Substanz P (RPKPQQFFGLM-NH_2 , $(\text{M}+\text{H})^+ = 1347,74 \text{ u}$) die Fragment-Ionen-Spektren mit zwei verschiedenen Matrizes (DHB und 4HCCA) abgebildet. Die Pulsenergie des Lasers ist so gewählt, daß die Mutter-Molekül-Ionen in

beiden Proben etwa gleich stark fragmentieren. Da die Ionisationsschwelle bei DHB höher liegt, als bei 4HCCA, ist dieses Spektrum bei einer höheren Pulsenergie aufgezeichnet worden. In beiden Fällen liegt die relative Energiedichte mit $1,6 \cdot E_{S/HCCA}$ für 4HCCA und $1,7 \cdot E_{S/DHB}$ für DHB oberhalb der Ionisationsschwellen $E_{S/HCCA}$ und $E_{S/DHB}$. Der direkte Vergleich zeigt, daß sich beide Spektren sehr stark ähneln. Es treten hauptsächlich N-terminale Fragment-Ionen auf, die häufig eine Amino-Gruppe verlieren, so daß sich das Vierer-Muster (b_n , b_n-NH_3 , a_n , a_n-NH_3) über das gesamte Spektrum zieht. Der Amid-Verlust ist auf das N-terminale Arginin zurückzuführen. C-terminale y -Ionen treten nur sehr schwach auf und verlieren ebenfalls eine Amino-Gruppe.

4.1.2.2 Fragmentierung bei verschiedenen Bestrahlungsstärken

Bei größerer Bestrahlungsstärke des Lasers entstehen sichtbar mehr Fragmente. Es stellt sich die Frage, ob die Intensitäten der Fragmente untereinander sich merkbar unterscheiden, oder ob die Variation in der Größenordnung der Schwankungen der Signalintensitäten liegt. Für wenig intensive Fragmente ist zu beachten, daß eine Schwellintensität existiert, ab der Ionen nachgewiesen werden können.

Für Substanz P ist in Bild 4-4 ein Vergleich von Fragment-Ionen-Spektren bei verschiedenen Bestrahlungsstärken zu sehen. Angegeben wird die relative Energiedichte, die im Verhältnis zu der Ionisationsschwelle für die verwendete Matrix (4HCCA) aus den gemessenen Energiedichten aus Bild 4-1 ermittelt wurden. Die in Bild 4-4 gezeigten Spektren sind mit von unten nach oben zunehmender Bestrahlungsstärke aufgenommen worden, wobei die Energiedichten $1,2 \cdot E_{S/4HCCA}$, $1,6 \cdot E_{S/4HCCA}$ und $2,7 \cdot E_{S/4HCCA}$ betragen. Dies zeigt sich besonders deutlich in der Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses mit höherer Bestrahlungsstärke. Nahe der Desorptionsschwelle reicht die Energie gerade aus um die Moleküle zu ionisieren, so daß kaum Fragmentierungen auftreten. Das Spektrum bei $1,2 \cdot E_{S/4HCCA}$ ist um den Faktor 5 erhöht dargestellt. Das analoge Experiment mit DHB liefert vergleichbare Resultate. Ein solches Verhalten wird auch bei anderen getesteten Peptiden beobachtet.

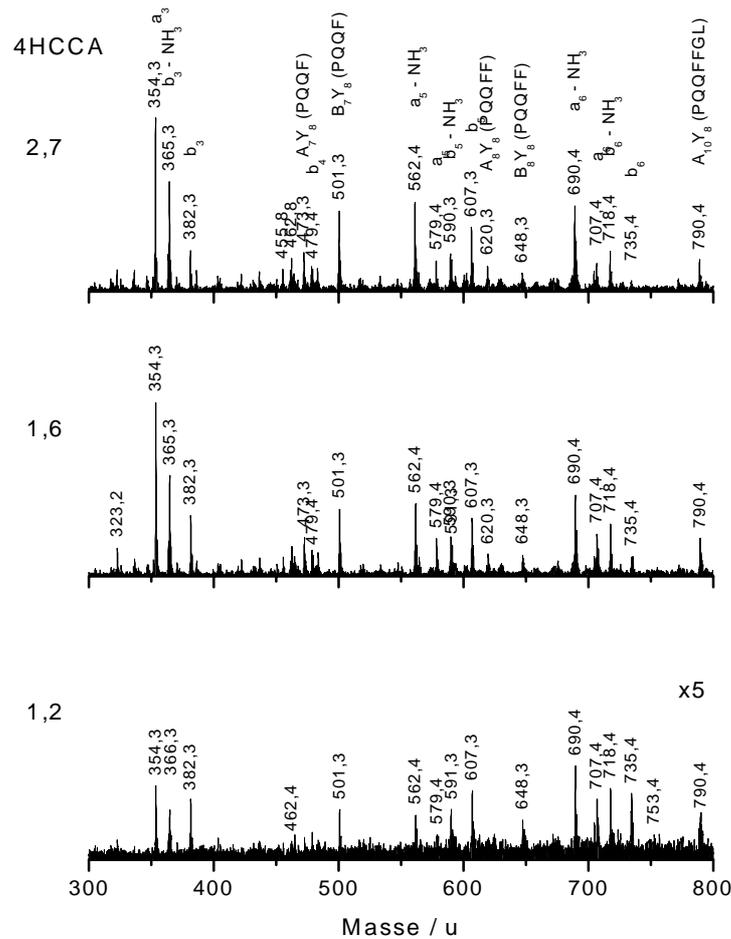


Bild 4-4: PSD Fragment-Ionen-Spektrum von Substanz P mit 4HCCA als Matrix. Die relative Energiedichte des Lasers liegt bei (a) 2,7, (b) 1,6 und (c) 1,2 über der Schwelle.

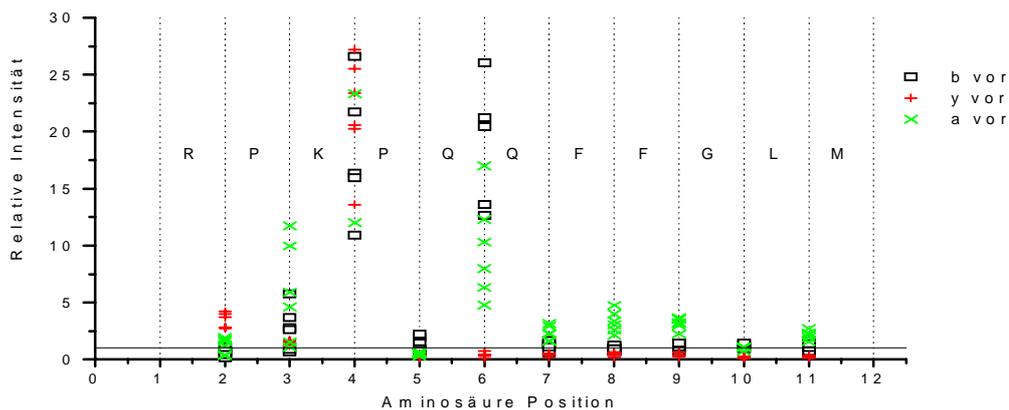


Bild 4-5: Relative Intensitäten der verschiedenen Fragment-Typen bei Substanz P an den spezifischen Aminosäure-Positionen. Dargestellt sind die a-, b- und y-Ionen.

In Bild 4-5 sind die Intensitäten der einzelnen Fragment-Ionen für mehrere separate Messungen von Substanz P aufgetragen. Die Intensitäten der a-, b- und y-Ionen an jeder Aminosäure-Position sind durch je ein Symbol gekennzeichnet. Die Einzelmessungen wurden bei zwei verschiedenen Matrixen (DHB und 4HCCA) und je drei

Bestrahlungsstärken durchgeführt. Die relativen Intensitäten sind auf die Gesamtintensität aller Fragment-Ionen innerhalb eines Spektrums und die Masse des Mutter-Ions bezogen.

Bei dem Vergleich fällt kein signifikanter Unterschied zwischen den unter verschiedenen Bedingungen aufgenommenen Spektren auf. Die Variation der relativen Intensität eines Fragments liegt im Schnitt bei 30 %. Weiter kann an diesem Beispiel beobachtet werden, daß die Intensität nicht alleine von einer Aminosäure bestimmt wird, sondern die Dipeptid-Kombination eine Rolle spielt. Beispielsweise ist die Intensität der Brüche zwischen zwei Glutaminsäure Resten (Q-Q an Position 6) wesentlich höher als bei den Brüchen zwischen Glutaminsäure und Prolin (P-Q an Position 5) oder Phenylalanin (Q-F an Position 7). Der Vergleich mit den selben Dipeptid-Kombinationen in anderen Peptiden zeigt jedoch, daß es noch andere die Bildung von Fragment-Ionen beeinflussende Parameter gibt. Als Beispiel sind die Protonenaffinität der Aminosäuren genannt, die zu einer Aufteilung zwischen N-terminalen und C-terminalen Fragment-Ionen führt.

Zusammenfassend kann beobachtet werden, daß bei Fragment-Ionen-Spektren weder die Bestrahlungsstärke, noch die Matrix einen starken Einfluß auf die relativen Intensitäten der Fragment-Ionen besitzen. Obwohl sich Spektren, die unter unterschiedlichen Bedingungen aufgenommen wurden, teilweise auf den ersten Blick unterscheiden, sind die relativen Unterschiede der Signalintensitäten der Fragment-Ionen in *einem* Spektrum verglichen mit den selben Fragment-Ionen in dem anderen Spektrum nur gering. Es bleibt anzumerken, daß durch eine zu geringe Energiedichte des Laserpulses die Intensität einzelner Fragment-Ionen unter die Nachweisgrenze sinken kann, wodurch sich die Verhältnisse teilweise verschieben.

4.1.3 Bewertung der Einflüsse auf die Fragmentierung

Alle Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß PSD-Spektren untereinander nicht nur qualitativ, das heißt, über das Auftreten von Fragment-Ionen, sondern auch quantitativ, also über die relativen Intensitäten verschiedener Fragment-Ionen verglichen werden können. Hierbei sind die Einflüsse der Bestrahlungsstärke des Lasers so gering, daß nicht gesondert auf die Intensität geachtet werden braucht. Ein Einfluß der Matrix ist ebenfalls nicht nachweisbar.

Für die Probenmenge gilt, möglichst genug Substanz zu verwenden, aber nur so viel, daß eine Übertragung auf reale Proben noch realistisch bleibt. Auf der anderen Seite würde man bei zu geringen Intensitäten durch zu wenig Analyt, eventuell Fragment-Ionen nicht detektieren, die bei größeren Mengen noch gesehen werden können. Deshalb gilt es bei realen Proben zu berücksichtigen, daß die nur schwach intensiven Fragmente im Untergrund verschwinden können.

Unterdrückungseffekte, wie sie bei Mischungen verschiedener Peptide auf der Probe beobachtet werden können ([111], Kapitel 4.5.8), sind bei der Bildung von PSD-Fragment-Ionen nicht zu erwarten, da diese erst in der Gasphase und nach Verlassen der Ionenquelle entstehen. Die Mutter-Molekül-Ionen erhalten bei PSD-MALDI zwar ihre Anregung in der Probe oder der Ionenquelle [110], aber die Fragmentierung findet als unabhängiger Prozess statt, der nicht von der Umgebung beeinflusst wird.

4.2 Isotopenverteilung und Filterung

Anhand der Daten aus Proteindatenbanken oder mit Hilfe von Kombinatorik lassen sich statistische Informationen über die Isotopenverteilung von Peptiden (Kapitel 4.2.3 und 4.2.4) und die Häufigkeitsverteilung der Peptidmassen (Kapitel 4.2.2) gewinnen. Diese Daten können genutzt werden, um neben der Masse zusätzliche Informationen über ein Peptid zu erhalten, oder um die Spektren zu vereinfachen, wodurch z. B. die Interpretation komplexer Mischungen erleichtert wird. In Kapitel 4.2.5 wird der Schwefelanteil mit Hilfe des Isotopenmusters abgeschätzt, um die Anzahl der möglichen Peptid-Sequenzen zu reduzieren, und in Kapitel 4.3 wird ein Filteralgorithmus vorgestellt, mit dessen Hilfe aus Massenspektren das Isotopenmuster auf die monoisotopische Masse reduziert wird. Diese Filterung wird in Kapitel 4.3 auf MALDI- und in Kapitel 4.4 auf ESI-Massenspektren angewendet.

4.2.1 Berechnung der Isotopenverteilung

In organischen Molekülen treten hauptsächlich Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel auf. Die natürliche Isotopenverteilung der Atome führt zu Signalmustern, die mit steigender Masse komplexer werden, sich aber aus der Elementzusammensetzung exakt berechnen lassen [112][113][114][115][116]. Bei allen diesen Atomen tritt in erster Näherung ein leichteres Isotop mit hoher Wahrscheinlichkeit und ein um 1 u schwereres Isotop (bei Schwefel um 2 u schwerer) mit etwa 0,1 % bis 1 % Wahrscheinlichkeit auf. Bei Clustern aus mehreren Atomen steigt die Wahrscheinlichkeit, daß im Cluster ein (oder mehrere) schwerere Isotope vorkommen. Im idealisierten Fall eines Clusters aus nur einer Atomsorte (z.B. Kohlenstoff-Cluster), läßt sich die Isotopenverteilung leicht aus einer Binomial-Verteilung berechnen:

$$I_n(k) = \binom{n}{k} p^{n-k} (1-p)^k.$$

Dabei sind n die Gesamtanzahl der Atome, k die Anzahl der schweren Isotope, $I_n(k)$ die Intensität des k -ten Isotops, p die Wahrscheinlichkeit für ein leichtes und $(1-p)$ die Wahrscheinlichkeit für ein schweres Isotop. In diesem Fall gibt es für jede Atomsorte nur zwei verschiedene Isotope.

Besitzt ein Atom mehr als zwei verschiedene Isotope, wie es bei Schwefel und Sauerstoff der Fall ist, läßt sich die Intensität $I(k)$ in einem Cluster nicht mehr durch eine Binomial-Verteilung bestimmen. Statt dessen ist eine Polynomial-Verteilung anzuwenden [117]. Bei dieser sind p_i ($i = 1 \dots j$) die Wahrscheinlichkeiten und X_i ($i = 1 \dots j$) ist die Anzahl der einzelnen Isotope eines Atoms. Es gibt hierbei j verschiedene Isotope ($j = 3$ für Sauerstoff, $j = 4$ für Schwefel):

$$P(X_1, \dots, X_j) = \frac{n!}{X_1! \cdot \dots \cdot X_j!} p_1^{X_1} \cdot \dots \cdot p_j^{X_j}.$$

Im Fall $j = 2$ ist dieser Ausdruck identisch zur Binomial-Verteilung, da hier $\sum_{i=1}^j X_i = n$ und $\sum_{i=1}^j p_i = 1$ ist.

Die Häufigkeiten der Isotope der Atome in organischen Molekülen sind in Tabelle 4-2 gemeinsam mit den relativen Atommassen aufgeführt.

Tabelle 4-2: *Relative Atommassen und Häufigkeiten von Isotopen der Atome, die in organischen Verbindungen auftreten (Werte aus [64])*

Atom	Isotop	Relative Atommasse	Häufigkeit / %
Kohlenstoff	¹² C	12,000000	98,9
	¹³ C	13,003354	1,1190
Wasserstoff	¹ H	1,0078252	99,985
	² H	2,0141022	0,0150
Stickstoff	¹⁴ N	14,003074	99,635
	¹⁵ N	15,000108	0,3680
Sauerstoff	¹⁶ O	15,994915	99,76
	¹⁷ O	16,999133	0,0370
	¹⁸ O	17,999160	0,20
Schwefel	³² S	31,972974	95,0
	³³ S	32,971462	0,8
	³⁴ S	33,967865	4,2
	³⁶ S	35,967090	0,015

Ein Molekül besitzt typischerweise verschiedene Atome mit unterschiedlichen Isotopenhäufigkeiten. In diesem Fall müssen die Isotopenpeaks aus zahlreichen Kombinationen verschiedener Isotope verschiedener Atome gebildet werden. Bei dem leichtesten Isotopenpeak des Moleküls gibt es nur die Möglichkeit, daß alle Atome durch das leichteste Isotop repräsentiert sind (monoisotopische Masse). Aber schon bei dem nächst schwereren Isotopenpeak (+1 u) kann das Signal durch das Auftreten eines ¹³C, ¹⁵N, ²H, ¹⁷O oder ³³S-Atoms gebildet werden. Die geringen Unterschiede in der Masse der aus unterschiedlichen Isotopenkombinationen zusammengesetzten Moleküle gleicher nomineller Masse (Massendifferenz 10^{-3} u) können bei einem MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer nicht mehr aufgelöst werden, so daß alle Kombinationen, die eine konstante Anzahl an zusätzlichen Neutronen in schweren Isotopen besitzen, zusammengefasst werden können. Die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Kombination der Isotope wird durch das Produkt der einzeln über eine Polynomial-Verteilung berechneten Wahrscheinlichkeiten für jede Atomsorte bestimmt. Die Gesamtwahrscheinlichkeit für den Isotopenpeak ergibt sich aus der Summe über die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Kombinationen.

Bei schwereren Isotopenpeaks steigt die Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten noch weiter an, da beispielsweise ein +2 u Signal aus dem Austausch von zwei beliebigen +1 u Isotopen gebildet werden kann. Zusätzlich besteht bei Massenunterschieden von +2 u die

Möglichkeit des Austausches von ^{32}S zu ^{34}S (und ^{16}O zu ^{18}O). Insgesamt gibt es bei Peptiden bis zu 15 Kombinationsmöglichkeiten aus zwei +1 u Austauschen und die Möglichkeit des $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ - bzw. $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ -Austausches, deren Wahrscheinlichkeiten alle summiert werden müssen.

In Tabelle 4-2 sind alle Kombinationen mit ihren Wahrscheinlichkeiten aufgelistet. Dabei bedeutet z.B. $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$, daß ein ^{12}C - und ein ^{14}N -Atom durch ein schweres Isotop getauscht wurden. Die angegebenen Wahrscheinlichkeiten sind das Produkt der Häufigkeiten der Isotope und geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der zwei zufällig ausgewählte Atome, deren Atomsorte bekannt ist, genau diese Kombination der Isotope besitzen.

Tabelle 4-3: Die Kombinationen, die eine +2 u Massenerhöhung ergeben, sind mit Ihren Wahrscheinlichkeiten P aufgeführt. Die Spalte P_{Mol} stellt als Beispiel die Wahrscheinlichkeiten für ein Molekül mit der Atomzusammensetzung $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_8$ dar ($M = 500,25 \text{ u}$)

Kombination	$P / \%$	$P_{\text{Mol}} / \%$	Kombination	$P / \%$	$P_{\text{Mol}} / \%$
^{34}S	4,200000		$^{33}\text{S}, ^{17}\text{O}$	0,000296	
^{18}O	0,200000	1,2337	$^2\text{H}, ^{13}\text{C}$	0,000168	0,0887
$^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}$	0,012522	1,8710	$^{17}\text{O}, ^{15}\text{N}$	0,000136	0,0058
$^{33}\text{S}, ^{13}\text{C}$	0,008952		$^{33}\text{S}, ^2\text{H}$	0,000120	
$^{33}\text{S}, ^{33}\text{S}$	0,006400		$^2\text{H}, ^{15}\text{N}$	0,000055	0,0101
$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$	0,004118	0,4494	$^{17}\text{O}, ^{17}\text{O}$	0,000014	0,0002
$^{33}\text{S}, ^{15}\text{N}$	0,002944		$^2\text{H}, ^{17}\text{O}$	0,000006	0,0011
$^{15}\text{N}, ^{15}\text{N}$	0,001354	0,0219	$^2\text{H}, ^2\text{H}$	0,000002	0,0009
$^{17}\text{O}, ^{13}\text{C}$	0,000414	0,0516			

Die verhältnismäßig große Häufigkeit von ^{34}S (etwa 4,2 %) im Vergleich mit den anderen in Peptiden vorkommenden Isotopen, führt, bei Anwesenheit von Schwefel, zu einer deutlichen Verbreiterung des Isotopenmusters. Die Wahrscheinlichkeit zwei ^{13}C -Atome in einem Molekül, welches nur zwei Kohlenstoff-Atome besitzt, anzutreffen, ist mit 0,01 % um mehr als den Faktor 300 geringer, als bei einem Molekül mit einem Schwefel ein ^{34}S -Isotop anzutreffen. In größeren organischen Molekülen (z. B. Peptiden) wird durch die große Anzahl an Kohlenstoff-Atomen die Gesamtwahrscheinlichkeit für diesen Fall mit zunehmender Masse des Moleküls größer. So liegt die Wahrscheinlichkeit, daß z. B. bei 30 Kohlenstoff-Atomen zwei ^{13}C -Isotope vorkommen, bei 3,99 %. Als weiteres Beispiel zeigt die dritte Spalte in Tabelle 4-3 die Wahrscheinlichkeiten für ein Molekül mit der Summenformel $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_8$ ($M = 500,25 \text{ u}$). Allein durch die große Anzahl der Kohlenstoff-Atome ist der Anteil der Isotopen-Intensität, der durch zwei ^{13}C gebildet wird, größer, als der durch ^{18}O gebildete Teil. Bei nur insgesamt je zwei Atomen jeder Sorte wäre der ^{18}O Anteil intensiver. Der ^{13}C -Anteil des Moleküls liefert mehr als 50 % der gesamten Isotopenhäufigkeit bei dem +2 u Isotop. Bei dem +1 u Isotop liegt der ^{13}C -Anteil hier bei etwa 85%, der Rest wird hauptsächlich vom ^{15}N beigesteuert.

4.2.2 Verteilung der Massen von Peptiden

4.2.2.1 Häufigkeit von Peptid-Sequenzen

Um die durchschnittliche Isotopenverteilung von Peptiden zu bestimmen, wird in einem gegebenen Massenintervall für jede mögliche Aminosäure-Kombination das Isotopenmuster berechnet. Die Anzahl der möglichen Kombinationen steigt mit der Masse exponentiell an. Wenn N die Anzahl der Residuen in einem Peptid ist und A die Anzahl der möglichen Komponenten, bzw. die Anzahl der verschiedenen vorkommenden Aminosäuren (20 in proteinogenen Peptiden), dann ist die Gesamtzahl der verschiedenen Peptide (Sequenzen) mit N Aminosäuren Länge

$$v = A^N.$$

Dies wird in der Kombinatorik als die Anzahl der *Variationen* bezeichnet. Die Anzahl der Aminosäure-Summenformeln, bei der die Position der Aminosäuren nicht berücksichtigt ist, wird aus der Anzahl der *Kombinationen* bestimmt. Diese ist kleiner als die Zahl der Variationen:

$$c = \binom{A+N-1}{N} = \frac{(A+N-1)!}{N!(A-1)!}$$

c ist die Anzahl der verschiedenen Peptidmassen, die aus Peptiden der Länge N und A unterschiedlichen Aminosäuren gebildet werden können.

4.2.2.2 Permutations-Verfahren

Die Anzahl der Aminosäure-Kombinationen, die in einem vorgegebenen Massenintervall liegen, läßt sich nicht in einem geschlossenen analytischen Ausdruck darstellen. Man ist statt dessen gezwungen, alle Kombinationen numerisch zu ermitteln. Dazu werden über ein Permutations-Verfahren alle Aminosäure-Kombinationen gebildet und die Kombinationen, deren Massen in das gewünschte Intervall fallen, gezählt.

Bei der Permutation von Aminosäure-Summenformeln ist die Überlauf-Bedingung (Stelle > 19 beim Vicesimalsystem), gegenüber dem Zählen im Vicesimalsystem, anzupassen. Da Aminosäure-Summenformeln durch das Hochzählen immer schwerere Moleküle bilden, kann das Zählen abgebrochen werden, wenn die Masse der Aminosäure-Kombination oberhalb des gesuchten Massenintervalls liegt. Allerdings steigt durch Erhöhen der Anzahl der nächsten Aminosäure bei einem „Überlauf“ die Masse nicht monoton an. So sind z. B. zwei Glycin schwerer als ein Alanin. Ein weiterer Nebeneffekt des beschriebenen Algorithmus ist, daß nach einem kompletten Durchlauf bis zu der Masse, bei der das Zählen abgebrochen wird, alle Aminosäure-Kombinationen gefunden werden. Um also die massenabhängige Peptid-Verteilung bis zur Masse M_{\max} zu bestimmen, reicht es aus, den Algorithmus mit M_{\max} als Abbruchmasse einmal anzuwenden und bei jedem Zwischenschritt die gefundene Aminosäure-Kombination zu speichern, oder beispielsweise in eine Tabelle abhängig von der Masse zu summieren.

4.2.2.3 Bestimmung der Aminosäure-Kombinationen

In Bild 4-6 ist das Ergebnis der Zählung bis zur Masse 1100 u zu sehen. Das Registrierungs-Massenintervall beträgt hier 0,05 u. Der große Ausschnitt (Bild 4-6 (a)) zeigt einen exponentiellen Anstieg, der von einer Modulation mit der Periode 14 u

überlagert wird, die mit ansteigender Masse zunehmend stärkere Amplituden erreicht. Die Ursache dieser Modulationen liegt darin, daß sich Aminosäuren besonders häufig durch eine CH_2 -Gruppe unterscheiden. Wenn bei einer bestimmten Masse besonders viele Kombinationen existieren, so wiederholt sich diese Häufung bei Massendifferenzen von Vielfachen von +14 u erneut. Bei Massen unterhalb von 400 u verschwindet die Periodizität vollständig, da in diesem Massenbereich nur eine geringe Anzahl an Kombinationen vorliegt.

Im kleinen Ausschnitt (siehe Bild 4-6(b)) zeigt sich, daß der Massenbereich nicht gleichmäßig von Peptiden besetzt ist, sondern es Bereiche gibt, in denen keine Aminosäure-Kombinationen auftreten. Folglich kann ein Peptid nicht jede beliebige Masse annehmen. Mit steigender Masse werden die besetzten Bereiche breiter, während die unbesetzten Bereiche schmaler werden. Bei 800 u sind die besetzten Bereiche etwa 0,3 u (0,14 u Halbwerts-Breite) und der freie Bereich 0,7 u breit. Bei Massen größer als etwa 1600 u beginnen die Cluster zu verschmelzen, und es existiert kein zusammenhängender peptidfreier Bereich mehr. Der unbesetzte Bereich ist bei dieser Masse noch ca. 0,05 u breit; ab 1751,30 u sind bei einer Intervall-Breite von 0,01 u keine unbesetzten Bereiche mehr zu finden.

Der exponentielle Anstieg der Anzahl der Aminosäure-Kombinationen kann mit einer einfachen Exponentialfunktion der Form

$$N = A e^{M/T}$$

interpoliert werden. Hierbei sind A und T die Fitparameter, M ist die Masse. Legt man eine einhüllende Kurve über die Maxima der Verteilung, die mit $dM = 0,01$ u Massenintervall-Breite summiert wurde, ergeben sich für diese im Bereich 600 u bis 1700 u die Parameter

$$A = 3,89 \quad \pm 0,12$$

$$T = (148,35 \quad \pm 0,42) \text{ u.}$$

Da der Anstieg exponentiell ist, verdoppelt sich die Anzahl der Aminosäure-Kombinationen alle $(T * \ln 2) = 102,83$ u.

Bild 4-6 zeigt nicht die gesamte Anzahl der möglichen Peptide, sondern lediglich die Anzahl der möglichen Aminosäure-Summenformeln. Zu jeder Summenformel existiert eine Reihe von Permutationen, welche die Peptid-Sequenzen ergeben. Die atomare Zusammensetzung einer Aminosäure-Kombination verändert sich durch die Permutation nicht, so daß das Isotopenmuster unverändert bleibt. Auch die Breite der besetzten und unbesetzten Massenbereiche bleibt unverändert, wobei jedoch in der Mitte eines besetzten Massenbereichs mehr Permutationen als am Rand existieren, da am Rand häufiger Aminosäure-Kombinationen aus nur wenigen verschiedenen Aminosäuren auftreten.

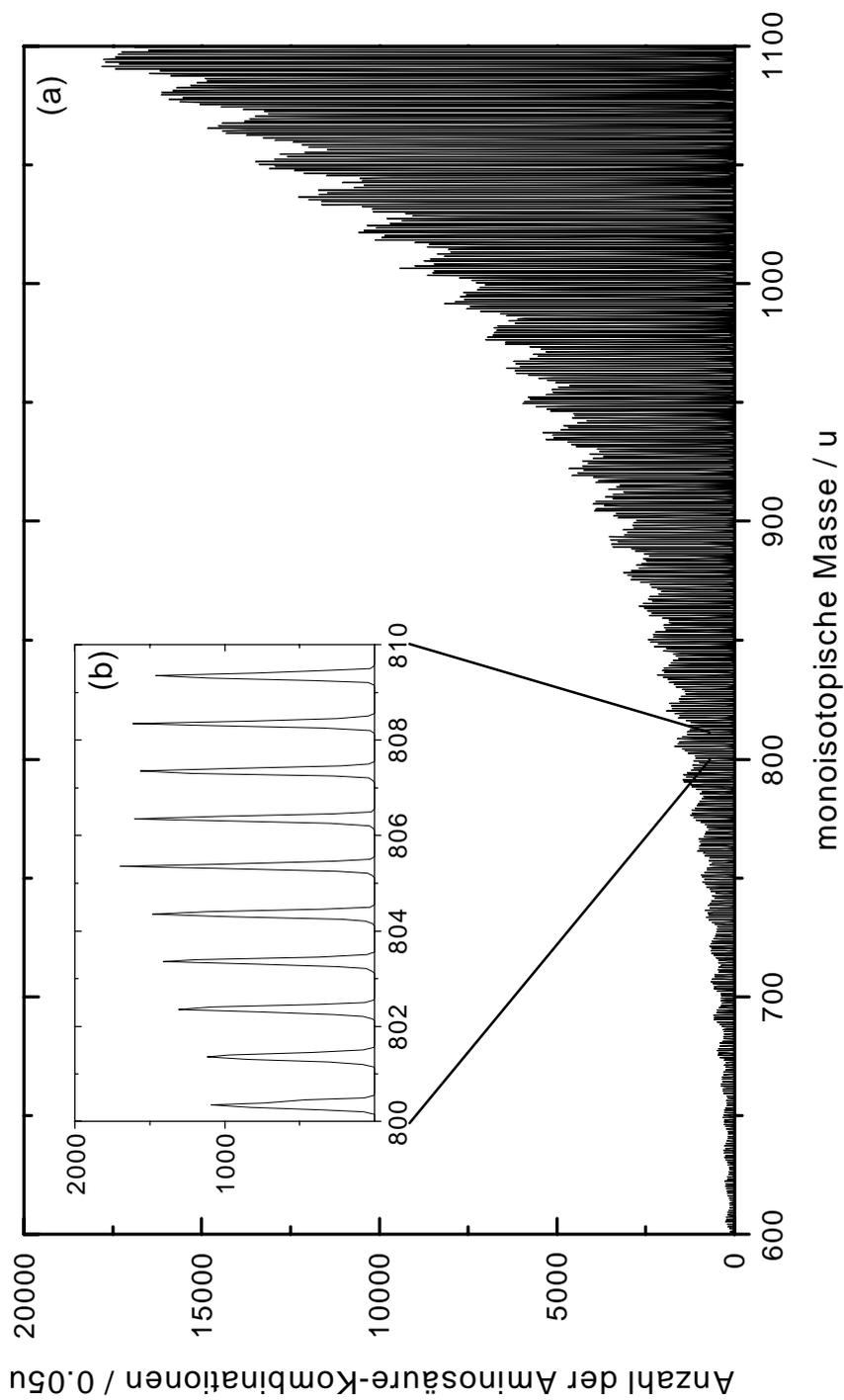


Bild 4-6: Anzahl der Aminosäure-Kombinationen (Summenformeln) pro 0,05 u Massenintervall im Massenbereich von (a) 600 u bis 1100 u und (b) 800 u bis 810 u. In (a) ist eine periodische Modulation von 14 u zu sehen. Die Peptidmassen sind in Clustern gruppiert (b)

Daraus folgt, daß für die Bestimmung der Massenverteilung die Anwendung der Summenformeln ausreicht. Die Verwendung von Permutationen würde die Breite der Massenverteilung in den besetzten Bereichen noch weiter reduzieren, wobei allerdings der Rechenaufwand erheblich erhöht wäre.

Das Auftreten von Clustern in der Massenverteilung ist spezifisch für die Einschränkung auf eine Substanzklasse. Bestimmt man die gleiche Massenverteilung für andere Substanzklassen oder beliebige Summenformeln, die aus den Atomen C, H, N, O und S zusammengesetzt sind, ergeben sich andere Verteilungen. Bei beliebigen Summenformeln ist die Massenverteilung homogener, und bei einer Intervall-Breite von 0,01 u treten im Bereich ab etwa 300 u keine unbesetzten Bereiche.

4.2.2.4 Nominale Masse und Schwerpunktmasse eines Clusters

Die Cluster-Bildung, die bei Peptiden beobachtet wird, kann dazu genutzt werden, gemittelte Isotopenmuster für die Peptide zu bestimmen. Jeder Cluster wird durch seine nominale Masse gekennzeichnet. Diese ergibt sich aus der Anzahl der Neutronen und Protonen in den Atomen des Moleküls. Für jede Aminosäure-Kombination in einem Cluster wird das Isotopenmuster berechnet, so daß Mittelwert und Standardabweichung der Massenverteilung bestimmt werden können.

Zwischen der ganzzahligen nominalen Masse M_{nom} und der Schwerpunktmasse eines Clusters M_S besteht ein linearer Zusammenhang $M_S = c M_{\text{nom}}$. Der Umrechnungsfaktor ist

$$c = 1,000456 \pm 1,2 \cdot 10^{-05},$$

und wurde durch die Bestimmung des Verhältnisses aus Schwerpunktmassen zu nominaler Masse von zufällig ausgewählten Clustern ermittelt. Dazu wurden für zufällig ausgewählte nominale Massen die Schwerpunktmassen der von Aminosäure-Kombinationen besetzten Massenbereiche bei einer Massengenauigkeit von 0,01 u bestimmt. Der lineare Zusammenhang zwischen Schwerpunktmasse und nominaler Masse kann durch die gleichbleibende Verteilung der verschiedenen Atome in den Massenbereichen erklärt werden. Dadurch steigt bei der n-fachen Masse auch der Anteil aller Isotope um den Faktor n, wodurch die Massendifferenz durch die Isotope linear wird.

4.2.2.5 Halbwerts-Breite

Wird zusätzlich die Halbwerts-Breite der Verteilung berücksichtigt, bietet sich die Möglichkeit, Peptide anhand der Masse von anderen Molekülen zu unterscheiden. Außerdem läßt sich feststellen, ob eine fehlerhafte Massen-Kalibrierung des Spektrometers vorliegt. Die Nachkommastelle der Masse muss in einem Fehlerintervall um die Schwerpunktmasse liegen, dessen Breite durch die Halbwerts-Breite der Häufigkeitsverteilung bestimmt werden kann.

Die Halbwerts-Breite ergibt sich aus einer Gaußschen Normalverteilung, die über die Massenverteilung des Clusters gelegt wird. Die Breite der Gauss-Kurve w gibt das Intervall an, in dem 95 % aller Werte liegen. Für eine nominale Masse von 700 u läßt sich eine Breite von $w = 0,239 \pm 0,011$ u bestimmen. Bei 1694 u ergibt sich eine Breite von $w = (0,363 \pm 0,003)$ u. Dies bedeutet in einem Massenintervall von $(1694,77 \pm 0,36)$ u = [1694,41 u ... 1695,14 u] befinden sich 95 % der Peptide. Bei einer nominalen Masse von

1695 u hat der nächst höhere Cluster sein Maximum der Normalverteilung bei 1695,77 u, die Verteilung belegt ein Intervall von 1695,41 u bis 1696,14 u. Daraus ergibt sich ein Abstand der gefitteten Cluster von 0,27 u. Es muss beachtet werden, daß das Intervall zwischen den Clustern bei hohen Massen nicht peptidfrei ist. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, bei einer bekannten nominalen Masse, ein Peptid mit einer exakten Masse aus dem Zwischenintervall zu finden, kleiner als 2,5 %.

Die Breite der Cluster steigt zwar mit der Masse an, dieser Anstieg ist aber nicht linear, wie in Bild 4-7 zu sehen ist. Um eine Extrapolation der Anzahl der Aminosäure-Kombinationen durchführen zu können, wird die Breite der Cluster näherungsweise durch eine Gerade angepaßt. Die daraus erhaltene Geraden-Gleichung ist

$$w = 0,13232 \text{ u} + 1,3826 \cdot 10^{-4} * M_{\text{Nom}} .$$

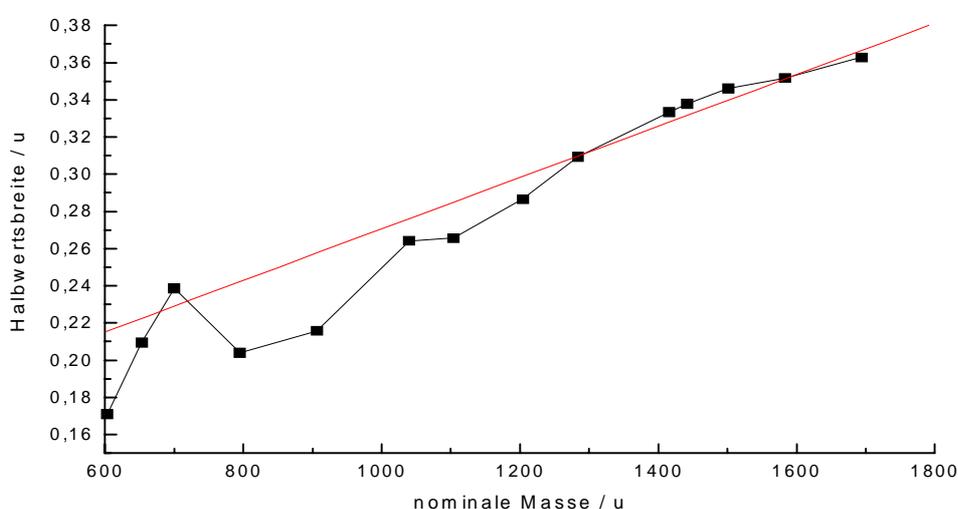


Bild 4-7: Breite der Cluster (95 % Bereich) für theoretische Aminosäure-Kombinationen abhängig von der nominalen Masse des Clusters

4.2.2.6 Extrapolation

Für große Peptidmassen (>2000 u) ist der Rechenaufwand zur Bestimmung der Anzahl der Aminosäure-Kombinationen auf numerisch/kombinatorischem Weg zu groß. Hier können die oben beschriebenen Näherungen zur Extrapolation genutzt werden. Als Modell für die Verteilung eines Clusters, wird eine gaussische Normalverteilung angenommen.

Die Breite der Verteilung nimmt im idealisierten Fall linear zu. Das Maximum der Verteilung liegt auf der Schwerpunktmasse M_S , die sich aus der nominalen Masse berechnen läßt. Die Höhe des Maximums wird über den exponentiellen Anstieg bestimmt. Für jeden Cluster mit der nominalen Masse M_{Nom} gilt für die Intensität I an der Masse m :

$$I(m, M_{\text{Nom}}) = A \exp\left(\frac{M_{\text{Nom}}}{T} - \frac{8}{(w_0 + w_1 M_{\text{Nom}})^2} (m - c M_{\text{Nom}})^2\right)$$

Die Parameter sind $A = 3,89$, $T = 148,35 \text{ u}$, $w_0 = 0,13232 \text{ u}$, $w_1 = 1,3826 \cdot 10^{-4}$ und $c = 1,000456$. Die Standardabweichungen der Parameter sind oben im Text angegeben.

Der Vergleich zwischen extrapoliert und kombinatorisch ermittelter Anzahl ist in Bild 4-8 für den Bereich 1880 u bis 1890 u gezeigt.

Die 14 u-Modulation ist bei dieser Extrapolation nicht mit berücksichtigt worden. Statt dessen wurde in Kapitel 4.2.2.3 eine einhüllende Exponentialfunktion über die Maxima der 14 u-Perioden gebildet, so daß die angegebene Extrapolation eine obere Abschätzung der Anzahl der Kombinationen liefert.

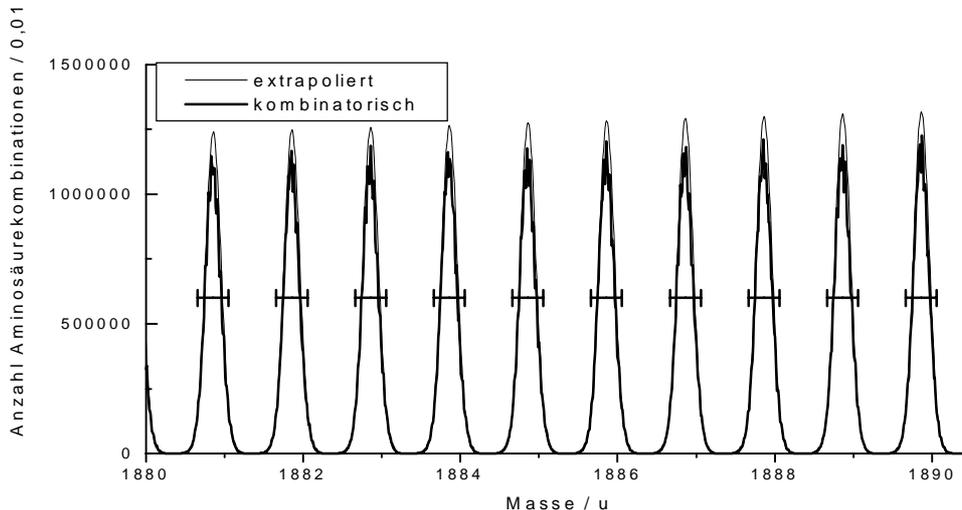


Bild 4-8: Anzahl der Aminosäure-Kombinationen. Vergleich zwischen exakter Bestimmung mit Hilfe kombinatorischen Abzählens und Extrapolation mit Gaußschen Normalverteilungen der Cluster.

4.2.3 Verteilung der Isotopenmuster bei Peptiden gleicher Masse

Für alle theoretischen Aminosäure-Kombinationen wurden die Isotopenmuster bestimmt, wobei die Berechnung der Isotopenmuster mit Hilfe der in Kap. 4.2.1 näher beschriebenen Methode erfolgte. In Bild 4-9(a) ist das Verhältnis zwischen zweitem und erstem (monoisotopischen) Isotopen-Signal als Funktion der Masse für alle Aminosäure-Kombinationen im Massenintervall zwischen 999 u und 1001 u aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert mindestens eine Aminosäure-Kombination und damit jeweils eine große Anzahl an möglichen Permutationen (Peptid-Sequenzen). Auf der Massenachse kann auch hier deutlich die Trennung zwischen besetzten und unbesetzten Bereichen beobachtet werden. Dargestellt sind die Cluster mit der nominalen Masse 999 u, mit Peptidmassen von 999,1 u bis 999,7 u, und der nominalen Masse 1000 u, mit Peptidmassen von 1000,1 u bis 1000,7 u.

In Bild 4-9(b) sind die Häufigkeiten der Aminosäure-Kombinationen des Clusters mit einer nominalen Masse von 1000 u, abhängig von dem Isotopen-Verhältnis, nach rechts aufgetragen. Dabei wurde eine Intervall-Breite der relativen Isotopen-Intensitäten von 0,1 % zusammengefasst. Bei einer nominalen Masse von 1000 u haben maximal etwa 3000 Aminosäure-Kombinationen das innerhalb der Intervall-Breite gleiche Isotopen-Verhältnis des ersten und zweiten Isotopen-Signals. Die Verteilung in Bild 4-9(b) ergibt einen Mittelwert des Verhältnisses der Isotopenpeaks von $54,34 \% \pm 3,40 \%$. Die Intensität des

zweiten Isotopen-Signals relativ zum ersten Isotopen-Signal variiert zwischen 44,23 % und 70,62 %.

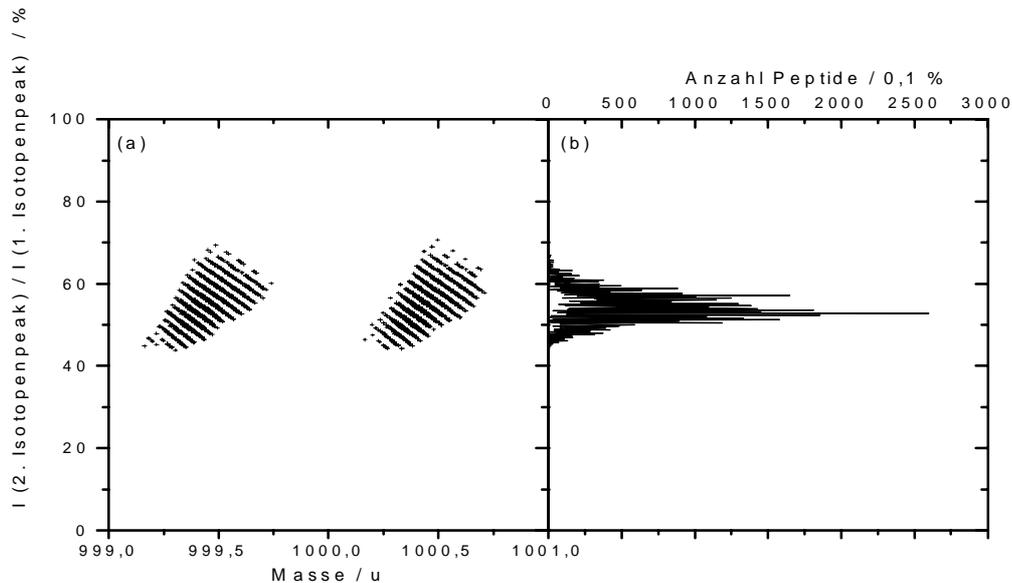


Bild 4-9: Verhältnis der Intensitäten des zweiten und ersten Isotopen-Signals für alle Aminosäure-Kombinationen im Massenintervall 999 u – 1001 u Als Funktion der Masse (a). Jedes Kreuz stellt mindestens eine Aminosäure-Kombination dar. In (b) ist die Anzahl der Aminosäure-Kombinationen pro 0,1% Intensitätsintervall für den Cluster zwischen 1000 u und 1001 u aufgetragen.

Für den dritten (und weitere) Isotopenpeaks ist die Variation der Intensitätsverteilung größer als für den ersten Isotopenpeak. In Tabelle 4-4 sind neben den Mittelwerten und Standardabweichungen auch die relativen Fehler, die sich als Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert ergeben, in Prozent angegeben. Dieser steigt bei dem 3. Isotop im Vergleich zum zweiten Isotop sprunghaft an.

Tabelle 4-4: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (ST), Maximale (Max) und minimale (Min) relative Isotopen-Intensitäten der einzelnen Isotopenpeaks (2. – 5.) für Aminosäure-Kombinationen mit einer nominalen Masse von 1000 u. In der letzten Zeile ist die relative Abweichung (ST/MW) angegeben.

Isotopenpeak Nr.	2.	3.	4.	5.
MW / %	54,342	21,377	6,173	1,534
ST / %	3,399	4,473	2,340	0,962
Max / %	70,624	48,635	19,243	10,478
Min / %	44,227	14,287	3,230	0,550
ST/MW	6,25 %	20,92 %	37,91 %	62,71 %

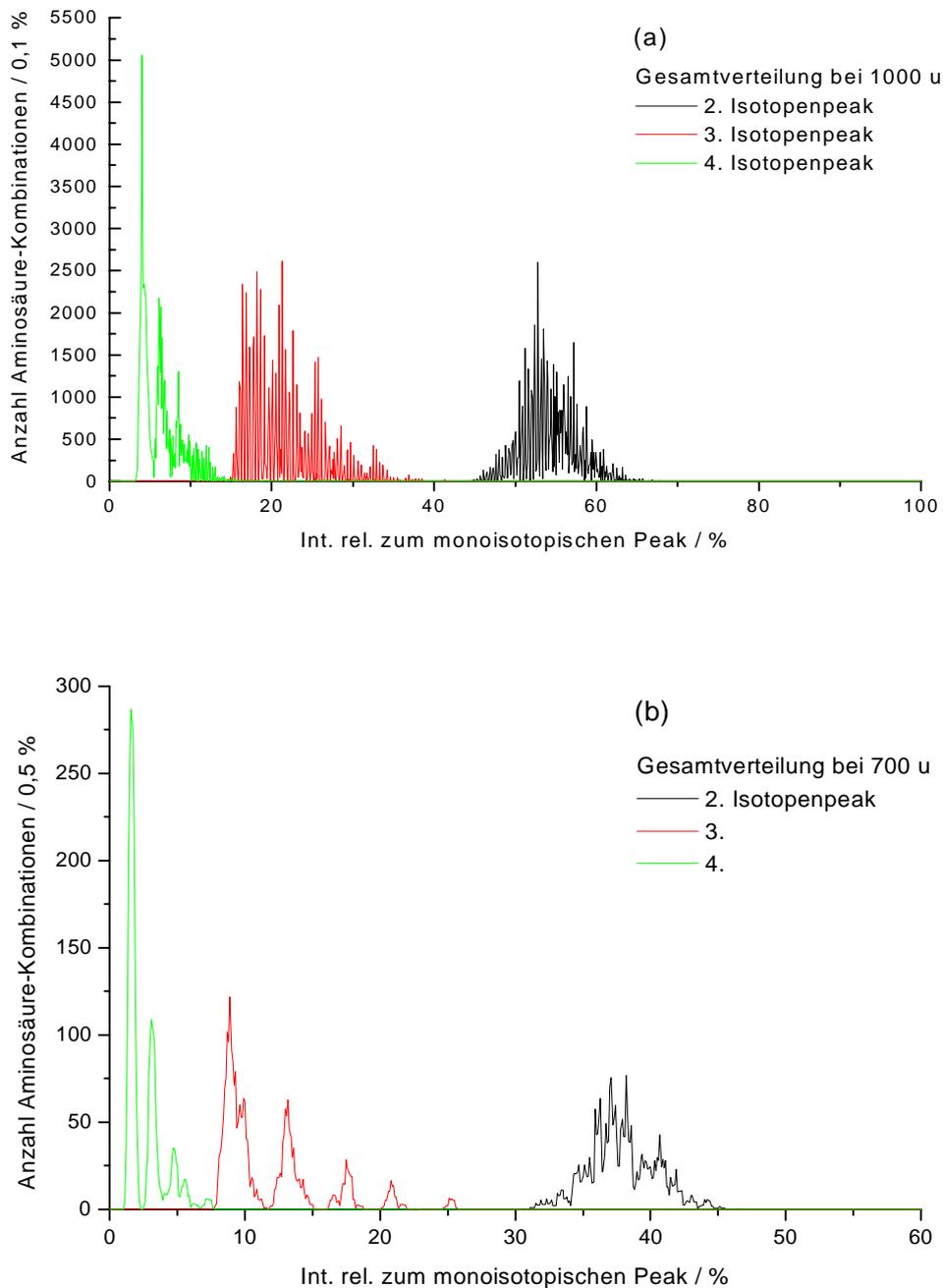


Bild 4-10: Häufigkeitsverteilung der relativen Intensitäten des 2., 3. und 4. Isotopenpeaks aller theoretischen Aminosäure-Kombinationen bei einer nominalen Masse von (a) 1000 u mit einer Intervall-Breite von 0,1 % und (b) 700 u bei einer Intervall-Breite von 0,5 %

Die Verteilung der relativen Isotopen-Intensitäten der Isotopen-Signale der Aminosäure-Kombinationen bei einer nominalen Masse von 1000 u ist in Bild 4-10(a) zu sehen. Hier fällt neben der wesentlich größeren relativen Breite der Verteilungen des 3. und 4. Isotopenpeaks auf, daß die Verteilungen der höheren Isotopenpeaks, im Gegensatz zu der Verteilung des 2. Isotopenpeaks, mehrere Maxima besitzen. Dies wird bei einer kleineren nominalen Masse (700 u in Bild 4-10(b)) deutlicher. Hier sind die Häufigkeitsverteilungen des 3. und 4. Isotopenpeaks mit einer Intervall-Breite von 0,5 % zu sehen. Die Verteilungen fallen zwischen den Maxima bis auf 0 Kombinationen zurück, das heißt, es

existieren bei 700 u für das 3. Isotopen-Signal Werte der relativen Isotopen-Intensitäten, die nicht auftreten können. Dieser Effekt wird in Kapitel 4.2.5 näher untersucht.

Die relativen Fehler der Gesamtverteilung für die höheren Isotopenpeaks liegen bei 700 u, höher als bei 1000 u (31,50 % für den 3. Isotopenpeak im Vergleich zu 20,92 % bei 1000 u), während der relative Fehler des 2. Isotopenpeaks sich nicht stark ändert. Alle Werte sind dabei bezogen auf den 1. Isotopenpeak.

4.2.4 Variation der Isotopenmuster mit der Masse

4.2.4.1 Kombinatorische Bestimmung der Aminosäure-Kombinationen

Bislang wurde die Variation der Isotopenmuster bei einer festen nominalen Masse betrachtet. Um ein massenabhängiges mittleres Isotopenmuster zu bestimmen, wurden bis zu einer Masse von 1100 u für sämtliche Aminosäure-Kombinationen die Isotopenmuster berechnet und zu den in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Massenclustern zusammengefasst. Daraus ergibt sich für jede nominale Masse ein mittleres Isotopenmuster, von dem die Mittelwerte der Intensitäten des zweiten und dritten Isotopenpeaks relativ zum monoisotopischen Peak in Bild 4-11 dargestellt sind. Zusätzlich sind in diesem Bild die Standardabweichung nach oben und unten als dünne Linien, sowie der vollständige Variationsbereich als grau unterlegte Fläche aufgetragen.

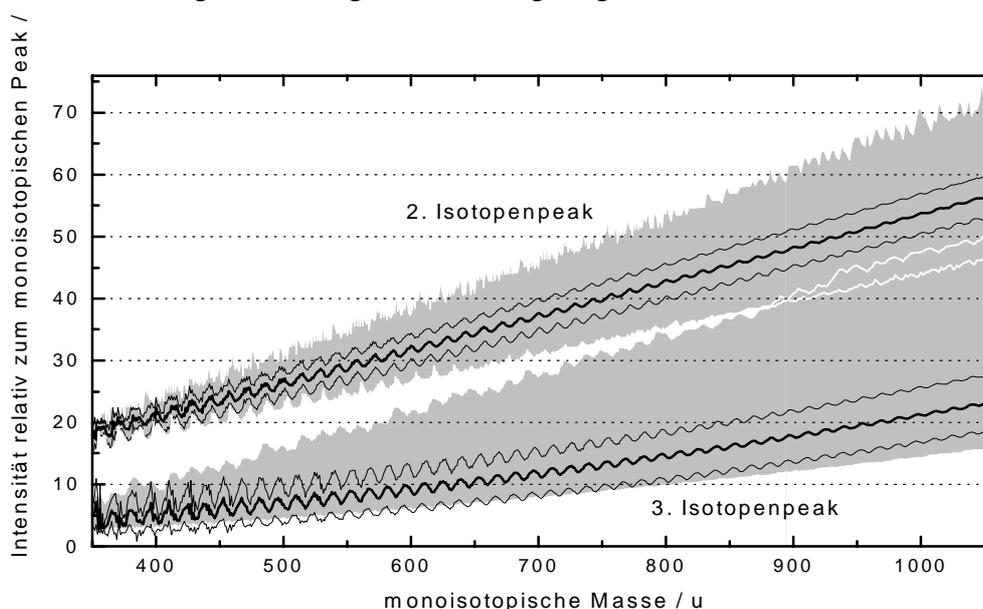


Bild 4-11: Die gemittelten Intensitäten und Standardabweichungen des zweiten und dritten Isotopenpeaks, relativ zum ersten Isotopenpeak als Funktion der Masse. Die Werte wurden über alle theoretisch möglichen Aminosäure-Kombinationen im Massenintervall 350 u bis 1100 u berechnet. Der gesamte Intensitätsbereich, der erreicht wird, ist grau unterlegt

Wie schon bei der Häufigkeitsverteilung der Aminosäure-Kombinationen in Bild 4-6, wird auch bei der relativen Isotopen-Intensität eine Periodizität von 14 u beobachtet, dessen Amplitude hier jedoch mit steigender Masse kleiner wird. Darüber hinaus fällt auf, daß die Modulationen der Häufigkeitsverteilung und der Isotopen-Intensitäten nicht die gleiche Phase besitzen. Die Modulationen der Isotopen-Intensitäten des zweiten und dritten

Isotopenpeaks weisen verschiedene Phasen auf, so daß die Maxima nicht bei den gleichen Massen auftreten (Tabelle 4-5).

Die Modulation der relativen Intensitäten der Isotopenpeaks läßt sich durch die begrenzte Anzahl und diskrete Form der Aminosäure-Kombinationen erklären. Zur Berechnung des Isotopenmusters werden stets Summenformeln aus ganzzahligen Atom-Anzahlen gebildet. Bei kleinen Massen gibt es im Massenintervall, über das gemittelt wird, eine relativ geringe Anzahl an Aminosäure-Kombinationen, die zum Teil noch die selben Atom-Summenformeln besitzen. Beispielsweise gibt es im Massenintervall 500-501 u insgesamt 88 Aminosäure-Kombinationen und daraus 28 verschiedene Atom-Summenformeln. Liegt die Masse um 1 u höher, so entstehen zwar mehr Aminosäure-Kombinationen (96) aber weniger Atom-Summenformeln (27). Die Unterschiede der Atom-Summenformeln benachbarter Massen fallen bei geringen Anzahlen stärker ins Gewicht, als bei großen Massen mit deutlich mehr Kombinationen (~27000 bei der Masse 1000 u), da hier die Anteile der Atome besser gemittelt werden. Die Periode von 14 u kann durch den Kohlenstoff-Anteil erklärt werden. Dieser trägt den Hauptanteil zur Intensität der Isotopen-Signale bei und variiert bei Peptiden zum größten Teil durch CH₂ Einheiten.

Tabelle 4-5: Maxima der gemittelten Isotopen-Intensitäten und der Anzahl der Aminosäure-Kombinationen im Intervall von 750 – 850 u

2. Isotopenpeak	3. Isotopenpeak	Anzahl AA-Kombinationen
758	754	761
772	768	776
786	783	791
800	797	805
814	812	820
828	826	835
844	840	849

4.2.4.2 Mittelung durch zufällig ausgewählte Aminosäure-Kombinationen

Der Rechenaufwand zur Bestimmung sämtlicher Aminosäure-Kombinationen und deren Isotopenmuster ist sehr hoch. Deshalb ist es nicht möglich, gemittelte Isotopenmuster für jede beliebige Peptidmasse auf kombinatorischem Weg zu berechnen.

Für Massen, die oberhalb von 1100 u liegen, werden zufällige Aminosäure-Kombinationen bestimmt und deren Masse und Isotopenmuster berechnet. Die Ergebnisse werden nach Masse sortiert statistisch erfaßt, indem die Anzahl der Aminosäure-Kombinationen pro Massenintervall, die Summe und die Summe der Quadrate der Peak-Intensitäten gespeichert werden. Aus diesen Daten lassen sich Mittelwert und Standardabweichung für die gemittelten Isotopenmuster jeder nominalen Masse bestimmen.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die Isotopenmuster nach weiteren Eigenschaften zu klassifizieren. Eine Klassifizierung nach der Anzahl der Schwefelatome wird in

Kapitel 4.2.5 durch Auswahl zufälliger Aminosäure-Kombinationen bis 10000 u durchgeführt.

Die nicht klassifizierten Mittelwerte einer zufälligen Auswahl von $1,5 \cdot 10^6$ Sequenzen sind in Bild 4-12 in doppelt logarithmischer Darstellung aufgetragen. Mit diesen Daten werden im Mittel etwa 150 Sequenzen in einem Massenintervall von 1 u zusammengefasst. In der doppelt logarithmischen Darstellung ergeben sich Geraden für die relativen Isotopen-Häufigkeiten, so daß für die Intensität des n-ten Isotopenpeaks I_n an der Masse M ein Potenzgesetz in der Form

$$I_n(M) = A M^P$$

erwartet werden kann. Hierbei sind A und P der Achsenabschnitt die Steigung im doppelt logarithmischen Diagramm. Eine vereinfachte Herleitung des Potenzgesetzes wird in Kapitel 4.2.4.3 beschrieben.

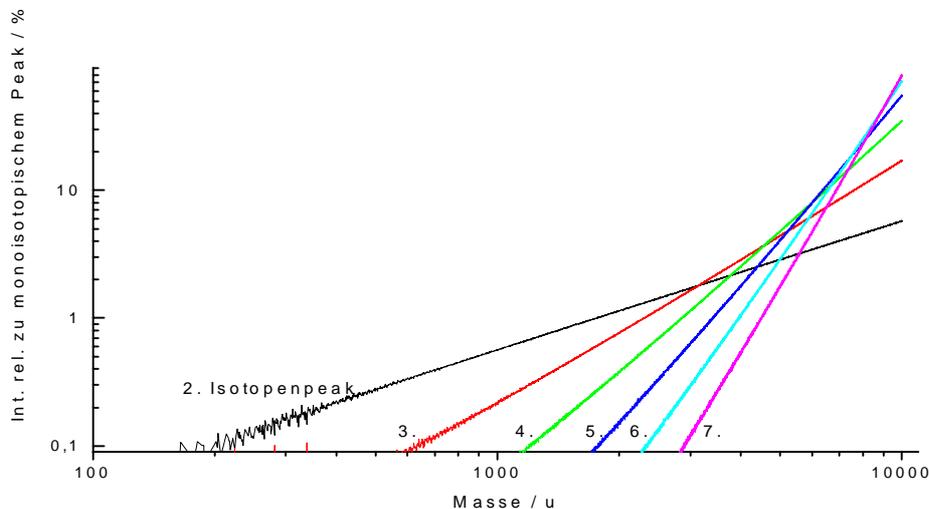


Bild 4-12: Massenabhängigkeit der relativen Intensitäten der Isotopenpeaks aus einer zufälligen Auswahl von $1,5 \cdot 10^6$ Sequenzen. Die Darstellung erfolgt in doppelt logarithmischer Form.

Der Vergleich der Mittelwerte der Isotopenmuster bei der Bestimmung durch alle Aminosäure-Kombinationen und bei der Bestimmung durch eine zufällige Auswahl von Sequenzen ist in Bild 4-13 für die relativen Intensitäten des zweiten und dritten Isotopenpeaks zum monoisotopischen Peak zu sehen. Die Mittelwerte bei der Bestimmung einer zufälligen Auswahl von Sequenzen liegen innerhalb des Intervalls der Standardabweichung um die kombinatorischen Mittelwerte.

Es ergibt sich eine auffällige Abweichung des Mittelwertes des zweiten Isotopenpeaks. Diese Abweichung kann durch die Multiplizität der Aminosäure-Kombinationen erklärt werden. Bei der kombinatorischen Mittelung wird jede Aminosäure-Kombination genau einmal berücksichtigt, während bei der Zufallsauswahl jede Aminosäure-Position unabhängig und zufällig bestimmt wird. Auf diese Weise können Permutationen der selben Aminosäure-Kombination mehrfach in die Mittelung der Zufallssequenzen aufgenommen werden. Aminosäure-Kombinationen mit einer höheren Intensität des zweiten Isotopenpeaks sind offenbar häufiger aus vielen verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt, so daß mehr Permutationen existieren. Mit den zufällig ausgewählten

Sequenzen wird folglich eine Näherung der Permutationen und nicht der Kombinationen durchgeführt. Die Mittelwerte der Intensitäten sind, durch unterschiedlichen Häufigkeitsverteilungen bei der Permutation und der Kombination, verschieden.

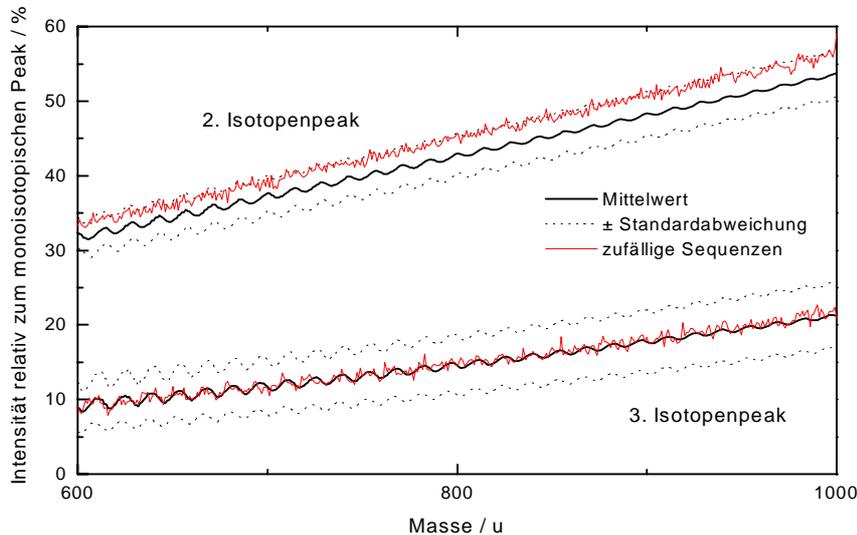


Bild 4-13: Vergleich der kombinatorisch bestimmten Isotopenmuster (inkl. Standardabweichung) mit dem Mittelwert aus zufällig bestimmten Sequenzen.

4.2.4.3 Extrapolation der gemittelten Isotopen-Verhältnisse mit Polynomen

Es stellt sich die Frage, ob das Isotopen-Verhältnis der Isotopenpeaks relativ zum monoisotopischen Signal durch ein Polynom angenähert werden kann.

In der in Bild 4-12 gezeigten doppelt logarithmischen Darstellung, ergibt der Zusammenhang zwischen Isotopen-Intensität und Masse eine Geraden, so daß ein Potenzgesetz angewendet werden kann. In diesem Abschnitt wird eine Herleitung vorgestellt, die diesen Zusammenhang plausibel erklären kann.

Zur Vereinfachung wird davon ausgegangen, daß nur eine einzige Atomsorte einen Beitrag zum Isotopenmuster liefert, und daß diese Atome nur zwei verschiedene Isotope besitzen (z.B. Kohlenstoff mit ^{12}C und ^{13}C). Die Intensität des $(k+1)$ -ten Isotops, bei dem k schwere Isotope vorkommen, ist bei einem Molekül, das insgesamt n Atome der Atomsorte enthält, durch eine Binomial-Verteilung berechenbar (Kapitel 4.2.1). Hierbei ist p die Isotopenhäufigkeit des leichteren und $(1-p)$ die Isotopenhäufigkeit des schwereren Isotops des Atoms:

$$I(k) = \binom{n}{k} p^{n-k} (1-p)^k$$

Die Binomial-Koeffizienten sind folgendermaßen bestimmt:

$$\binom{n}{k} = \frac{n!}{k! (n-k)!}$$

Für das monoisotopische Signal gilt $k = 0$. Damit ist die Intensität des Signals

$$I(0) = 1 p^n (1-p)^0 = p^n .$$

Die Häufigkeiten der nächst höheren Isotopen-Signale sind

$$I(1) = \binom{n}{1} p^{n-1} (1-p)^1 = \frac{n!}{(n-1)!} p^{n-1} (1-p) = n p^{n-1} (1-p)$$

und

$$I(2) = \binom{n}{2} p^{n-2} (1-p)^2 = \frac{n!}{2 (n-2)!} p^{n-2} (1-p)^2 = \frac{1}{2} n (n-1) p^{n-1} (1-p).$$

Die Isotopen-Intensität des k-ten Isotops wird experimentell als das relative Verhältnis der Signale zum monoisotopischen Peak gemessen, das heißt als $I(k)/I(0)$. Daraus ergibt sich im Fall der ersten drei Isotopen-Signale ($k=0,1,2$):

$$I(0) / I(0) = 1,$$

$$\frac{I(1)}{I(0)} = \frac{n p^{n-1} (1-p)}{p^n} = \frac{1-p}{p} n \sim n$$

und

$$\frac{I(2)}{I(0)} = \frac{\frac{1}{2} n (n-1) p^{n-1} (1-p)}{p^n} = \frac{1}{2} \left(\frac{1-p}{p} \right)^2 (n^2 - n) \sim n^2$$

In den Gleichungen stellt n die Zahl der Atome dar. Wird ein Cluster aus nur einer Atomsorte vorausgesetzt, so erhält man eine Proportionalität zwischen Masse und Zahl der Atome (Masse $\sim n$). Daraus folgt für das zweite Isotopen-Signal eine relative Isotopen-Intensität proportional zur Masse. Für das dritte Isotopen-Signal ergibt sich eine relative Intensität proportional zu $n(n-1)$, so daß eine quadratische Abhängigkeit zur Masse entsteht. Für höhere Isotopen-Signale setzt sich diese Entwicklung fort, und es ergibt sich für das 4. Isotopen-Signal mit $n(n-1)(n-2)$ ein Polynom der dritten Ordnung, usw.

Der in Kapitel 4.2.4.2 für Aminosäure-Kombinationen beobachtete Potenz-Zusammenhang besitzt einen nicht ganzzahligen Exponenten. Dieser läßt sich dadurch erklären, daß verschiedene Atomsorten einen Beitrag zum Isotopenmuster liefern.

4.2.4.4 Fit der Isotopenmuster

Mit Hilfe der in Kapitel 4.2.4.2 und 4.2.4.3 durchgeführten Näherungen läßt sich das Isotopenmuster für jede beliebige Masse näherungsweise berechnen. Zunächst wird eine Extrapolation mit Polynomen und anschließend eine Extrapolation mit einer Potenzfunktion beschrieben. Für das n-te Isotopen-Signal wird hierfür ein Polynom (n-1)-ter Ordnung, beispielsweise ein Polynom 1. Ordnung (Geraden-Gleichung) für das zweite Isotopen-Signal, verwendet.

In Tabelle 4-6 sind die Koeffizienten für eine Extrapolation der Massenabhängigkeit der gemittelten Isotopenmuster aus Bild 4-12 mit Polynomen angegeben. In der ersten Spalte ist die Nummer des Isotopenpeaks N aufgeführt, in den weiteren Spalten der Tabelle die Koeffizienten A und B_j des Polynoms,

$$I(N,M) = A + \sum_{j=1}^6 B_j M^j .$$

Für den ersten Isotopenpeak gilt $I(1,M) = 1$, da alle Intensitäten relativ zu diesem bestimmt werden. Für den zweiten Isotopenpeak gilt ein linearer Zusammenhang, wodurch alle Koeffizienten außer A und B_1 Null gesetzt werden.

Tabelle 4-6: Fitparameter eines Polynoms 6-ter Ordnung für die Massenabhängigkeit der gemittelten Isotopenmuster aus Bild 4-12

Peak Nr. N	A	B₁	B₂	B₃	B₄	B₅	B₆
2	-0,01203	5,75914*10 ⁻⁴	0	0	0	0	0
3	-7,91257*10 ⁻⁴	5,23445*10 ⁻⁵	1,65798*10 ⁻⁷	0	0	0	0
4	0,00231	-4,67003*10 ⁻⁶	3,28761*10 ⁻⁸	3,17666*10 ⁻¹¹	0	0	0
5	-0,00359	7,44656*10 ⁻⁶	-3,06266*10 ⁻⁹	1,01317*10 ⁻¹¹	4,541*10 ⁻¹⁵	0	0
6	0,00416	-1,20339*10 ⁻⁵	9,36562*10 ⁻⁹	-2,17577*10 ⁻¹²	2,21303*10 ⁻¹⁵	5,09747*10 ⁻¹⁹	0
7	-0,00395	1,47369*10 ⁻⁵	-1,59768*10 ⁻⁸	7,27625*10 ⁻¹²	-1,34114*10 ⁻¹⁵	4,26964*10 ⁻¹⁹	4,43608*10 ⁻²³

Eine Potenzfunktion der Form

$$I_N(M) = AM^P$$

hat gegenüber einem Polynom den Vorteil, lediglich zwei Parameter zu benötigen. In Tabelle 4-7 sind die Parameter für die Extrapolation, der in Bild 4-12 dargestellten gemittelten Isotopen-Intensitäten, mit einer Potenzfunktion aufgelistet. Die ebenfalls unten angegebenen relativen Fehler der Parameter liegen in allen Fällen unter 1 % für A und 0,02 % für P. Schließlich sind in der letzten Spalte die Summen der quadratischen Abweichungen von Potenzfunktion und Datenwerten (Chi²-Werte) angegeben.

Tabelle 4-7: Fitparameter einer Potenzfunktion $I_N(M) = AM^P$ für die Massenabhängigkeit der gemittelten Isotopenmuster aus Bild 4-12

Peak Nr. N	A	Rel. Fehler A	P	Rel Fehler P	Chi²
2	0,00055	0,145%	1,01	0,016%	0,00033
3	2,63*10 ⁻⁰⁷	0,163%	1,95	0,009%	0,00081
4	1,05*10 ⁻¹⁰	0,290%	2,88	0,011%	0,00404
5	3,92*10 ⁻¹⁴	0,457%	3,79	0,013%	0,01219
6	1,41*10 ⁻¹⁷	0,681%	4,68	0,016%	0,02581
7	4,97*10 ⁻²¹	0,978%	5,55	0,019%	0,04074

Der Parameter A kann als reiner Normierungs-Faktor angesehen werden, während P die Steigung im doppelt logarithmischen Diagramm darstellt. Es fällt auf, daß die gerundeten Werte von P stets N - 1 ergeben aber kleiner sind (außer für N = 2). Dies kann mit der

Näherung aus Kapitel 4.2.4.3 in Einklang gebracht werden. Die Abweichung von $N - 1$ wird mit höheren Isotopenpeaks immer größer. In der Näherung ist der Hauptbeitrag zwar ein Term der Form M^{N-1} , mit steigendem N fallen jedoch die kleineren Terme stärker ins Gewicht. Dadurch wird der Exponent, der als Mittelung über alle Terme verstanden werden kann, kleiner.

Der Vergleich beider Näherungen ergibt über weite Massenbereiche ähnliche Ergebnisse. Die Werte der Potenzfunktion weichen jedoch wesentlich stärker von den tatsächlichen Mittelwerten der Isotopen-Intensität ab, als die Werte der Polynome. Für eine allgemeine Näherung der Isotopenmuster ist daher ein Polynom, trotz der größeren Anzahl an Parametern, besser geeignet. In Kapitel 4.2.5.2 wurde für die Klassifizierung nach Schwefelanteil dennoch eine Näherung mit einer Potenzfunktion verwendet, da durch die zwei Parameter die Schwefelabhängigkeit deutlicher wird, als bei einem Polynom.

Tabelle 4-8: Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Isotopenpeaks bei einer nominalen Masse von 1000 u, bei Klassifizierung nach Anzahl der Schwefelatome, für den 2., 3. und 4. Isotopenpeak. MW ist der Mittelwert, ST die Standardabweichung und ST/MW die relative Abweichung vom Mittelwert in Prozent

Schwefel- atome	0				1				2			
	2.	3.	4.		2.	3.	4.		2.	3.	4.	
Peak Nr.	2.	3.	4.		2.	3.	4.		2.	3.	4.	
MW	55,071	17,878	4,266		54,475	21,853	6,468		53,419	25,667	8,542	
ST	3,382	1,472	0,410		3,086	1,340	0,496		3,193	1,279	0,594	
ST/MW	6,14%	8,23%	9,61%		5,66%	6,13%	7,67%		5,98%	4,98%	6,95%	

Schwefel- atome	3				4				5			
	2.	3.	4.		2.	3.	4.		2.	3.	4.	
Peak Nr.	2.	3.	4.		2.	3.	4.		2.	3.	4.	
MW	51,760	29,206	10,371		51,378	33,159	12,363		51,352	37,359	14,481	
ST	3,108	1,204	0,702		2,155	0,913	0,602		2,056	0,857	0,662	
ST/MW	6,00%	4,12%	6,77%		4,19%	2,75%	4,87%		4,00%	2,29%	4,57%	

4.2.5 Klassifizierungsmöglichkeiten der Isotopenmuster (Schwefelanteil)

4.2.5.1 Klassifizierung nach Schwefelanteil

Bei der Häufigkeitsverteilung der relativen Isotopen-Intensitäten des 3. und höherer Isotopenpeaks treten mehrere Maxima auf (Bild 4-10(a) und (b)). Diese lassen sich durch den unterschiedlichen Schwefelanteil erklären. Werden die Aminosäure-Kombinationen nach dem Schwefelanteil klassifiziert, was bedeutet, daß die Häufigkeitsverteilungen für Aminosäure-Kombinationen mit einer fest vorgegebenen Anzahl an Schwefelatomen bestimmt werden, so ergeben sich für den Cluster mit der nominalen Masse 1000 u die in Bild 4-14 gezeigten Verteilungen der Häufigkeiten für Aminosäure-Kombinationen mit 0 bis 5 Schwefelatomen. Die einzelnen Maxima aus Bild 4-10 können den verschiedenen Schwefelanteilen zugeordnet werden. Die Variationen der klassifizierten Verteilungen sind deutlich geringer als die Variation der Gesamtverteilung. Dazu sind in Tabelle 4-8 die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (ST) und relativen Abweichungen (ST/MW) der Häufigkeitsverteilungen für das 2., 3. und 4. Isotopen-Signal bei einer nominalen Masse von 1000 u dargestellt. Die relativen Abweichungen sind bei den klassifizierten Verteilungen des 2. Isotopen-Signals im Vergleich zu der Gesamtverteilung nur leicht reduziert (siehe Tabelle 4-4), während diese bei dem 3. und 4. Isotopen-Signal deutlich geringer werden. Dort gehen die relativen Abweichungen von 20,92 % im unklassifizierten Fall auf 2 - 8 % nach Klassifizierung für das 3. Isotopen-Signal und von 37,91 % auf 4,6 – 9,6 % für das 4. Isotopen-Signal zurück.

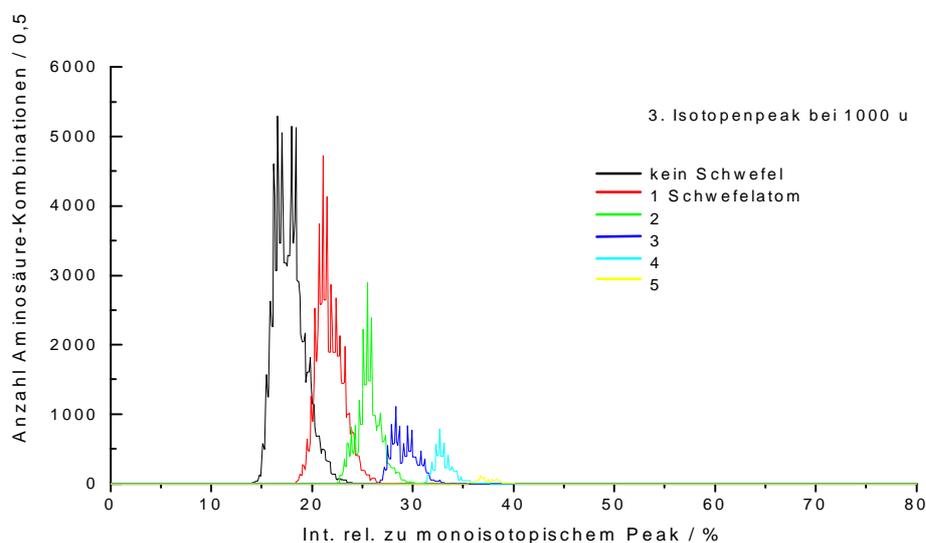


Bild 4-14: Häufigkeitsverteilung der Intensitäten pro 0,5 % Intervall des 3. Isotopenpeaks bei 1000 u, klassifiziert nach der Anzahl der Schwefelatome

Die Verteilung der Aminosäure-Kombinationen in einem Masse/Intensität-Diagramm für eine nominale Masse von 1000 u ist in Bild 4-15 zu sehen. Hierbei wurden die Aminosäure-Kombinationen, klassifiziert nach der Anzahl der Schwefelatome, dargestellt. Neben der bereits in Bild 4-14 dargestellten Trennung der Intensitätsverteilungen für das 3.

Isotopen-Signal, läßt sich erkennen, daß sich die Verteilungen für das 2. Isotopen-Signal nicht stark mit der Anzahl der Schwefelatome ändern und daher überlagern.

Ferner läßt sich in Bild 4-15 beobachten, daß sich der Massenschwerpunkt des Clusters bei einer nominalen Masse von 1000 u mit zunehmender Anzahl der Schwefelatome zu kleineren Massen verschiebt. In der unten aufgeführten Tabelle 4-9 sind die Schwerpunktmassen abhängig von der Anzahl der Schwefelatome aufgetragen. Die Massenverschiebung kann, im Vergleich zu anderen in Biomolekülen vorkommenden Atomen, durch die relativ geringe Atommasse von Schwefel erklärt werden. Das leichteste Isotop von Schwefel, ^{32}S , ist mit seiner Masse von $M = 31,97297$ u leichter als beliebige Kombinationen aus C, H, N oder O, welche die nominale Masse 32 ergeben. Zwei Sauerstoffatome beispielsweise ergeben mit 31,98983 eine um 0,0169 u schwerere Masse, so daß der Austausch der Schwefelatome durch Sauerstoffatome zu einem schwereren Molekül führen würde. Die anderen Atome sind relativ zu ihrer nominalen Masse schwerer als Sauerstoff und Schwefel, so daß die Massenerhöhung in diesen Fällen größer ausfallen würde.

Tabelle 4-9: Schwerpunktmasse, maximale und minimale Masse für verschiedene Schwefelklassen für Aminosäure-Kombinationen bei einer nominalen Masse von 1000 u

<i>Schwefel</i>	<i>Mittl. Masse</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
0	1000,501	1000,302	1000,711
1	1000,463	1000,269	1000,670
2	1000,421	1000,251	1000,594
3	1000,380	1000,233	1000,515
4	1000,360	1000,227	1000,482
5	1000,333	1000,234	1000,453

Weiter ist in Bild 4-14 eine deutliche Reduzierung der Anzahl möglicher Kombinationen bei verschiedenen Schwefel-Anzahlen zu sehen.

Die Tabelle 4-10 zeigt die Anzahl und den relativen Anteil der Aminosäure-Kombinationen, mit vorgegebener Anzahl an Schwefelatomen, für Peptide mit nominalen Massen von 800 u, 1000 u und 1170 u. In etwa der Hälfte der Aminosäure-Kombinationen ist kein Schwefel enthalten. Die Anzahl der möglichen Kombinationen halbiert sich nahezu mit jedem zusätzlichen Schwefelatom.

Steigt die Masse, dann sinkt der relative Anteil der schwefelfreien Aminosäure-Kombinationen. Dies ist leicht verständlich, da bei größeren Massen die Sequenzen länger werden und dadurch die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin oder Cystein häufiger auftreten können. Bei 1170 u existieren zwar 26 mal so viele Aminosäure-Kombinationen ohne Schwefel wie bei 800 u, allerdings sinkt der relative Anteil von 56,1 % auf 40,8 %.

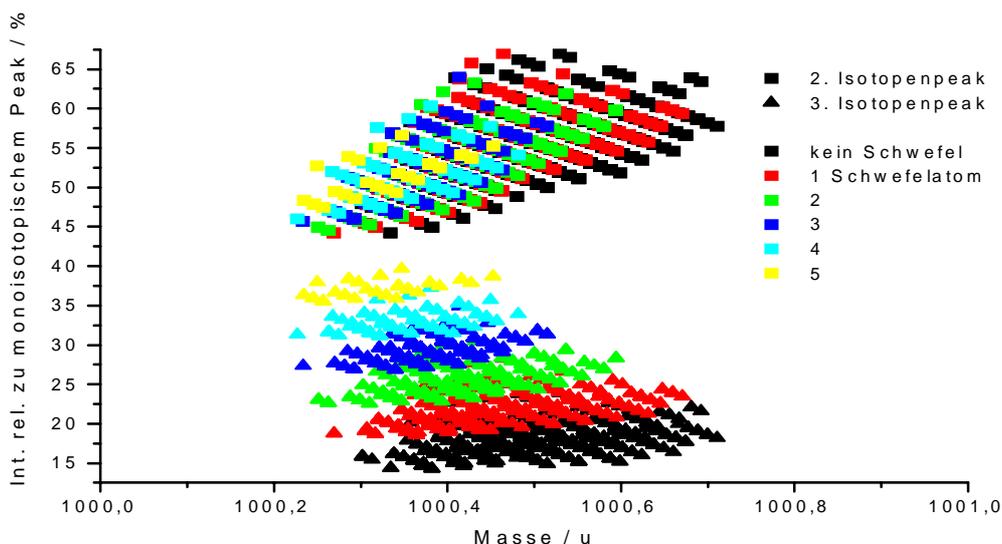


Bild 4-15: Intensitäten des 2. und 3. Isotopenpeaks relativ zum monoisotopischen Peak für alle theoretischen Aminosäure-Kombinationen im Massenintervall 1000 u – 1001 u als Funktion der Masse. Die Graustufen kennzeichnen die Anzahl der Schwefelatome in den Aminosäure-Kombinationen.

Tabelle 4-10: Anzahl der Aminosäure-Kombinationen abhängig von der Anzahl der Schwefelatome, sowie der relative Anteil bei den nominalen Massen 800 u, 1000 u und 1170 u

S	M = 800 u		M = 1000 u		M = 1170 u	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
0	2254	56,1%	15028	47,6%	60141	40,8%
1	1076	26,8%	9143	29,0%	43604	29,6%
2	410	10,2%	4285	13,6%	24202	16,4%
3	195	4,9%	2010	6,4%	12445	8,4%
4	78	1,9%	939	3,0%	5226	3,5%
5	4	0,1%	146	0,5%	1246	0,8%
6	1	0,0%	20	0,1%	307	0,2%
7	0	0,0%	3	0,0%	97	0,1%
8			2	0,0%	53	0,0%
9			0	0,0%	4	0,0%

Die absolute, denkbare Obergrenze der Anzahl an Schwefelatomen pro Peptid, ergibt sich aus der Anzahl der Cysteine (Inkrementmasse 103 u), die ein Peptid einer bestimmten Masse besitzen kann. Bei 800 u existieren maximal 7 Cysteine, bei 1170 u sind es bereits 11. Diese Zahl wird jedoch auch theoretisch häufig nicht erreicht, da die Differenzmasse häufig keiner weiteren Aminosäure entspricht. Daher können bei 800 u maximal 6 und bei 1170 u maximal 9 Schwefelatome erreicht werden.

Die Suche nach einer Peptid-Summenformel wird durch die Kenntnis der Zahl der Schwefelatome vereinfacht, da Schwefel in Aminosäuren nur bei Cystein und Methionin auftritt. Ist bei einem Peptid der Masse M beispielsweise bekannt, daß genau ein Schwefelatom vorkommt, sind nur noch Aminosäure-Kombinationen möglich, die entweder aus einem Methionin und einer schwefelfreien Kombination mit der Masse $(M - 131 \text{ u})$ oder aus einem Cystein und einer schwefelfreien Kombination mit der Masse $(M - 103 \text{ u})$ zusammengesetzt sind. Dadurch reduziert sich die Auswahl der Aminosäuren in der unbekanntenen Kombination von 20 auf 18. Zusätzlich sinkt durch die geringere Masse die Gesamtzahl der Kombinationen. Durch beide Effekte wird der Rechenaufwand zur Bestimmung aller Aminosäure-Kombinationen deutlich verringert.

Es ist daher sinnvoll eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe sich der Schwefelanteil für ein Peptid bestimmen läßt.

4.2.5.2 Extrapolation der Massenabhängigkeit der klassifizierten Isotopenmuster

Um zu bestimmen, wie sich die Isotopenmuster bei verschiedenem Schwefelgehalt mit der Masse verändern, wurden die Isotopenmuster zufällig ausgewählter Peptid-Sequenzen mit Molekül-Massen bis 10000 u bestimmt und klassifiziert nach Masse und Anzahl der Schwefelatome gemittelt. Für jede Schwefelklasse wurden über 200000 Sequenzen verwendet (Tabelle 4-11). Aus diesen Daten wurden für jeden Schwefelgehalt Tabellen erzeugt, die zu jeder nominalen Masse bis 10000 u das gemittelte Isotopenmuster enthalten. Mit Hilfe dieser Tabellen wird in Kapitel 4.2.5.3 der Schwefelgehalt von Peptiden abgeschätzt.

Tabelle 4-11: Anzahl der Zufallssequenzen bei der Klassifizierung nach Schwefelgehalt

<i>Schwefelgehalt</i>	<i>Anzahl Sequenzen</i>
0	228200
1	252064
2	252769
3	246434
4	219801
5	202087

Die Massenabhängigkeit ist in Bild 4-16 für die klassifizierten Isotopenmuster abgebildet. Es läßt sich deutlich erkennen, daß für den zweiten Isotopenpeak praktisch keine Abhängigkeit von der Anzahl der Schwefelatome besteht (alle Geraden liegen übereinander). Dagegen unterscheiden sich für das dritte und vierte Isotopen-Signal die Muster deutlich voneinander. Erst bei 2000 u beginnen die Kurven des 3. Isotopenpeaks langsam zu verschmelzen. Es ist noch zu bemerken, daß hier die Mittelwerte aufgetragen sind, so daß die tatsächlichen Verteilungen, durch die Variation, bereits früher verschmelzen (650 u für das dritte, 850 u für das vierte Isotopen-Signal).

Zur Vereinfachung kann die Massenabhängigkeit für die Schwefelklassen extrapoliert werden. Hierzu können entweder Polynome oder eine Potenzfunktion verwendet werden, wie sie bereits in 4.2.4.4 für die Gesamtverteilungen ermittelt wurden.

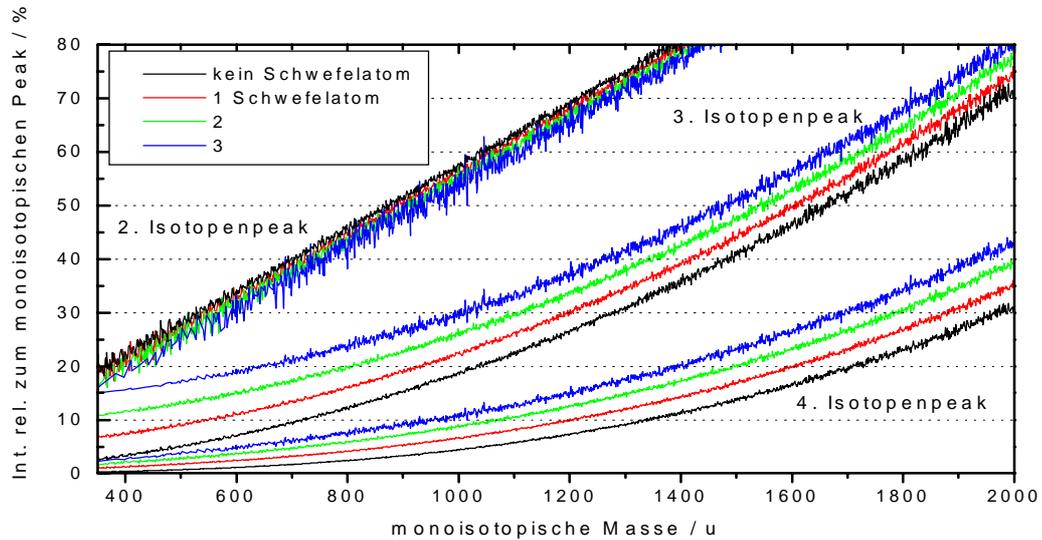


Bild 4-16: Die Abhängigkeit nach Schwefelgehalt klassifizierter Isotopenpeaks von der Masse. Gezeigt werden der 2., 3. und 4. Isotopenpeak für je 0-3 Schwefelatome

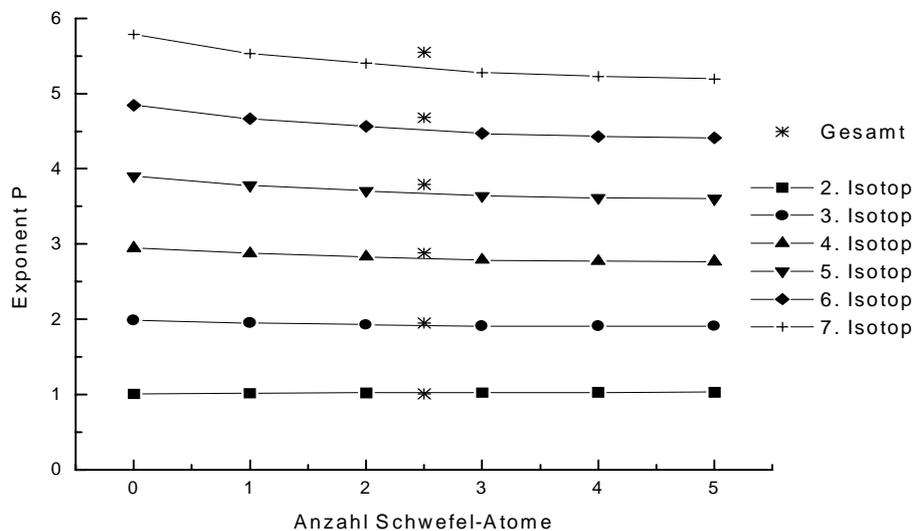


Bild 4-17: Der Exponent der Potenz-Extrapolation ändert sich mit der Anzahl der Schwefelatome

Tabelle 4-12: Parameter der Potenz-Extrapolation für die Schwefelklassen (a) Exponent P , (b) Koeffizient A

(a) P

S	2. Isotop	3. Isotop	4. Isotop	5. Isotop	6. Isotop	7. Isotop
0	1,00633	1,98154	2,9447	3,8983	4,84517	5,78658
1	1,01355	1,9504	2,87444	3,77823	4,6643	5,53518
2	1,02067	1,92945	2,82987	3,7063	4,56226	5,40087
3	1,02489	1,90853	2,78666	3,63811	4,4674	5,27838
4	1,02782	1,90554	2,77222	3,61283	4,43086	5,23011
5	1,02899	1,90998	2,76862	3,60052	4,40851	5,19592

(b) A

S	2. Isotop	3. Isotop	4. Isotop	5. Isotop	6. Isotop	7. Isotop
0	2,85E-06	2,94E-09	1,46E-12	5,18E-16	1,49E-19	3,65E-23
1	1,8862E-06	3,2792E-09	2,6077E-12	1,56E-15	7,9243E-19	3,6238E-22
2	1,2202E-06	2,9146E-09	2,4859E-12	1,8231E-15	1,198E-18	7,3219E-22
3	1,0833E-06	3,3387E-09	3,0276E-12	2,5826E-15	2,0791E-18	1,6045E-21
4	1,1912E-06	3,3016E-09	3,4891E-12	3,2616E-15	2,8907E-18	2,4851E-21
5	1,33E-06	2,99E-09	3,57E-12	3,64E-15	3,53E-18	3,38E-21

Bei einer Extrapolation mit einer Potenzfunktion für das N -te Isotopen-Signal ist der Exponent P , ähnlich wie bei der Gesamtverteilung (Tabelle 4-7), aufgerundet immer $N-1$. Die Variation des Exponenten mit der Anzahl der Schwefelatome ist in Bild 4-17 grafisch dargestellt. Die Sterne in der Mitte zeigen die Werte für die Gesamtverteilung an. In Tabelle 4-12 sind die Parameter zusätzlich tabellarisch aufgelistet. Während die Exponenten für die ersten Isotopen-Signale (2. und 3. Isotopenpeak) relativ konstant in der Nähe von 1, bzw. 2 bleiben und sogar ansteigen, fällt der Wert für die höheren Isotopenpeaks mit steigender Anzahl Schwefelatome stärker ab. Der Exponent für das 7. Isotopen-Signal fällt von 5,78 bei Null Schwefelatomen auf 5,19 bei 5 Schwefelatomen. Bei einem reinen Cluster aus einer Atomsorte mit zwei verschiedenen Isotopen, wäre $P = 6$.

Die Abnahme des Exponenten deutet auf den großen Beitrag der Schwefel-Isotope auf das Isotopenmuster der Peptide hin. Bei Schwefel wird hauptsächlich das ^{34}S -Isotop eine Massenerhöhung von 2 u bewirken, so daß das 6. Isotop aus 3 ausgetauschten Schwefel-Isotopen gebildet werden kann. Dies würde unter der vereinfachten Annahme, daß es nur zwei Schwefel-Isotope gibt, zu einer Massenabhängigkeit mit dem Exponenten $P = 3$ führen. Durch die anderen Atome wird jedoch ein Exponent von $P = 5$ angenommen. Der Gesamtexponent der Extrapolation kann stark vereinfacht als gewichtete Mittelung über diese Einzelexponenten verstanden werden, so daß er kleiner wird, wenn der Schwefelanteil steigt.

4.2.5.3 Abschätzen des Schwefelanteils bei Peptiden

Zur Abschätzung des Schwefelanteils von Peptiden werden die gemittelten, klassifizierten Isotopenmustern für 0 bis 5 Schwefelatome pro Peptid verwendet. Aus diesen werden Linear-Kombinationen derart gebildet, daß diese Kombination mit dem experimentell gemessenen Isotopenmuster übereinstimmt. Das gemessene Muster kann als ein Vektor g_i dargestellt werden, wobei i für die Nummer des Isotopenpeaks steht, beginnend bei $i=1$ für die monoisotopische Masse. Die gemessenen Isotopenmuster werden, wie die theoretischen Muster, auf das erste Isotopen-Signal normiert, so daß $g_1 = 1$ ist. Die gemittelten Isotopenmuster für eine bestimmte Masse lassen sich in Form einer Matrix $I_{i,s}$ schreiben, in der die Isotopenmuster zeilenweise übereinander stehen. Die Zeilennummer s bezeichnet dabei die Anzahl der Schwefelatome. Die gesuchte Kombination ist ein Vektor S_s , der den relativen Anteil der verschiedenen Isotopenmuster mit s Schwefelatomen am experimentellen Muster enthält. Für die Suche nach dem Schwefelanteil läßt sich somit ein lineares Gleichungssystem in Form einer Matrixgleichung aufstellen:

$$g_i = \sum_{s=0}^5 I_{i,s} S_s \quad i = 1 \dots 7.$$

In dieser vollständigen Form gibt es 7 Gleichungen für 6 unbekannte Größen (S_s), das Gleichungssystem wäre folglich überbestimmt. Die Matrix $I_{i,s}$ enthält zwar die theoretisch berechneten Isotopen-Häufigkeiten für die ersten 7 Isotopenpeaks, jedoch werden in der Regel die höchsten Isotopenpeaks bei kleineren Massen aufgrund ihres geringen Anteils nicht beobachtet. Bei Substanz P ($(M+H)^+ = 1347,74$ u) beispielsweise können häufig nur bis zu 5 Isotopenpeaks vom Untergrund unterschieden werden, so daß die beiden letzten Isotopenpeaks im Vektor g_i gleich Null gesetzt werden müssen.

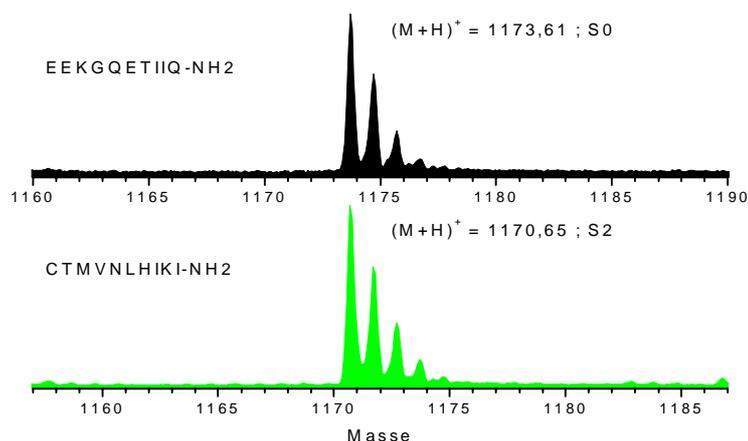


Bild 4-18: Vergleich der Isotopenmuster von zwei Peptiden ähnlicher Masse. Oben: Peptid ohne Schwefelatome; Unten: Peptid mit 2 Schwefelatomen.

Bei den in Bild 4-18 gezeigten Peptiden sind lediglich 4 Isotopenpeaks vom Untergrund unterscheidbar. Dadurch reduziert sich die Anzahl der nutzbaren Gleichungen auf 4 bis 5. Wird weiter beachtet, daß der Schwefelanteil ein Isotopenmuster im Abstand 2 u erzeugt, so ist das zweite Isotopen-Signal nicht vom Schwefelgehalt des Peptids abhängig. Obwohl

beobachtet werden kann, daß die relative Intensität des zweiten zum ersten Isotopenpeak mit zunehmendem Schwefelgehalt leicht abfällt, da der Anteil der anderen Atome sinkt, liegt diese Abnahme unter den experimentellen Intensitätsschwankungen.

Unter Intensitätsschwankungen soll in diesem Zusammenhang nicht die Variation zwischen den Laserschüssen verstanden werden, sondern die Variation des Intensitätsverhältnisses der Isotopen-Signale desselben Molekül-Ions bei verschiedenen Messungen. Diese Schwankung liegt für die ersten drei Isotopenpeaks im Mittel bei etwa 5 – 8 % relativ zu der Intensität des Signals bei der monoisotopischen Masse. Dieser Wert wurde durch wiederholte Messung einer Mischung aus mehreren Peptiden ermittelt, die über einen längeren Zeitraum als Kalibrierungs-Mischung verwendet wurde.

Durch die Vernachlässigung der Schwankung des zweiten Isotopenpeaks reduziert sich das Gleichungssystem um eine weitere Gleichung. Ebenfalls ist der erste Isotopenpeak bei allen gemittelten Mustern auf 1 normiert, so daß die Gleichung für $i = 1$ ausschließlich zur Normierung des experimentellen Isotopenmusters dient. Für die abgebildeten Beispiele bleiben demnach nur noch 2 bis 4 unabhängige Gleichungen übrig, so daß das Gleichungssystem unterbestimmt und nicht mehr eindeutig lösbar ist.

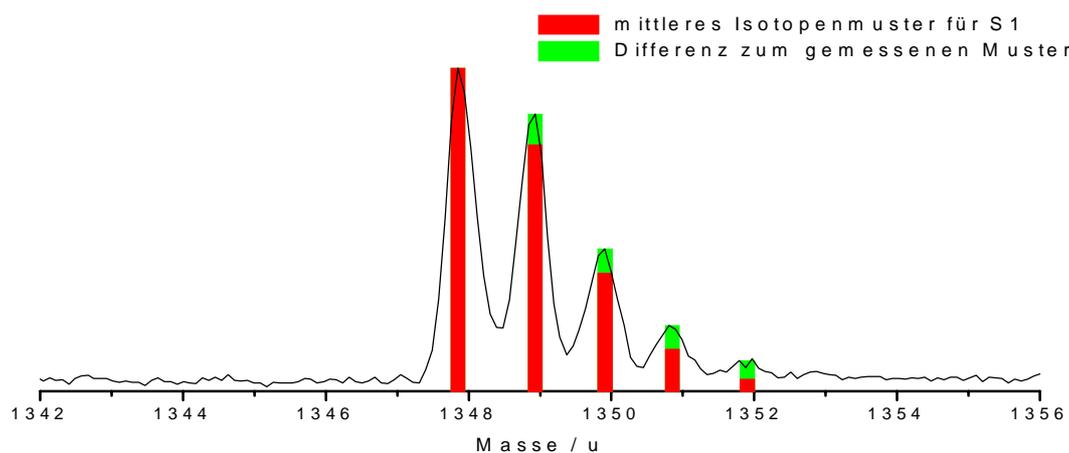


Bild 4-19: Schematische Darstellung der Berechnung der Abweichung. Die Fläche der hellen Balken wird summiert und sollte minimal sein

Ein Ausweg aus dieser Problematik ergibt sich durch die Überlegung, was eine sinnvolle Lösung für S_s sein kann. Im Idealfall wird S_s ein Einheitsvektor e_s sein, bei dem der Anteil für eine Schwefelanzahl 1 und für alle anderen Schwefel-Anzahlen 0 ist. Dies bedeutet, daß das Peptid exakt die genannte Anzahl an Schwefelatomen besitzt. Beiträge bei anderen Schwefel-Anzahlen treten nur auf, weil es sich bei den theoretischen Isotopenmustern um eine Mittelung handelt.

Für eine schnelle Testmethode zur Bestimmung des Schwefelanteils eines Peptids ist es ausreichend eine Prüfung durchzuführen, wie ähnlich sich experimentelles Isotopenmuster und gemitteltes theoretisches Isotopenmuster für eine bestimmte konstante Anzahl an Schwefelatomen sind. Die Ähnlichkeit kann über die Summe der quadratischen Abstände der einzelnen Isotopenpeaks

$$\text{BEW}(s) = \sum_i (g_i - I_{i,s}(m) e_s)^2$$

definiert werden. Dabei ist g_i das gemessene Isotopenmuster, $I_{i,s}(m)$ die Matrix aus klassifizierten, gemittelten Isotopenmustern bei der Masse m sowie e_s ein Einheitsvektor, der in der Spalte s 1 und sonst 0 ist. $\text{BEW}(s)$ ist die Bewertungsgröße für jede Schwefelanzahl.

In Bild 4-19 ist anhand eines Substanz P-Isotopenmusters die Berechnung von $\text{BEW}(s)$ schematisch dargestellt. Die dunklen Balken stellen dabei das gemittelte Isotopenmuster für Peptide mit 1 Schwefelatom und die hellen Balken die Abweichungen der experimentellen Werte vom Mittelwert dar.

4.2.5.4 Ergebnisse der Schätzung

Die Abweichung der gemittelten Isotopenmuster der Schwefelklassen vom experimentell gemessenen Isotopenmuster ist für vier Peptide mit 0 bis 3 Schwefelatomen in Bild 4-20 ausführlich dargestellt. Der Pfeil zeigt auf die korrekte Schwefelanzahl der Peptide. In den Beispielen liegt hier auch das Minimum der Abweichung, so daß für alle Beispiele die Schwefelanzahl durch die gemittelten Muster richtig bestimmt wurde.

Zusätzlich sind die Werte der quadratischen Abweichung $\text{BEW}(s)$ in Tabelle 4-13 angegeben. Die minimale Abweichung ist fett hervorgehoben, wobei die absoluten Werte keine große Aussagekraft haben. Wichtiger sind die relativen Verhältnisse des Wertes im Minimum zu den übrigen Abweichungen. In der letzten Zeile in Tabelle 4-13 ist dazu das Verhältnis aus zweitkleinster (BEW_2) und kleinster (BEW_{Min}) Abweichung angegeben. Je größer dieses Verhältnis $\text{BEW}_2/\text{BEW}_{\text{Min}}$ ist, um so besser ist die Übereinstimmung des experimentellen Isotopenmusters mit dem gemittelten Isotopenmuster bei minimaler Abweichung.

Das erste Peptid (EEKGQETIIQ-NH_2) hat mit $\text{BEW}_2/\text{BEW}_{\text{Min}} = 1,09$ den mit Abstand kleinsten Wert, so daß in diesem Fall die Bestimmung zwar richtig erfolgt ist, aber bei einer kleinen Variation der Signalintensitäten im experimentellen Spektrum, wäre eine Verschiebung des Minimums auf eine falsche Position möglich. Bei den anderen Peptiden ist $\text{BEW}_2/\text{BEW}_{\text{Min}}$ wesentlich größer, so daß hier die Sicherheit bei der Bestimmung der Schwefelanzahl höher ist.

Tabelle 4-13: Abweichung der experimentellen Isotopenmuster von den gemittelten Isotopenmustern. In der letzten Zeile steht das Verhältnis zwischen zweit-niedrigster und niedrigster Abweichung. (a) M25SL9: EEKGQETIIQ-NH₂, (M+H)⁺ = 1173,61 u, (b) Substanz P: RPKPQQFFGLM-NH₂, (M+H)⁺ = 1347,74 u, (c) M27SL9: CTMVNIHIKI-NH₂, (M+H)⁺ = 1170,65 u, (d) M13SL9: TRDYMMHMDP-NH₂, (M+H)⁺ = 1295,53 u

S	M25SL9 (S=0)	Subst. P (S=1)	M27SL9 (S=2)	M13SL9 (S=3)
0	0,00380	0,01886	0,01120	0,02646
1	0,00416	0,00724	0,00409	0,01359
2	0,01083	0,01165	0,00048	0,00474
3	0,01940	0,01527	0,00115	0,00052
4	0,03737	0,02027	0,00774	0,00378
5	0,04970	0,03495	0,01604	0,00615
BEW ₂ /BEW _{Min}	1,09	1,61	2,38	7,21

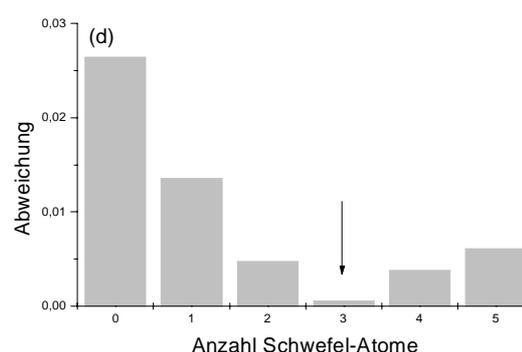
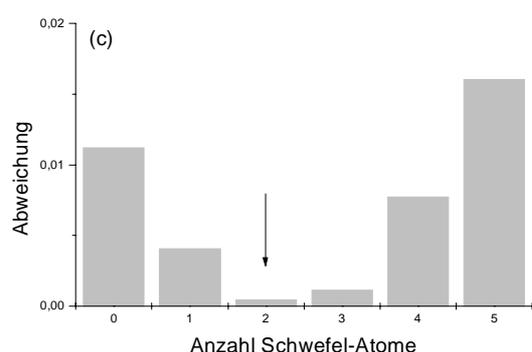
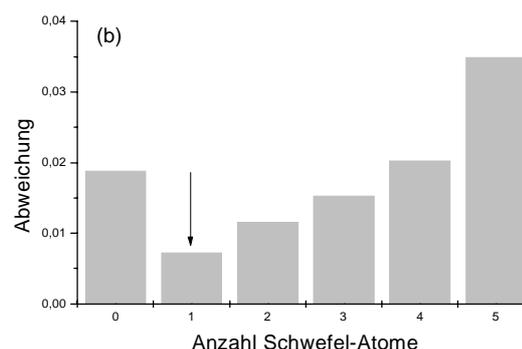
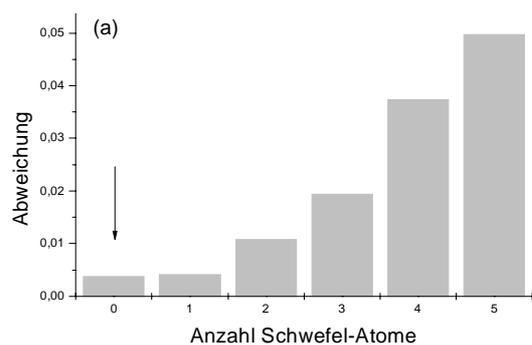


Bild 4-20: Abweichung des gemessenen Isotopenmusters von den gemittelten Mustern, für Peptide mit 0 bis 3 Schwefelatomen. (a) EEKGQETIIQ-NH₂, (M+H)⁺ = 1173,61 u (M25SL9), (b) RPKPQQFFGLM-NH₂, (Substanz P) (M+H)⁺ = 1347,74 u, (c) CTMVNIHIKI-NH₂, (M+H)⁺ = 1170,65 u (M27SL9), (d) TRDYMMHMDP-NH₂, (M+H)⁺ = 1295,53 u (M13SL9)

Die Schätzmethode wurde auf 151 verschiedene Peptide angewendet. Die Häufigkeiten der Differenz D, zwischen der tatsächlichen Anzahl der Schwefelatome und dem Schätzwert, sind in Bild 4-21 dargestellt. Dort ist neben der Gesamtübersicht (Bild 4-21(a)) eine

Klassifizierung nach Schwefelgehalt (Bild 4-21(b)) und nach der Masse (Bild 4-21(c)) zu sehen. In Tabelle 4-14 sind die einzelnen Klassen mit der Anzahl der Peptide, sowie dem Schwerpunkt der Verteilung der Differenz aufgelistet.

Die Gesamtverteilung besitzt ihr Maximum bei $D = 0$ mit 55,6 %. Der nächste Wert liegt bei $D = 1$ mit 34,4 %. Daraus folgt, daß bereits 90 % aller Peptide entweder richtig ($D = 0$) oder um ein Schwefelatom zu hoch geschätzt werden. Der Schwerpunkt der Verteilung liegt bei $SP = 0,4$, so daß der Schätzwert im Mittel um 0,4 Schwefelatome zu hoch liegt.

Bei der Klassifizierung nach Schwefelgehalt (Bild 4-21(b)) ist die Verteilung nur für Peptide mit 0, 1 oder 2 Schwefelatomen bestimmt worden. Alle drei Verteilungen ähneln sich stark, wobei für $S = 0$ prinzipiell keine negative Differenz auftreten kann, so daß $D = -1$ in diesem Fall 0 % Anteil besitzt. Auch hier wird der Großteil der Peptide entweder richtig geschätzt ($D = 0$) oder liegt um 1 zu hoch. Im ungünstigsten Fall sind bei $S = 1$ insgesamt 84,4 % bei $D = 0$ oder $D = 1$, im günstigsten Fall sind es 93 %. Der Schwerpunkt der Verteilung liegt zwischen 0,22 und 0,53.

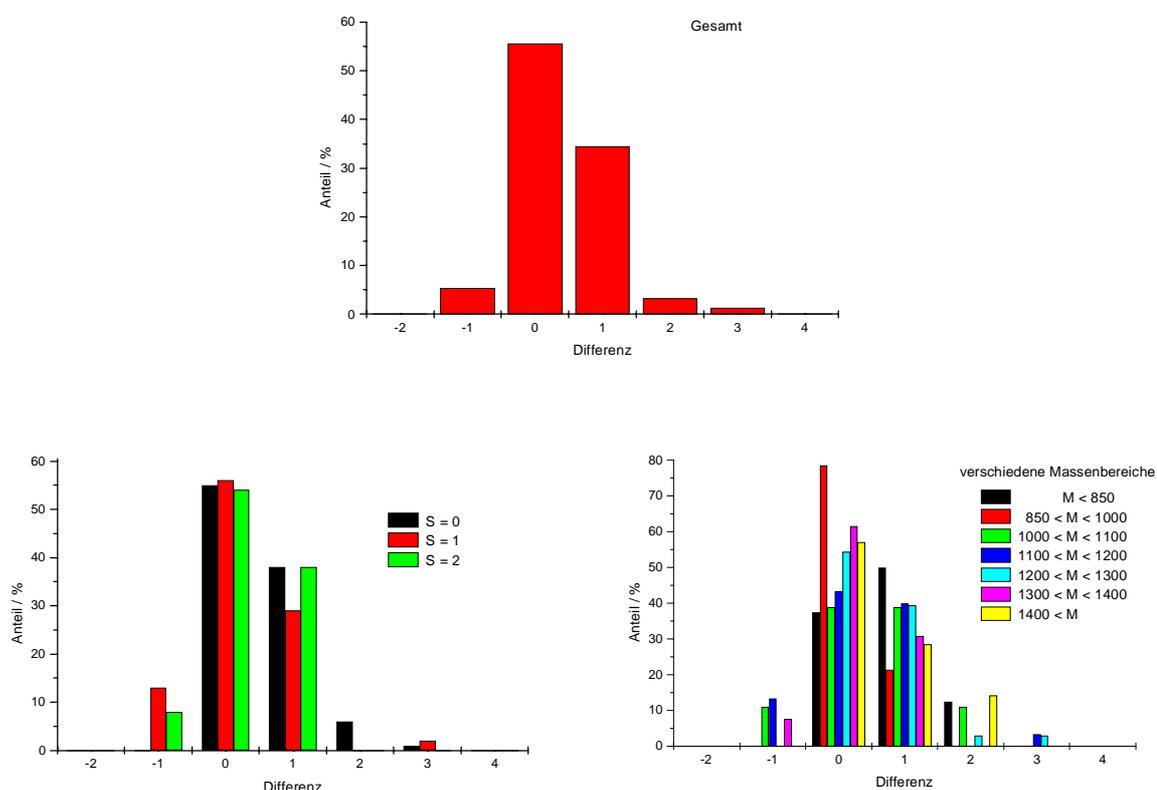


Bild 4-21: Verteilung der Differenz D zwischen tatsächlicher Anzahl an Schwefelatomen und Muster mit geringster Abweichung. (a) Alle Peptide (151), (b) unterschieden nach Schwefelgehalt und (c) unterschieden nach Masse

Für die Klassifizierung nach Massen sind die Peptide in Massenintervalle von 100 u unterschieden worden. Unterhalb von 850 u wurden alle Peptide zusammengefasst, da die Anzahl der Beispiele dort zu gering wurde. Oberhalb von 1400 u wurde ebenso verfahren. Auf diese Weise entstehen 7 Klassen (Tabelle 4-14), deren Verteilungen der Differenz in (Bild 4-21(c)) zu sehen sind. Die Verteilungen unterscheiden sich hier wesentlich stärker untereinander, als dies bei der Schwefelklassifizierung beobachtet werden kann. Am

stärksten weichen die ersten beiden Klassen ab. Bei den kleinen Peptiden unterhalb von 850 u tritt die Differenz $D = 1$ häufiger auf als $D = 0$. Allerdings gibt es hier auch nur 8 Peptide, von denen 3 mit $D = 0$ und 4 mit $D = 1$ geschätzt wurden. Im Massenbereich zwischen 850 u und 1000 u ist die Verteilung mit 78,6 % Anteil bei $D = 0$ am höchsten. Hier wurden alle 28 Peptide entweder mit $D = 0$ oder $D = 1$ geschätzt. Dadurch ist der Schwerpunkt der Verteilung in diesem Massenbereich mit $SP = 0,21$ am kleinsten. Bei den nächsten beiden Massenbereichen (1000 u – 1100 u und 1100 u – 1200 u) liegt die Häufigkeit von $D = 0$ und $D = 1$ in etwa gleich hoch, während für größere Massen (>1200 u) erneut die Differenz $D = 0$ überwiegt. Dieser „Einbruch“ kann nicht durch eine zu geringe Anzahl erklärt werden, sondern muss eine andere Ursache haben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bestimmung der Anzahl der Schwefelatome durch einen Vergleich mit einem gemittelten Isotopenmuster für Peptide bis 1400 u sicher funktioniert und den Schwefelgehalt mit ~50 % Wahrscheinlichkeit exakt bestimmt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von ~90 % kann der Schwefelgehalt auf zwei Werte eingeschränkt werden.

Tabelle 4-14: Übersicht der Klassifizierungen bei der Schwefelabschätzung. In der zweiten Spalte ist die Anzahl der Peptide angegeben, in der letzten Spalte der Schwerpunkt (SP) der Schätzung.

Klassen	Anzahl	SP
Mass < 850	8	0,75
Mass 850-1000	28	0,21
Mass 1000-1100	18	0,50
Mass 1100-1200	30	0,37
Mass 1200-1300	33	0,55
Mass 1300-1400	26	0,23
Mass > 1400	7	0,57
S=0	86	0,53
S=1	45	0,22
S=2	13	0,31
Gesamt	151	0,40

In Tabelle 4-15 sind die Anteile angegeben, auf die sich bei Peptiden mit der nominalen Masse 1170 u die Kombinationen durch Kenntnis des Schwefelgehaltes reduzieren. In der ersten Spalte steht der geschätzte Schwefelanteil, in den beiden folgenden Spalten der relative Anteil der Aminosäure-Kombinationen der bei diesem Schwefelanteil möglich ist.

Mit 90 % Sicherheit, das heißt, der geschätzte Wert S und S+1 sind erlaubt, bleiben im ungünstigsten Fall 70,7 % der Kombinationen übrig. Je höher der geschätzte Schwefelanteil ist, um so stärker wird die Anzahl der Kombinationen reduziert – bei drei Schwefelatomen sind es nur noch 11,9 % der Kombinationen.

Tabelle 4-15: Reduzierung der möglichen Aminosäure-Kombinationen durch Kenntnis des Schwefelgehalts für Peptide mit der nominalen Masse 1170 u

Geschätzt Schwefel	90 % Sicher	50 % Sicher
0	70,7%	40,8%
1	46,0%	29,6%
2	24,8%	16,4%
3	11,9%	8,4%
4	4,3%	3,5%
5	1%	0,8%

Werden nur die exakten Schätzwerte verwendet, reduziert sich die Sicherheit auf etwa 50 %, allerdings reduzieren sich die Kombinationen wesentlich stärker, so daß im ungünstigsten Fall nur noch 40,8 % der Kombinationen in Frage kommen. Dieser Vorteil ist jedoch bei höheren Schwefelanteilen nicht mehr so groß. In diesem Fall ist der Mehraufwand, um zwei Schwefelwerte zu berücksichtigen, klein im Vergleich zu dem Gewinn der Sicherheit, mit der die Sequenz bekannt ist.

4.3 Entfaltung des Isotopenmusters

4.3.1 Entfaltungsalgorithmus für Massenspektren

Mit den in den vorgehenden Abschnitten beschriebenen Methoden ist es möglich, ein mittleres Isotopenmuster für ein unbekanntes Peptid zu berechnen, wenn lediglich die Masse bekannt ist. Dieses Isotopenmuster kann aus einem Massenspektrum entfaltet werden, um ein gefiltertes Spektrum zu erhalten, bei dem nur noch Signale bei monoisotopischen Massen auftreten.

Im Programm `ISOCONV` wird zur Entfaltung ein Algorithmus verwendet, bei dem über den zu filternden Massenbereich gescannt wird. Ferner benötigt das Programm Informationen über die massenabhängigen Isotopenmuster, die in einer Tabelle vorliegen müssen oder mit Hilfe eines Polynoms (Kapitel 4.2.4) berechnet werden können. Für Peptide gleicher nominaler Masse wird das gleiche Isotopenmuster ermittelt. Die gemittelten Isotopenmuster sind nach der Anzahl der Schwefelatome klassifiziert, so daß die Standardabweichung der Intensitätsverteilungen der Isotopenmuster reduziert werden kann, wenn der Schwefelanteil bekannt ist. Dies ist beispielsweise in Fragment-Ionen-Spektren der Fall, bei denen über das Isotopenmuster des Mutter-Ions der Schwefelanteil bestimmt werden kann (Kapitel 4.2.5.3). Die Bedienung des Programmes ist in Kapitel 3.5.1 im Detail beschrieben.

4.3.1.1 Schematischer Ablauf der Entfaltungsprozedur

Der Entfaltungsalgorithmus ist in Bild 4-22 schematisch dargestellt. Das experimentelle Spektrum wird von kleinen zu großen Massen mit einer Schrittweite von einem Datenpunkt gescannt. Flugzeit-Massenspektren werden typischerweise durch Analog-

Digital-Wandlung in einem digitalen Oszilloskop oder Transientenrekorder aufgezeichnet. Dadurch besitzt der Abstand, mit dem die Signale aufgenommen und gespeichert werden eine konstante Zeitdifferenz, aber keinen konstanten Massenabstand. Zum besseren Verständnis ist die Entfaltungsmethode in Bild 4-22 zunächst für den idealisierten Fall dargestellt, daß

- eine lineare Beziehung zwischen Datenpunkt und Masse gilt
- das Spektrum ein vernachlässigbares Untergrundrauschen besitzt
- benachbarte Datenpunkte exakt eine Masseneinheit voneinander getrennt sind

Der Entfaltungs-Prozess kann unter diesen idealisierten Bedingungen folgendermaßen beschrieben werden:

Die Bearbeitung beginnt bei dem ersten Datenpunkt (DP1), indem die diesem Punkt zugeordnete nominale Masse und das dazugehörige gemittelte Isotopenmuster bestimmt werden. Von dem aktuellen Datenpunkt wird angenommen, daß das monoisotopische Signal eines Peptids zu 100 % enthalten ist, und das gemittelte Isotopenmuster auf die Intensität von DP1 normiert ist. Die resultierenden Intensitäten der einzelnen Isotopenpeaks werden vom Originalspektrum abgezogen, wobei negative Intensitäten nicht zugelassen sind und auf Null zurückgesetzt werden. Die Intensität bei der Masse von DP1 im neuen, gefilterten Spektrum ergibt sich aus der Summe der aus dem Originalspektrum abgezogenen Intensitäten, was im Idealfall der Summe der Isotopen-Signale des gemittelten Isotopenmusters entspricht. Mit dem verbleibenden (abgezogenen) Ausgangsspektrum wird die Prozedur mit dem nächsten Datenpunkt (DP2) wiederholt. Falls kein Peptid bei dieser Masse vorkommt, ist jetzt im Idealfall die Intensität dieses Datenpunktes gleich Null. Die normierten Intensitäten des gemittelten Isotopenmusters werden erneut abgezogen und die entsprechende Intensität wird im gefilterten Spektrum bei der Masse von DP2 hinzugefügt (siehe Bild 4-22).

Nachdem die Prozedur für alle Datenpunkte im interessierenden Massenbereich ausgeführt wurde, ist das Gesamtergebnis ein Spektrum, bei dem

1. die Anzahl der Peaks reduziert ist,
2. Rauschsignale (Signale ohne Isotopenmuster) in neue Rauschsignale transformiert werden,
3. Peaks bei der monoisotopischen Masse eines Peptids deutlich gegenüber den unveränderten Rauschintensitäten erhöht werden.

Im Beispiel von Bild 4-22 ist die Intensität des Signals bei DP3 nicht durch das Abziehen der Isotopenmuster der vorhergehenden Datenpunkte auf Null reduziert worden, was auf ein Peptid bei dieser Masse hindeutet. Bei DP1 befindet sich ebenfalls ein Peptid-Signal.

4.3.1.2 Berücksichtigung von Schwankungen

Da es sich bei den Isotopenmustern um Mittelwerte handelt, entsprechen die Intensitäten eines experimentell gemessenen Isotopenmusters nur in Ausnahmefällen exakt den gemittelten Mustern. Die Standardabweichungen der theoretischen Intensitätsverteilungen werden zur Bewertung eingesetzt. Falls die gemessene Intensität innerhalb des Intervalls

von gemittelter Intensität \pm Standardabweichung liegt, wird angenommen, das Muster sei das Isotopenmuster eines einzelnen Peptids. Liegt die Intensität außerhalb dieses Intervalls lassen sich zwei Fälle unterscheiden:

Ist die Intensität des experimentellen Spektrums größer als der gemittelte theoretische Wert, kann entweder ein Peptid mit einem stark überdurchschnittlich breiten Isotopenmuster oder ein zweites Peptid bei dieser Masse vorliegen.

Ist die Intensität des experimentellen Spektrums zu klein, kann wiederum das Peptid bei dieser Masse ein überdurchschnittlich schmales Isotopenmuster besitzen, oder aber der Peak stammt nicht von einem Peptid, sondern beispielsweise von einem Rauschsignal.

Die verschiedenen Fälle, die auftreten können, sind in Bild 4-23 schematisch dargestellt, wobei hier nur die Schwankung des zweiten Isotopenpeaks berücksichtigt wird. Für die Signalintensität des zweiten Isotopenpeaks gibt es vier Fälle.

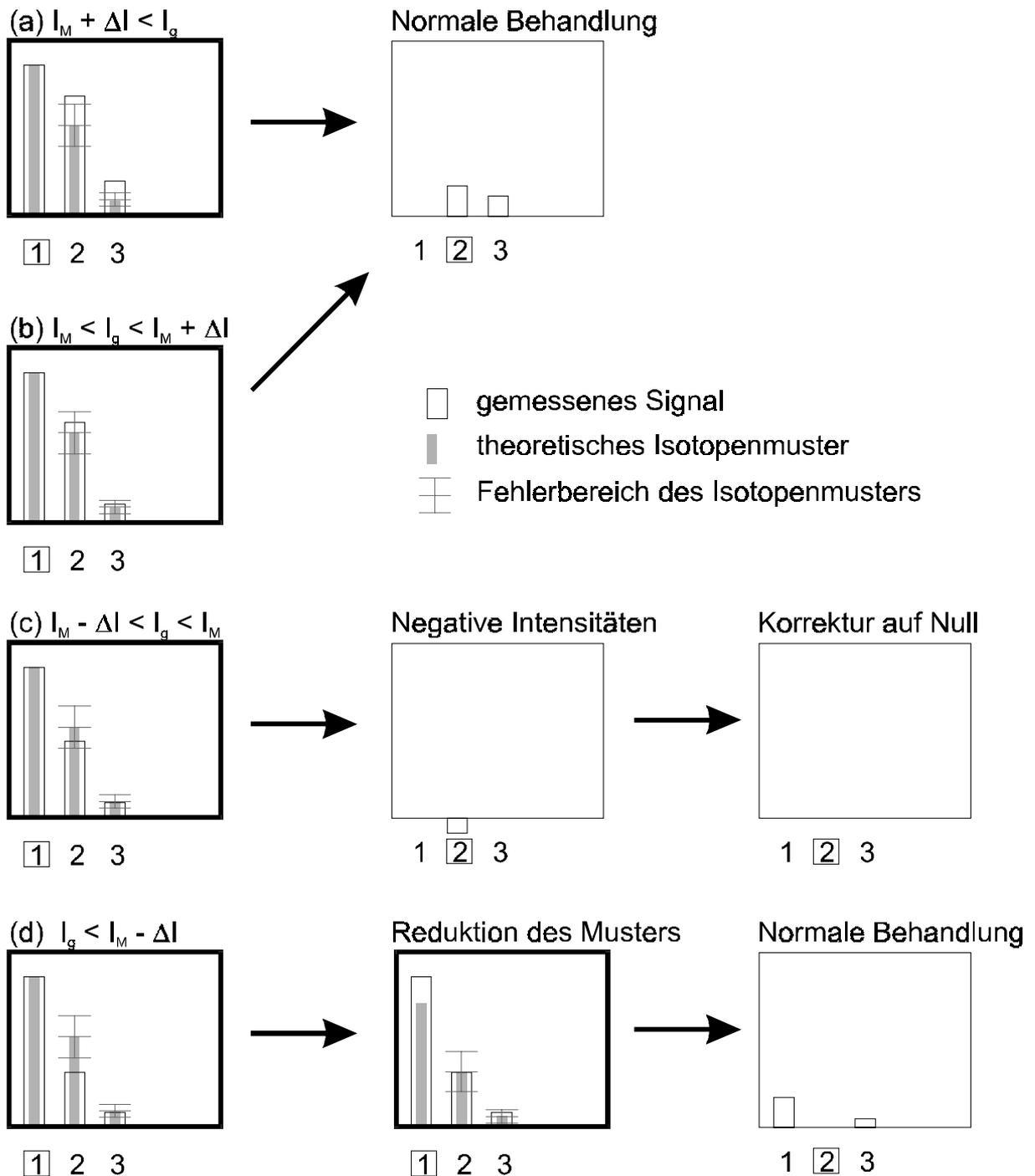


Bild 4-23: Schematische Darstellung der Behandlung von Schwankungen des Isotopenmusters. Es lassen sich vier Fälle unterscheiden: (a) $I_M + \Delta I < I_g$, (b) $I_M < I_g < I_M + \Delta I$, (c) $I_M - \Delta I < I_g < I_M$ und (d) $I_g < I_M - \Delta I$. Dabei sind I_M die gemittelte Isotopen-Intensität, ΔI die absolute Schwankung der Intensität und I_g die gemessene Isotopen-Intensität (Rest nach Bearbeitung der vorigen Kanäle).

Ist die gemessene Signalintensität I_g größer als die mittlere Intensität I_M , wird das mittlere Isotopenmuster ohne weitere Prüfungen abgezogen (Bild 4-23 (a) und (b)). Dieser Fall tritt ein, wenn ein zweites Molekül-Ion bei der Masse eines Isotopenpeaks liegt, oder das Isotopenmuster des Peptids stark vom Durchschnitt abweicht. Es bleiben nach dem Abziehen des gemittelten Musters im Ursprungsspektrum Intensitäten bei den Massen der

Isotopenpeaks zurück, die in einem der nächsten Schritte als monoisotopische Masse interpretiert werden.

Liegt die Signalintensität I_g zwischen der mittleren Intensität I_M und der Intensität minus der Schwankung ΔI (Bild 4-23 (c)), dann ist das Isotopenmuster schmäler als der Durchschnitt, wird aber noch als Peptid-Muster akzeptiert. Hierbei treten nach dem Abziehen des gemittelten Musters negative Intensitätswerte im Ursprungsspektrum auf. Die negativen Werte werden wieder auf Null erhöht und der Betrag der negativen Intensitäten wird von der Intensität des gefilterten Spektrums abgezogen. Auf diese Weise bleibt die integrierte Gesamtintensität des gefilterten Spektrums gleich der integrierten Gesamtintensität des Ursprungsspektrums. Es gilt die Erhaltung der Signalstärke.

Ist die Signalintensität I_g kleiner als die mittlere Intensität minus der Schwankung ($I_M - \Delta I$) (Bild 4-23 (d)), weicht der Isotopenpeak stark vom Muster eines Peptids ab. In diesem Fall wird das minimale enthaltene Isotopenmuster eines Peptids vom gemessenen Spektrum abgezogen. Dazu wird das gemittelte Isotopenmuster neu normiert, so daß am betrachteten Isotopenpeak (im Beispiel dem zweiten Isotopenpeak) $I_g = I_M$ ist. Anschließend wird das neu normierte Isotopenmuster vom gemessenen Spektrum abgezogen. Dadurch bleibt im gemessenen Spektrum bei der monoisotopischen Masse, im Gegensatz zu den anderen Fällen ((a)-(c)), eine Signalintensität größer Null zurück. Diese muss bei einfach geladenen Massenspektren als Rauschen interpretiert werden.

Die eben beschriebenen Überprüfungen müssen für jeden betrachteten Datenpunkt einzeln durchgeführt werden. Dabei muss der Fall (d) zuerst geprüft werden. Tritt bei einem oder mehreren Isotopenpeaks dieser Fall ein, wird das Isotopenmuster um die stärkste Abweichung neu normiert. Nach der Normierung kann der Fall (d) nicht mehr auftreten, wohl aber die Fälle (a)-(c), die für jeden Isotopenpeak unabhängig behandelt werden können.

4.3.1.3 Reale Spektren

Im Fall von Flugzeit-Massenspektren sind durch die zeit-lineare Datenaufnahme mit digitalem Oszilloskop oder Transientenrekorder die Datenpunkte in der Massenskala nicht äquidistant. Deshalb muss `ISOCONV` bei der Bearbeitung von zeit-linearen Spektren zu jedem Datenpunkt zunächst die zugehörigen Datenpunkte der Isotopen-Signale suchen. Der Abstand der Datenpunkte, die eine Masseneinheit entfernt sind, variiert mit der Masse. Auch gibt es nicht immer genau bei der gesuchten Masse eines Isotopenpeaks einen Datenkanal. Daher werden die zwei benachbarten Kanäle gesucht, zwischen denen die gesuchte Masse liegt. Es wird angenommen, daß die gespeicherten Massen der Kanäle die Mitte eines Balkens markieren, in dem die Intensität die Fläche ist (Bild 4-24 (a)). Die Breite des Balkens entspricht dem Abstand der benachbarten Kanäle. Die Intensität bei einer beliebigen Masse zwischen zwei Kanälen wird bestimmt, indem die Fläche der Balken in dem Intervall mit der Breite des Kanalabstandes und der Masse als Mittelpunkt summiert wird. In Bild 4-24 (a) entsprechen die gestreiften Flächen der Gesamtfläche des fett umrahmten Rechtecks mit dem Mittelpunkt bei der Masse M .

Auf gleiche Weise wird die Intensität eines Isotopenpeaks aus dem gemessenen Spektrum abgezogen (Bild 4-24 (b)). Durch die abziehende Intensität wird ein Balken mit der Breite des Kanalabstandes und der Fläche der Intensität am Mittelpunkt der exakten Masse

erzeugt. Jedem der benachbarten Kanäle k und $k-1$ wird der Flächenanteil zugeordnet, der von diesem Balken im Intervall des jeweiligen Kanals liegt. In Bild 4-24 (b) ist die abzuziehende Fläche dargestellt. Die Fläche der grau unterlegten Rechtecke ist zusammengenommen gleich der Fläche des gestreiften Rechtecks.

Diese Darstellungen zur Mittelung einer Intensität gelten für eine beliebige Massengenauigkeit, das heißt die Massen der Kanäle $k-1$ und k können sowohl um mehr als eine Einheit (>1 u), als auch weniger als eine Einheit voneinander getrennt sein. Im letzten Fall existieren für jeden Isotopenpeak mehrere Datenkanäle, die bei der Entfaltung der Isotopenmuster von kleiner zu großer Masse nacheinander bearbeitet werden. Bei einem Kanalabstand von mehr als 1 u ist der Entfaltungsalgorithmus nicht mehr anwendbar, da die Zuordnung zu den Isotopenpeaks nicht mehr möglich ist.

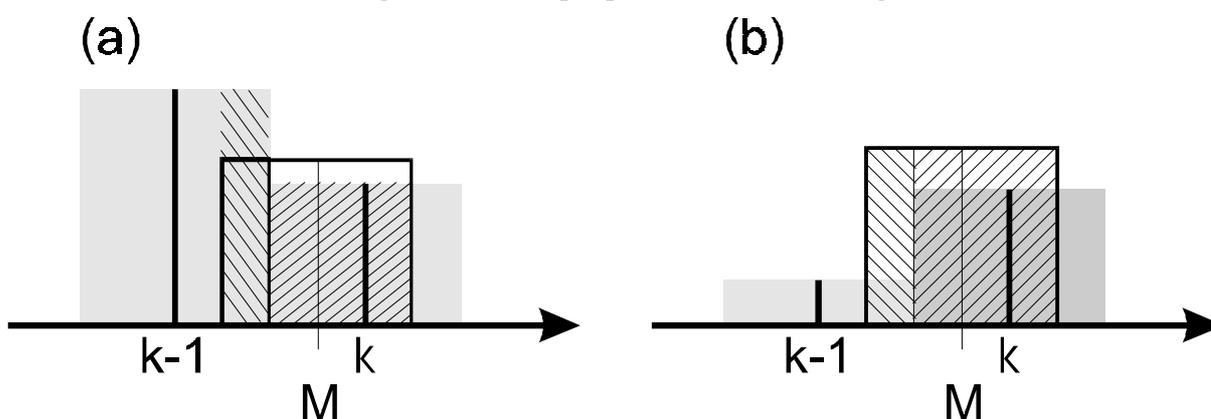


Bild 4-24: (a) Bestimmen der Intensität des Signals bei einer exakten Masse M aus den diskreten Datenkanälen $k-1$ und k . (b) Umkehrung, bei der die abzuziehende Intensität der Kanäle aus der Intensität bei der Masse M bestimmt wird.

4.3.1.4 Untergrundkorrektur der Spektren

Das experimentelle Spektrum besitzt ein Untergrundsignal, das massenabhängig variieren kann. Wird der Untergrund nicht berücksichtigt, erhält man zu den Intensitäten der Isotopenpeaks einen konstanten Offset, so daß die Isotopen-Verhältnisse falsch wiedergegeben werden. Folglich muss der Untergrund auf Null reduziert werden.

Zur Korrektur wird zu jedem Datenpunkt ein individueller Untergrundwert abgezogen. Der Wert wird ermittelt, indem in der Umgebung des Datenpunktes die minimale Intensität bestimmt wird. Durch die Breite des Intervalls der Umgebung kann die Steilheit der Untergrundfunktion beeinflusst werden. Ist das Intervall groß, sind die Variationen des Untergrundes, der abgezogen wird, gering. Bei einem kleinen Intervall werden die Variationen größer.

Das Beispiel in Bild 4-25 zeigt den Effekt des gleitenden Untergrundabzuges bei dem Isotopenmuster von Melittin ($(M+H)^+ = 2845,76$ u). In (a) ist das experimentelle Spektrum dargestellt, wobei ein deutlicher Untergrund zu sehen ist. In den Spektren (b) und (c) wird der Untergrund mit je ± 20 (b) oder ± 7 (c) Kanälen Intervall-Breite abgezogen. Während sich in (b) lediglich der Untergrund links und rechts vom Isotopenmuster auf Null reduziert, wird bei zu kleiner Intervall-Breite in (c) das Isotopenmuster von Melittin deformiert.

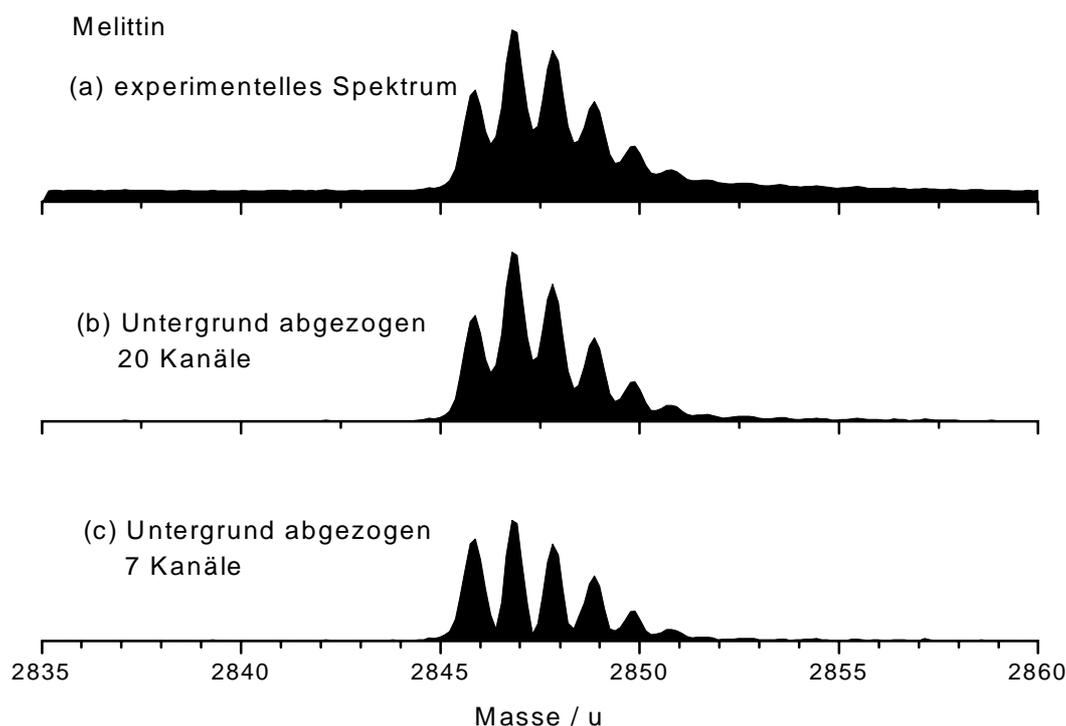


Bild 4-25: Wirkungsweise des gleitenden Untergrundabzugs. (a) experimentelles Spektrum von Melittin, (b) Abzug des Minimums von ± 20 Kanälen (± 3 u) und (c) Abzug des Minimums von ± 7 Kanälen (± 1 u)

4.3.2 Anwendung auf MALDI-Massenspektren

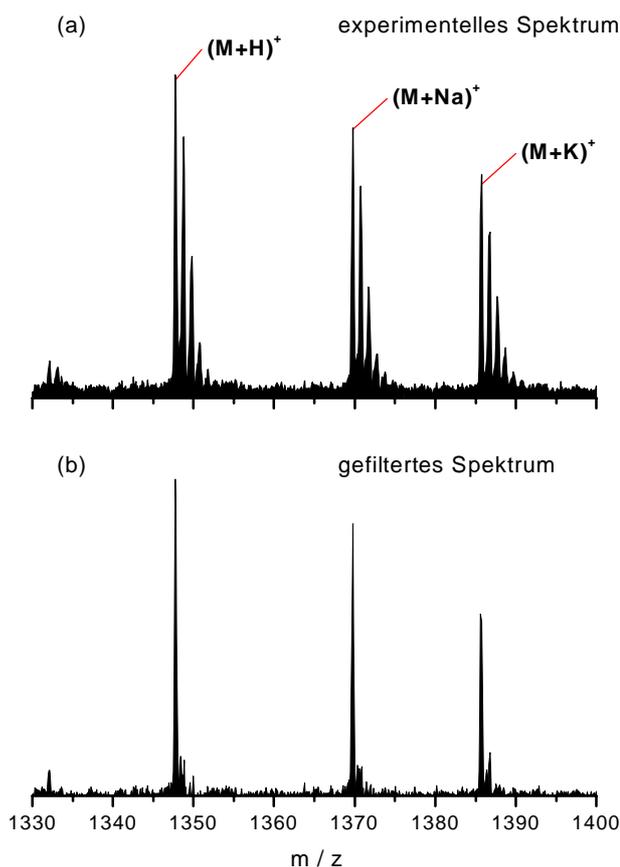
4.3.2.1 Synthetische Peptide

Für einen ersten Test der Entfaltungsprozedur wurde der Algorithmus auf MALDI-Massenspektren von Standard-Peptiden angewendet. Das Peptid Substanz P wurde mit DHB und einer Verunreinigung von Natrium- und Kalium-Salzen gemessen. Dadurch sind neben dem $[M+H]^+$ -Isotopen-Cluster auch noch Peak-Gruppen bei $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ in vergleichbaren Signalintensitäten vorhanden. In Bild 4-26(a) ist der Ausschnitt um diese Signale dargestellt. Für jeden Molekültyp heben sich bis zu 5 verschiedene Isotopenpeaks über das Untergrundsignal heraus. Das mit `ISOCONV` entfaltete Spektrum ist in Bild 4-26(b) zu sehen. Als Parameter zur Entfaltung wurde ein Fehler der Isotopen-Intensitäten von $20\% + (I-2) * 20\%$ gesetzt, wobei I die Nummer des Isotops ist. Der Untergrund wurde gleitend über das lokale Minimum von ± 50 Kanälen abgezogen, was etwa $\pm 3,5$ u entspricht. Nach der Entfaltung verbleiben noch insgesamt drei Peaks bei den monoisotopischen Massen von $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$, während die höheren Isotopenpeaks von allen drei Molekültypen unterdrückt werden. Dadurch wird das Signal/Rausch-Verhältnis der Peaks zum Teil deutlich erhöht (Tabelle 4-16). Die Signal/Rausch-Verhältnisse wurden als Verhältnis aus Peak-Fläche zu der Fläche des Trapezes zwischen den lokalen Minima links und rechts vom Peak bestimmt. Dabei ist zu

beachten, daß der Untergrund im Originalspektrum nicht abgezogen wurde, dieser aber zum großen Teil eine konstante Verschiebung des Spektrums hervorruft. Wird der Untergrund vorher abgezogen, kann sich das Signal/Rausch-Verhältnis des Originalspektrums noch um den Faktor 2-3 verbessern.

Das Beispiel in Bild 4-26 zeigt, daß der Entfaltungsalgorithmus nicht nur für protonierte Molekül-Ionen, sondern auch für andere Addukt-Ionen, anwendbar ist. Dies ist möglich, weil der Beitrag des Alkali-Atoms zum Isotopenmuster des Molekül-Ions nur sehr gering ist. Natrium besitzt nur das ^{23}Na -Isotop, während Kalium drei natürlich vorkommende Isotope - ^{39}K (93,3 %), ^{40}K (0,01 %) und ^{41}K (6,7 %) - besitzt.

Im entfalteten Spektrum fallen oberhalb der Peaks bei der monoisotopischen Masse noch leichte Erhöhungen eine Masseneinheit höher auf. Diese entstehen dadurch, daß gemittelte Isotopenmuster verwendet werden und Abweichungen des Isotopenmusters des experimentell gemessenen Peptids von diesen Mittelwerten vorkommen. Ist der Mittelwert kleiner, als die Intensität des experimentellen Isotopenpeaks, bleibt ein Restbeitrag im Spektrum zurück, der als ein Nachläuferpeak im Abstand 1 u auftritt.



*Bild 4-26: MALDI-TOF
Massenspektrum von Substanz P mit
DHB als Matrix und in Gegenwart
von Natrium- und Kalium-Ionen. (a)
Originalspektrum (Rohdaten) und (b)
das entfaltete Spektrum. Parameter
zur Entfaltung: Fehler 20 % + (I-2) *
20 % (I = Nummer des Isotops).
Untergrundintervall ± 50 Kanäle*

Tabelle 4-16: Signal/Rausch-Verhältnis der monoisotopischen Peaks von $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ vor und nach der Entfaltung mit ISOCONV.

Molekül	S/N Original	S/N Isoconv	Veränderung
$[M+H]^+$	1,82	34,52	18,98
$[M+Na]^+$	1,89	18,86	9,97
$[M+K]^+$	1,67	8,13	4,88

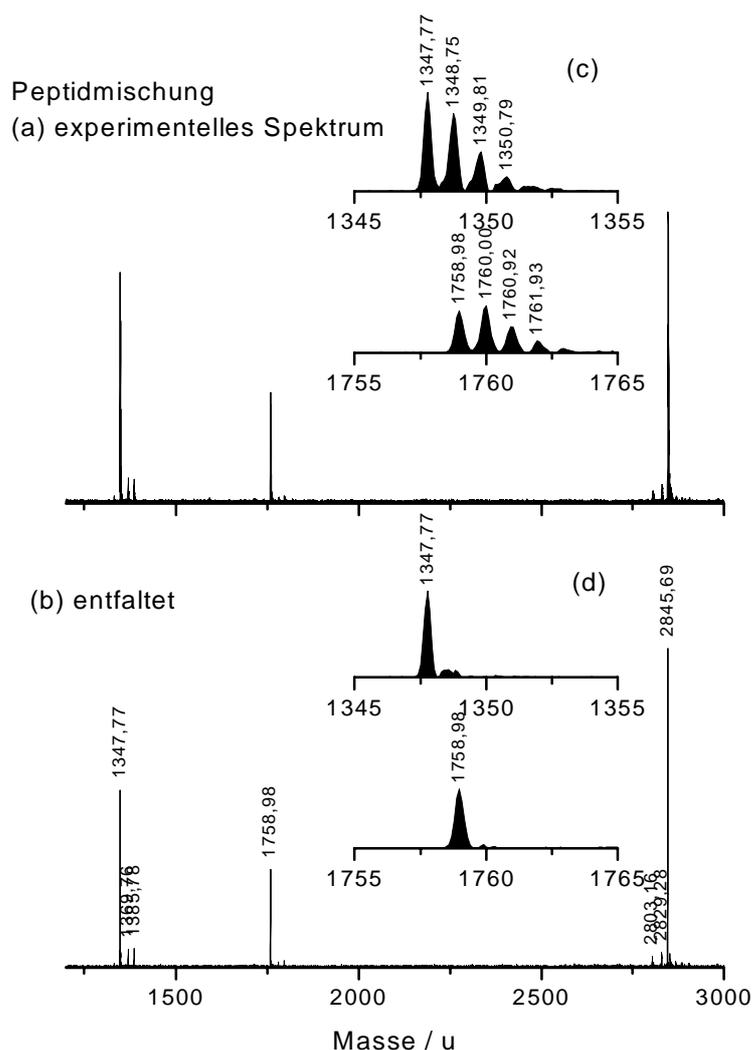


Bild 4-27: Entfaltung einer Mischung aus drei Peptiden (Substanz P (1347,74 u), Angiotensinogen (1758,93 u), Melittin (2845,76 u)). (a) Experimentelles MALDI-Massenspektrum, (b) Entfaltetes Spektrum mit markierten Peaks, (c) Massenbereich von Substanz P (oben) und Angiotensinogen (unten) mit markierten Peaks im experimentellen und (d) Massenbereich von Substanz P und Angiotensinogen im gefilterten Spektrum

Als weiteres Beispiel ist in Bild 4-27 das MALDI-Massenspektrum einer Peptid-Mischung aus Substanz P, Angiotensinogen und Melittin zu sehen. Für die Entfaltung wurde der Untergrund gleitend über ± 30 Kanäle ($\sim \pm 3$ u) abgezogen und die Schwankung der

gemittelten Isotopenmuster wurde auf $15 \% * (I - 1)$ ($I =$ Nummer des Isotopenpeaks) festgelegt.

In Bild 4-27(b) sind im entfalteten Spektrum die identifizierten Peaks markiert. Zur Markierung wurde der in Kapitel 3.6.1 beschriebene Algorithmus verwendet, wobei die Schwelle auf 5 Einheiten, der Untergrund auf 2 Einheiten und die minimale Auflösung auf 3000 gesetzt wurden. Im entfalteten Spektrum werden die monoisotopischen Massen der protonierten Peptide, sowie die Massen des $(M+Na)^+$ und $(M+K)^+$ von Substanz P markiert. Daneben sind noch einige weitere Peaks markiert, die als Fragmente von Melittin erklärt werden können.

Tabelle 4-17: Liste der Massen, die beim Entfalteten und beim experimentellen Spektrum des Peptid-Gemisches gefunden werden. Die Parameter zur Markierung der Peaks sind im Text beschrieben

<i>Entfaltetes Spektrum</i>			<i>Experimentelles Spektrum</i>		
<i>Masse / u</i>	<i>Molekül</i>	<i>Intensität</i>	<i>Masse / u</i>	<i>Molekül</i>	<i>Intensität</i>
1347,77	$(SubP+H)^+$	1046,66	1347,77	$(SubP+H)^+$	455,4
1369,76	$(SubP+Na)^+$	108,392	1348,75	Isotop	360
1385,78	$(SubP+K)^+$	109,378	1349,81	Isotop	185,6
1758,98	$(Ang+H)^+$	580,224	1350,79	Isotop	71
2803,16	von Melittin	65,4337	1371,82	Isotop (Na)	23,6
2829,28	von Melittin	87,2864	1385,78	$(SubP+K)^+$	47,6
2845,69	$(Mel+H)^+$	1883,89	1386,77	Isotop	36
			1758,98	$(Ang+H)^+$	195,4
			1760	Isotop	218,8
			1760,92	Isotop	122,8
			1761,93	Isotop	58

In Bild 4-27(c) und (d) sind die Massenbereiche von Substanz P und Angiotensinogen für das experimentelle Spektrum vergrößert dargestellt und die im Originalspektrum gefundenen Peaks markiert. Zur automatischen Markierung wurden die selben Parameter wie für das entfaltete Spektrum verwendet. Hierbei wurden jeweils 4 Isotopenpeaks markiert, so daß die erzeugte Massenliste nicht ohne weitere Interpretation des Spektrums verwendet werden kann. In Tabelle 4-17 sind sämtliche gefundenen Massen für das experimentelle und das entfaltete Spektrum aufgelistet. In der Spalte „Molekül“ ist die Interpretation angegeben. Der Eintrag „Isotop“ bedeutet, daß es sich bei dem markierten Peak um einen höheren Isotopenpeak eines Peptids handelt. Zusätzlich wird bei 1371,82 u der dritte Isotopenpeak des $(M+Na)^+$ von Substanz P markiert. Allerdings wurde nicht der monoisotopische Peak gefunden, so daß es nicht ausreichen würde, immer die kleinste Masse einer Peak-Gruppe im Abstand von 1 u als monoisotopische Masse zu definieren oder bei Einzel-Peaks diese als monoisotopische Masse zu interpretieren. Monoisotopische Peaks, die im experimentellen Spektrum nicht gefunden wurden, sind das $(M+Na)^+$ -Ion

von Substanz P und das $(M+H)^+$ -Ion von Melittin. Beide Signale wurden im entfalteten Spektrum identifiziert.

Zusätzlich wurden im entfalteten Spektrum noch zwei Peaks bei 2803,16 u und 2829,28 u gefunden, die als Fragment-Ionen von Melittin erklärt werden können.

4.3.2.2 Variation der Parameter

Zur Optimierung der Entfaltung stehen mehrere Parameter zur Verfügung. Die mittleren Isotopenmuster ändern sich abhängig vom Schwefelanteil der Peptide, was in Kapitel 0 beschrieben wird. Ein weiterer Parameter besteht in der zugelassenen Schwankung der Isotopen-Intensitäten. Diese kann in der Software durch zwei Werte eingestellt werden. Als erstes wird der relative Fehler der Intensität des zweiten Isotopenpeaks in Prozent angegeben. Zusätzlich wird angegeben, um welchen Prozentwert sich der Fehler mit jedem weiteren Isotopenpeak erhöht. Die Untergrundkorrektur beeinflusst das Ergebnis ebenfalls, da sich die Verhältnisse der Peaks verändern, falls der Untergrund nicht oder nur ungenügend berücksichtigt wird. Der Einfluß des Signaluntergrunds auf das Isotopen-Verhältnis wird in Kapitel 4.3.1.4 erklärt. Im folgenden wird ein konstanter Wert von ± 30 Kanälen ($\sim \pm 3$ u) verwendet. Dieses Intervall ist groß genug, um Verschiebungen der Peak-Intensitäten zu vermeiden.

Tabelle 4-18: Parameterabhängigkeit der Peakform des Peptids $EEKGQETIIQ-NH_2$ ($(M+H)^+ = 1173,61$ u) bei der Entfaltung. In den Spalten ist die Schrittweite S und in den Zeilen der Offset O für die Berechnung der Schwankung aufgetragen. Die Buchstaben in den Feldern weisen auf die Peak-Klassen aus Bild 4-28. Peaks mit „guter“ Peakform sind mit einem + gekennzeichnet

		<i>Schrittweite S</i>							
		<i>0</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>15</i>	<i>20</i>	<i>25</i>	<i>30</i>	<i>35</i>
<i>Offset O</i>	<i>5</i>	A	A	B	A2	A2	A2	A2	
	<i>10</i>	A	B	B	D	+	+	+	F
	<i>15</i>	A	B	D	+	+	+	F	
	<i>20</i>	B	B	+	+	+	F		
	<i>25</i>	B	+	+	+	F	F		
	<i>30</i>	C	+	+	F	F			
	<i>35</i>	+	+	F	F	F			
	<i>40</i>	+	F	F	F	F			
	<i>45</i>	F	F	F	F	F	F		

Die relative Schwankung RS des n -ten Isotopenpeaks berechnet sich nach der Formel

$$RS = O + S * (n-2),$$

mit dem Startwert O als Schwankung des zweiten Isotopenpeaks und der Schrittweite S , um die sich die Schwankung erhöht. Beide Größen sind in relativen Prozentwerten angegeben. Für den ersten (monoisotopischen) Isotopenpeaks ist die Schwankung $RS = 0$, da auf diesen Peak bei der Entfaltung normiert wird. Für ein synthetisches Peptid

(EEKGQETIIQ-NH₂ ((M+H)⁺ = 1173,61 u)) wurden die Parameter O und S systematisch variiert, und die Peakform des entfalteten monoisotopischen Signals wurde bewertet. Über grosse Bereiche der Parameterwerte zeigten sich kaum Veränderungen der Signalform, so daß einige typische Peak-Klassen definiert werden können. Beispiele für diese Klassen sind in Bild 4-28 dargestellt. In Tabelle 4-18 sind zu den Parametern, die in 5 % Schritten variiert wurden, die Klassen zugeordnet worden. Die mit einem + markierten Parameterpaare ergeben für das Peptid eine „gute“ Peakform. Bei den anderen Klassen ist zwar die Peakform in Ordnung, aber die Gesamtintensität ist unterdrückt (A, A2). Dieser Fall tritt auf, wenn die Schwankung des zweiten Isotopenpeaks zu klein angesetzt wird, wodurch unterdurchschnittlich intensive Isotopenpeaks im experimentellen Spektrum zu einer Reduzierung führen.

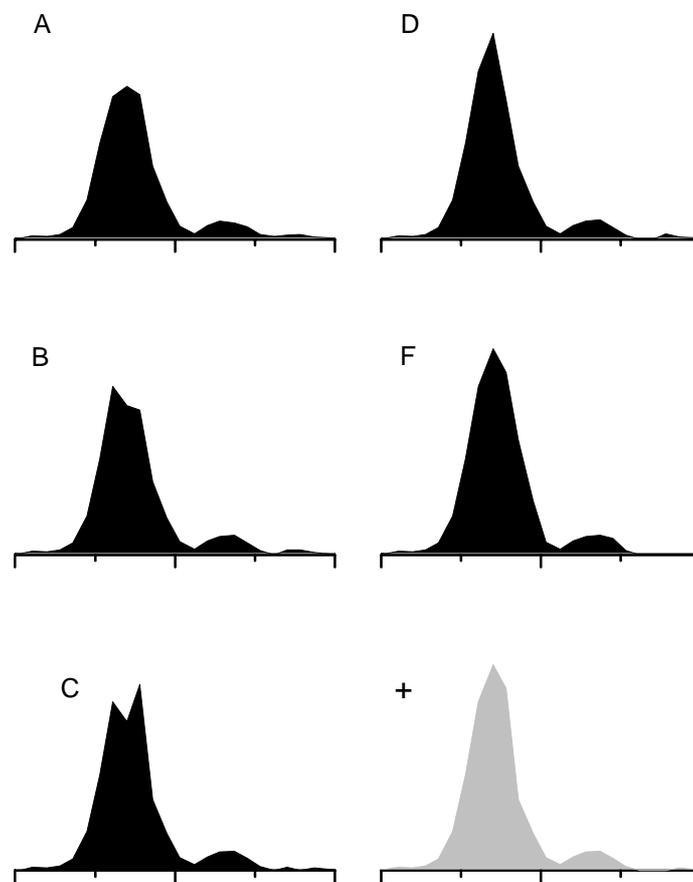


Bild 4-28: Verschiedene Peak-Klassen, die durch unterschiedliche Parameter bei der Entfaltung des Peptids EEKGQETIIQ-NH₂ ((M+H)⁺ = 1173,61 u) entstehen. Die Buchstaben neben den Peaks werden in Tabelle 4-18 verwendet

Ist die Anfangsschwankung O größer, aber die Zunahme S zu klein, werden nur einzelne Kanäle reduziert, während bei anderen Kanälen die Schwankungen groß genug sind. Dadurch wird die Peakform unsymmetrisch (B, C) oder zu schmal (D). Wenn die Schwankungen zu groß sind, werden die Signalintensitäten ohne Korrektur übernommen und zu breite Peaks produziert.

Als Vergleichswerte für O und S können die relativen Abweichungen ST/MW aus Tabelle 4-4 und Tabelle 4-6 herangezogen werden.

4.3.2.3 Entfaltung mit klassifizierten Isotopenmustern

Die nach Schwefelanteil klassifizierten Isotopenmuster, die in Kapitel 4.2.5.2 bestimmt wurden, können zu einer spezifischeren Entfaltung von Spektren verwendet werden. Bild 4-29 zeigt die Bereiche des Molekülpeaks von drei synthetischen Peptiden mit je 0, 1 oder 2 Schwefelatomen. Im oberen Bild wird das experimentelle Spektrum und darunter sind die entfalteten Massenbereiche mit den gemittelten Isotopenmustern für Peptide mit 0, 1 und 2 Schwefelatomen (S0, S1, S2) gezeigt. Die Schwankung der Isotopenmuster wurde hier auf $10\% + 10\% \cdot (I-2)$ gesetzt.

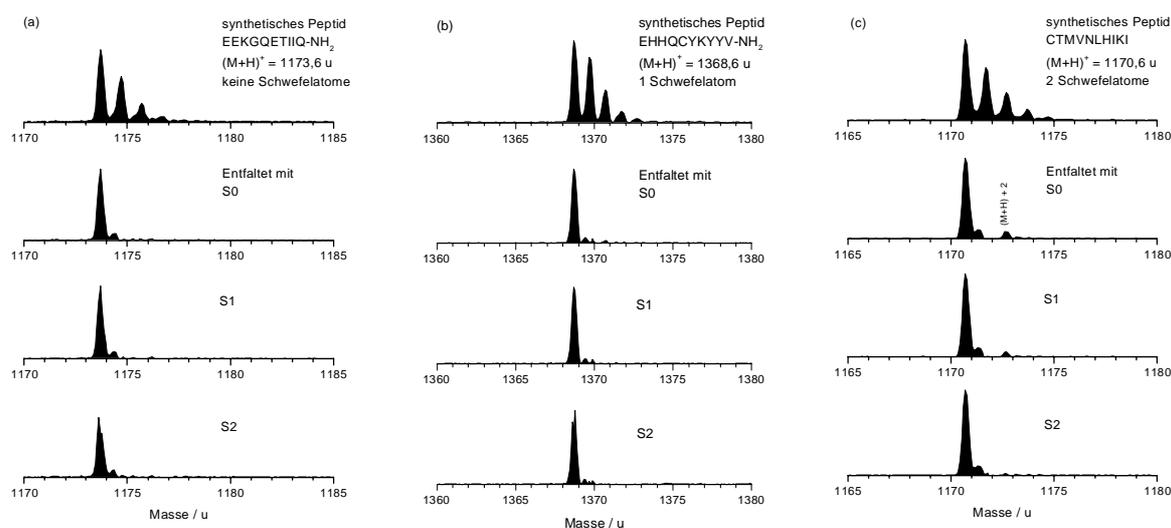


Bild 4-29: Entfaltung mit klassifizierten Isotopenmustern. (a) Peptid ohne Schwefelatome, (b) Peptid mit 1 Schwefelatom und (c) mit 2 Schwefelatomen

Bei dem schwefelfreien Peptid (Bild 4-29(a)) ist kein großer Unterschied zwischen den einzelnen Schwefelklassen zu beobachten. Lediglich die Peakintensität des entfalteten monoisotopischen Peaks nimmt mit wachsender Schwefelklasse ab. Ähnliches gilt für das Peptid mit einem Schwefelatom (Bild 4-29(b)). Hier wird die Peakintensität allerdings bei S1 maximal.

Bei der Entfaltung des Peptids mit zwei Schwefelatomen (Bild 4-29(c)) kann in den ersten beiden Schwefelklassen (S0 und S1) ein zweiter Peak bei (M+H)+2 beobachtet werden, dessen Intensität etwa 10 % des monoisotopischen Peptid-Signals ausmacht. Dieser Peak entsteht nur bei der Entfaltung mit einer Schwefelklasse mit weniger Schwefelatomen als das Peptid tatsächlich besitzt.

Die Abnahme der Intensität bei der Entfaltung mit einem Isotopenmuster mit zu hoher Schwefelanzahl ist in Bild 4-30 dargestellt. Die relative Intensität ist auf die Intensität des monoisotopischen Peaks nach Entfaltung mit der „richtigen“ Schwefelklasse normiert. Hier fällt auf, daß bei zu hoher Schwefelklasse die Intensität einbricht, während sie bei zu niedriger Schwefelklasse nur leicht reduziert ist.

Bei Entfaltung eines Isotopenmusters mit einer zu hohen Schwefelklasse, sind die Intensitäten der höheren Isotopenpeaks in den gemittelten Mustern größer als die zulässige Schwankung, so daß das Isotopenmuster reduziert (nach Bild 4-23) und eine geringere Intensität in das entfaltete Spektrum übertragen wird. Bei der Entfaltung mit einer zu kleinen Schwefelklasse wird dagegen wie in Bild 4-29(c) das Schwefel-Isotop als ein zweites Peptid interpretiert.

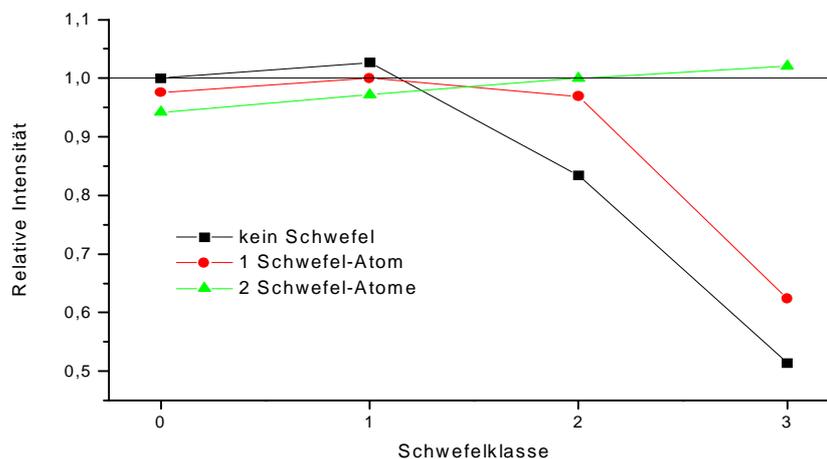


Bild 4-30: Relative Intensitäten der mit klassifizierten Isotopenmustern entfalteten monoisotopischen Peaks für drei Peptide mit 0, 1, 2 Schwefelatomen (EEKGQETIIQ-NH₂; (M+H)⁺ = 1173,6 u; EHHQCYKYYV-NH₂; (M+H)⁺ = 1368,6 u und CTMVNLHIKI-NH₂; (M+H)⁺ = 1170,6 u) abhängig von der Schwefelklasse.

4.3.2.4 Gemisch aus MHC I Peptiden

Als reale Beispiele wurden MHC-Peptidmischungen einer humanen Nierenkarzinom-Zell-Linie untersucht. Diese bieten sich wegen ihrer hohen Komplexität und der möglichen Anwendungen von MALDI und PSD-MALDI Massenspektrometrie in der immunologischen Bioanalyse an [118]. Das MALDI Massenspektrum einer HPLC-Fraktion der Peptid-Mischung ist in Bild 4-31(a) dargestellt. In der Probe sind zahlreiche Peptide in variierenden Konzentrationen enthalten, von denen jedoch nur die Verbindungen mit hohen Konzentrationen direkt identifiziert werden können, während jene mit niedrigen Konzentrationen durch den Überlapp mit Isotopenmustern anderer Peptide nicht erkannt werden können.

Durch die Isotopen-Filterung mit dem ISOCONV Algorithmus (Bild 4-31(b)) können zahlreiche weitere Signale Peptiden zugeordnet werden, und benachbarte Peptide können von Isotopenmustern unterschieden werden.

Durch eine automatische Peaksuche nach der in Kapitel 3.6.1 (Bild 3-2) beschriebenen Prozedur (Schwelle = 10 Einheiten, Untergrundsignal = 1 Einheit, Auflösung M/ΔM = 2000 bis 4000, bzw. Schwelle 8 Einheiten, Untergrund = 4 Einheiten für das experimentelle Spektrum) ergeben sich im Massenbereich von 900 u bis 1250 u im experimentellen Spektrum 79 Peaks und im entfalteten Spektrum nur 60 Peaks (Tabelle 4-19). Ein Vergleich der gefundenen Peaks zeigt jedoch, daß 39 Massen in beiden Spektren und 22 zusätzliche Massen im entfalteten Spektrum gefunden werden. Von den

40 Peaks, die nur im experimentellen Spektrum gefunden wurden, sind allein 35 als Isotopenpeaks von Peptiden mit einer kleineren Masse erklärbar, so daß nur 5 Massen vom Entfaltungsalgorithmus nicht erkannt wurden. Von diesen ist bei Zweien die Intensität im entfalteten Spektrum unterhalb der Schwelle und bei den Anderen liegt die Massenauflösung außerhalb des zulässigen Intervalls. Insbesondere bei kleineren Massen ist die Halbwerts-Breite oft höher. Hier müßte die zulässige minimale Auflösung reduziert werden.

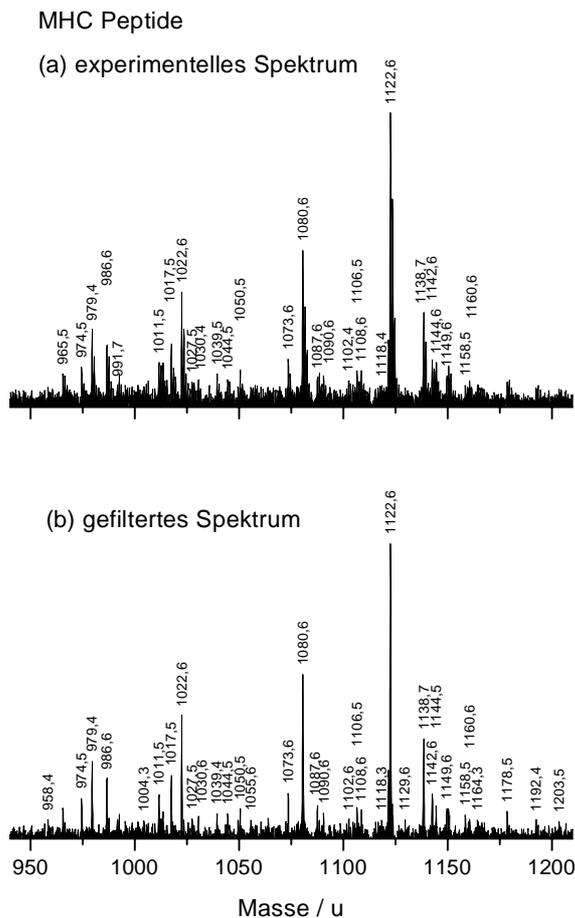


Bild 4-31: MALDI-TOF Massenspektrum einer komplexen MHC-Peptidmischung von humanen Nieren-Karzinom-Zellen. (a) experimentelles Spektrum, (b) gefiltertes Spektrum.

Tabelle 4-19: Anzahl der identifizierten Peaks aus dem MALDI-Spektrum der MHC Fraktion

	<i>im exp. Spektrum</i>	<i>im entfalteten Spektrum</i>
Gefundene Peaks	79	60
nur in einem	40	35
davon Isotopenpeaks	35	0
verwertbare Massen	44	60

Ein weiteres Beispiel einer HPLC-Fraktion von MHC-Klasse I-Peptiden des Nierenkarzinoms ist in Bild 4-32 zu sehen. Einige der Peptide wurden bereits mit Hilfe von PSD-MALDI Massenspektrometrie identifiziert und bestätigt [118]. Ein Problem tat sich

bei dem Signalmuster bei 1099,72 u auf, da das PSD-Fragment-Ionen-Spektrum zahlreiche zusätzliche Fragment-Massen enthält, die nicht durch eine einzige Sequenz erklärt werden können. Die Sequenz PASKKTDTPQK-OH ($(M+H)^+ = 1099,60$ u) konnte mit Hilfe einer Datenbanksuche gefunden und als synthetisiertes Peptid mit dem nativen Spektrum verglichen werden. Der Vergleich zeigt eine zum Teil gute Übereinstimmung, allerdings bleiben einige Fragment-Ionen-Massen ungeklärt. Durch eine Deuterierung der Probe können zwei Komponenten getrennt werden, von denen durch eine mit $(M_D+D)^+ = 1121,8$ u die Sequenz bestätigt (22 an Hetero-Atome gebundene Protonen) werden kann. Die Masse der deuterierten zweiten Komponente liegt bei $(M_D+D)^+ = 1117,8$ u, allerdings kann hiermit noch keine genaue Aussage über die Anzahl der austauschbaren Protonen gemacht werden, da die monoisotopische Masse der zweiten Komponente nicht bekannt ist. Diese kann durchaus anders als die monoisotopische Masse der ersten Komponente sein.

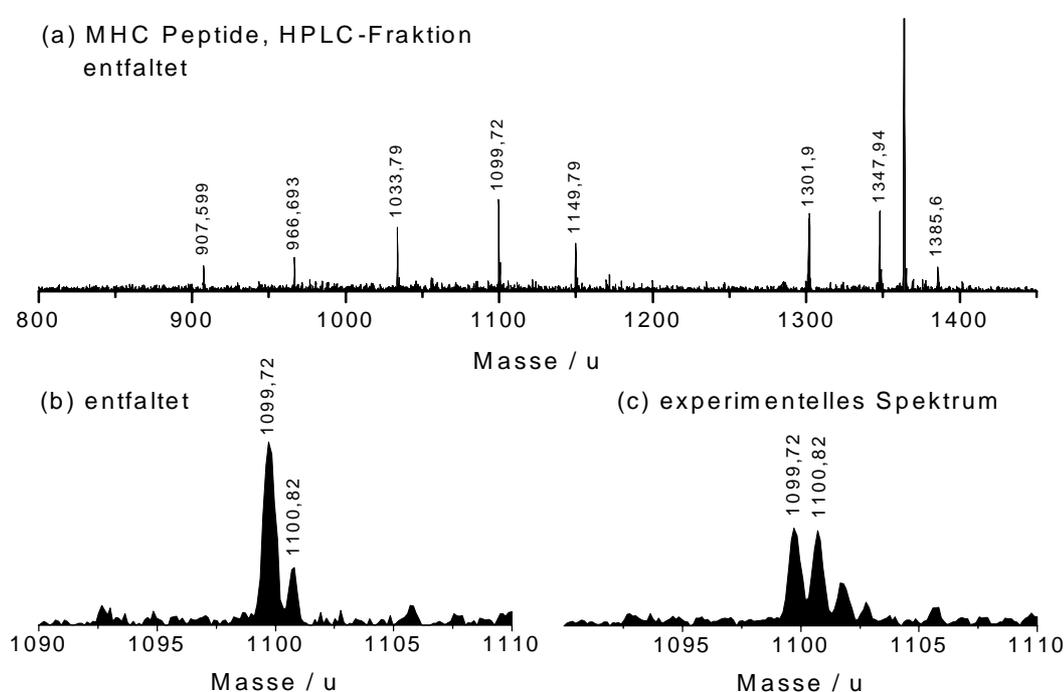


Bild 4-32: Entfaltung eines komplexen Peptid-Gemisches aus MHC-Peptiden. (a) Übersichtsspektrum, und Ausschnitt im Bereich 1100 u (b) entfaltet und (c) experimentelles MALDI-Spektrum

Tabelle 4-20: Übersicht über die Peptide, die im Bereich von 1100 u in der Fraktion enthalten sind. Die mit „?“ gekennzeichneten Einträge sind weiterhin unbekannt

<i>Masse (gemessen)</i>	<i>Intensität (entfaltet)</i>	<i>Intensität (exp.)</i>	<i>Masse (erwartet)</i>	<i>Acide Protonen</i>	<i>Sequenz</i>
1099,72 u	130,694	71,44	1099,60 u	22	PASKKTDTPQK-OH
1100,82 u	42,5614	69,52	?	17	?

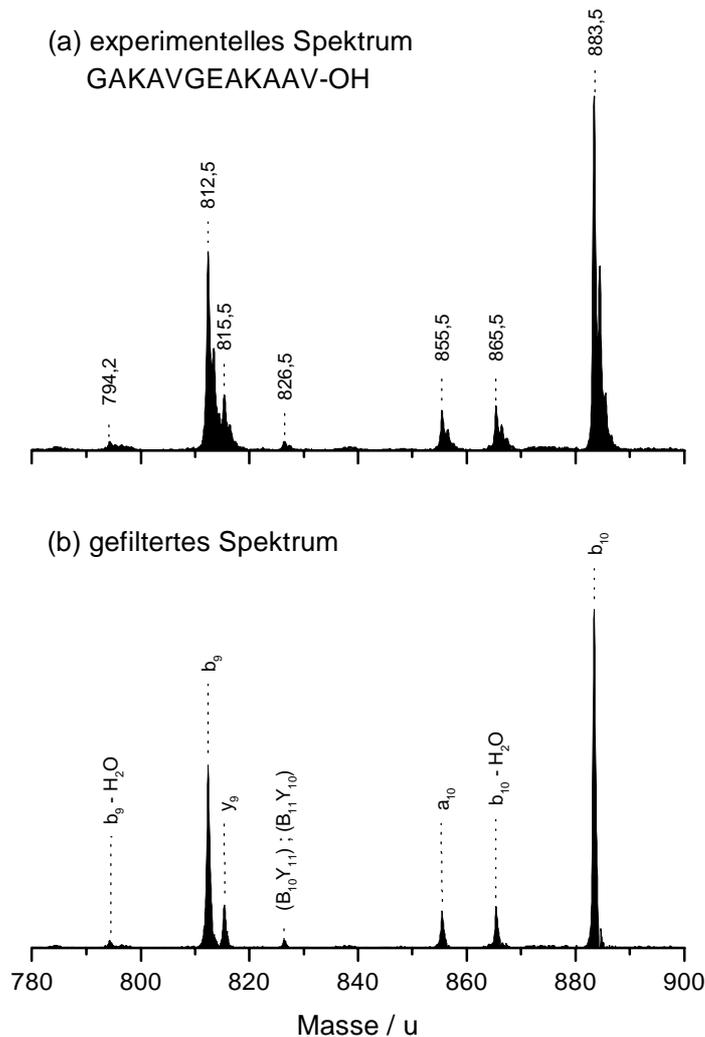


Bild 4-33: Ausschnitt aus dem entfalteten Spektrum eines Fragment-Ionen-Spektrum eines Peptids (GAKAVGEAKAAV-OH) ($M+H$)⁺ = 1071,62 u

Durch die Entfaltung mit ISOCONV, die in Bild 4-32(a) und (b) dargestellt ist, wird deutlich, daß im Bereich von 1100 u zwei Peptide mit verschiedenen Massen vorkommen. Neben dem bereits identifizierten Peptid bei 1099,60 u gibt es noch ein zweites Peptid bei 1100,8 u ($\pm 0,2$ u), welches mit etwa 30 % der Intensität des ersten Peptids vorkommt. In Tabelle 4-20 sind die bekannten Daten aufgeführt. Indem die zweite bei der Deuterierung entstehende Komponente dem Peptid bei 1100,8 u zugeordnet wird, wird die Zahl der aciden Protonen, auf 17 gesetzt. Die Möglichkeit, daß das Peptid 21 acide Protonen besitzt, und so die deuterierten Peaks beider Peptide aufeinander fallen, kann ausgeschlossen werden.

Eine Datenbanksuche mit der Sequenz PASKKTDPQK-OH ergibt zwei mögliche Proteine: RAGE-3 mit 7,99 kDa und MOK-Protein-Kinase mit 48,59 kDa. Zwar ergibt eine Suche nach einem Teilpeptid mit der Masse 1100,8 u in dem größeren Protein 5 mögliche Teilsequenzen, die Anzahl der aciden Protonen stimmt jedoch in keinem Fall überein.

4.3.3 Anwendung auf PSD-Fragment-Ionen-Spektren

4.3.3.1 Synthetisches Peptid

Ein Beispiel für die Entfaltung eines Fragment-Ionen-Spektrums eines Peptids ist in Bild 4-33 abgebildet. Von dem synthetischen Peptid GAKAVGEAKAAV-OH ($(M+H)^+ = 1071,62$ u) ist ein Ausschnitt des b_9 und b_{10} Fragment-Ions zu sehen. Durch das verbesserte Signal/Rausch-Verhältnis und die Unterdrückung von höheren Isotopenpeaks werden die Fragment-Ionen-Peaks deutlicher erkennbar. So läßt sich der Peak bei 815,5 u eindeutig als y_9 -Ion identifizieren, während er im experimentellen Spektrum auch ein Isotopenpeak des b_9 -Ions sein könnte. Darüber hinaus läßt sich anhand des entfalteten Spektrums eindeutig bestimmen, daß die b-Ionen (b_9 und b_{10}) zusätzlich eine Wasserabspaltung bilden (b_9-H_2O und $b_{10}-H_2O$), wobei es keine Abspaltung einer Amid-Gruppe ($b-NH_3$) gibt. Wird das Isotopenmuster nicht berücksichtigt, gibt es insbesondere bei 866,5 u die Möglichkeit der Fehlinterpretation als $b_{10}-NH_3$ (865,5 u), da dieser Isotopenpeak gut aufgelöst ist.

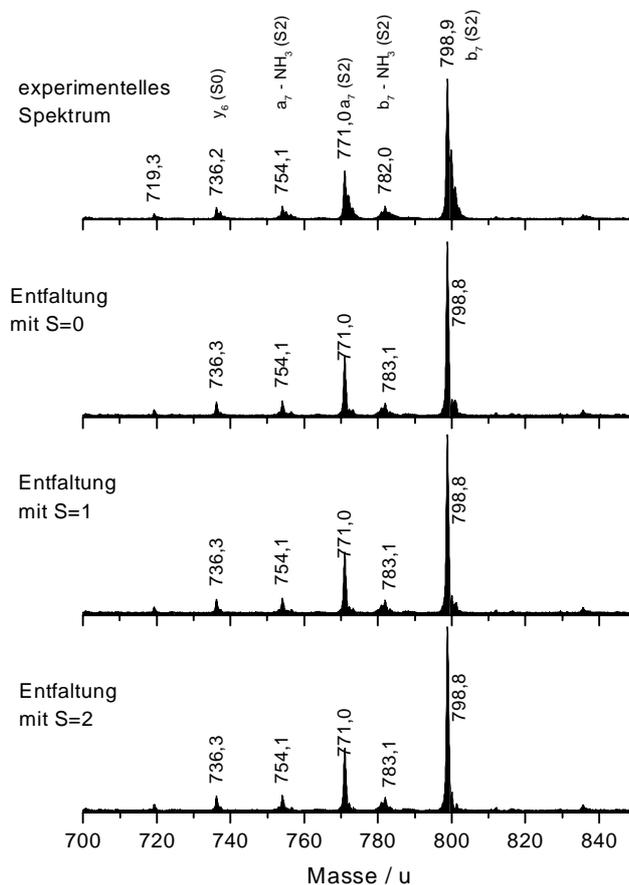


Bild 4-34: Entfaltung eines MALDI-PSD Massenspektrums eines Peptids (CTMVNLHIKI-NH₂; $(M+H)^+ = 1170,6$ u) mit verschiedenen gemittelten Isotopenmustern.

4.3.3.2 Synthetische Peptide mit klassifizierten Isotopenmustern

Wenn die Anzahl der Schwefelatome bekannt ist, kann der Entfaltungsalgorithmus mit reduzierten Schwankungen verwendet werden. Bei einem PSD-Fragment-Ionen Spektrum

kann die Zahl der Schwefelatome mit Hilfe des Muttermoleküls geschätzt werden (Kapitel 4.2.5).

Das Problem bei einem PSD-Fragment-Ionen Spektrum von schwefelhaltigen Peptiden ist, daß sowohl schwefelfreie als auch schwefelhaltige Fragment-Ionen direkt nebeneinander beobachtet werden können.

Die Entfaltung mit klassifizierten gemittelten Isotopenmustern zeigt jedoch nur geringe Unterschiede zwischen den schwefelhaltigen und den schwefelfreien Fragment-Ionen (Bild 4-34). Dieser geringe Unterschied kann durch die kleine relative Intensität des dritten Isotopenpeaks erklärt werden.

Für die Entfaltung von PSD-MALDI Massenspektren ist es folglich nicht wichtig zu wissen, wie viele Schwefelatome das Peptid besitzt.

4.3.3.3 Peptid-Gemisch aus einem Verdau

Die bei einem Protein-Verdau entstehenden Peptide liegen häufig so dicht zusammen, daß Interferenzen zwischen den Isotopenpeaks auftreten. Als Beispiel ist in Bild 4-35 der Verdau mit Chymotrypsin eines 30 kDa Proteins (COX3 Cytochrome C Oxidase III) zu sehen. Der Verdau wurde vor der Präparation mit ZipTips gereinigt und in drei Stufen fraktioniert (40 %, 60 %, 80 % Acetonitril). Abgebildet ist das MALDI-Übersichtsspektrum der Elution bei 80 % Acetonitril-Gehalt. In der oberen Abbildung ist das experimentelle und in der unteren Abbildung das entfaltete Spektrum dargestellt. Die Massenliste des entfalteten Spektrums enthält weniger Peaks, als die des experimentellen Spektrums. Dort lassen sich jedoch zahlreiche Einträge durch Isotopenpeaks erklären.

Für die Online-Datenbanksuche werden die Massenlisten ohne weitere Änderungen verwendet. Für das experimentelle Spektrum (161 Massen) wurden mehr als 750 Proteine gefunden, mit der Massenliste des entfalteten Spektrums (131 Massen) ist die Anzahl bereits auf 607 Proteine eingeschränkt. Betrachtet man die 30 besten Treffer, fällt zunächst auf, daß beim entfalteten Spektrum Chymotrypsinogen A die meisten Übereinstimmungen besitzt (11 Peptide), während hierfür bei dem unbearbeiteten Originalspektrum nur 9 Treffer gefunden wurden. Ferner wurden mit dem entfalteten Spektrum 9 Proteine als Cytochrome Fragmente oder Cytochrome Oxidase identifiziert, die eine teilweise Sequenz-Homologie zu dem gesuchten Protein besitzen.

Weiter ist noch zu beachten, daß die Verdau-Peptide vor der MALDI Messung fraktioniert wurden. Werden alle drei Fraktionen zusammengefasst, ergeben sich 194 verschiedene Peptidmassen, die bei einer Suche erneut gute Übereinstimmungen mit Cytochrome-Fragmenten und Cytochrome Oxidase zeigen.

Ein Vergleich mit der bekannten Sequenz des Proteins führt, bei einer Massengenauigkeit von 0,5 u, mit der zusammengefaßten Massenliste zu insgesamt 13 exakten Übereinstimmungen, bei denen beide Peptid-Enden einer Chymotrypsin spezifischen Schnittstelle entsprechen.

Durch ein PSD-Fragment-Ionen Spektrum (Bild 4-36) kann ein Sequenzvorschlag gebildet werden, mit dessen Hilfe ebenfalls nach dem richtigen Protein gesucht werden kann. Dazu kann eine Teilsequenz bestimmt werden und in einer Online Datenbank (EMBL, Heidelberg) nach dieser gesucht werden. Angaben sind die Masse des Peptids, sowie die

Teilsequenz mit Angabe der Massen der b-Fragment-Ionen, die die Teilsequenz begrenzen in der Form (Startmasse)Sequenz(Endmasse). Es ist auch eine Suche mit den Massen der y-Fragment-Ionen möglich. Mit den Angaben „(367,8)NPS(665,2)“ in einem Peptid mit $(M+H)^+ = 1177,6$ u, führt diese Suche zu einer einzigen möglichen Sequenz, die allerdings in 70 (homologen) Proteinen vorkommt. Der Vergleich der gefundenen Sequenz HMVNPSWPL-OH mit dem PSD-MALDI Spektrum (Bild 4-36) führt zu einer guten Übereinstimmung. Allein durch die Kenntnis der Spezies (Ratte) kann das richtige Protein identifiziert und bestätigt werden.

Die Identifikation der Teilsequenz ist durch die Entfaltung des PSD-Fragment-Ionen Spektrums eindeutiger als ohne Entfaltung, da die Wahrscheinlichkeit einer Fehlinterpretation durch einen Isotopenpeak reduziert wird. Im unteren Massenbereich (> 300 u) ist der Vorteil allerdings nur gering, da die Intensität der höheren Isotopenpeaks dort nur sehr klein ist.

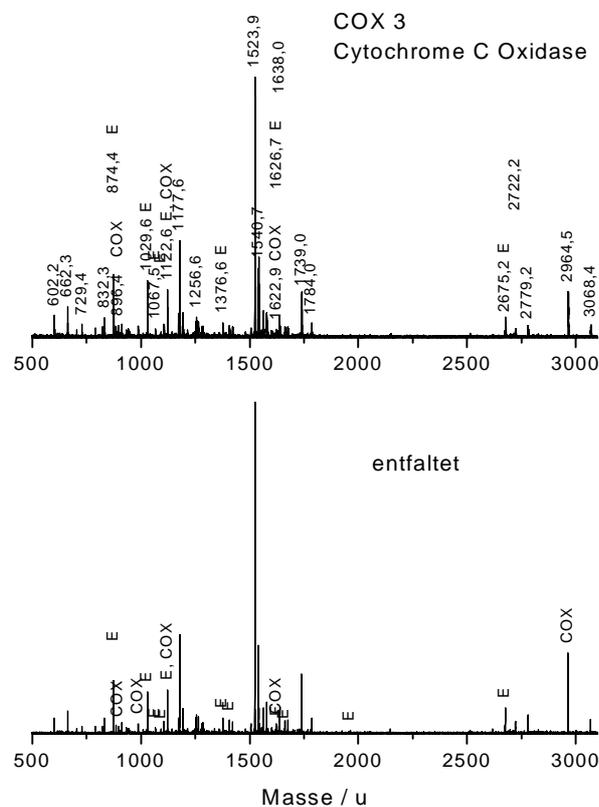


Bild 4-35: MALDI-Übersicht-Spektrum des Verdaus (Chymotrypsin) von COX 3 (Cytochrome C Oxidase III). Oben experimentelles Spektrum, unten entfaltetes Spektrum. Die Peptide des Eigenverdaus sind mit E, die COX 3 Fragmente mit COX gekennzeichnet.

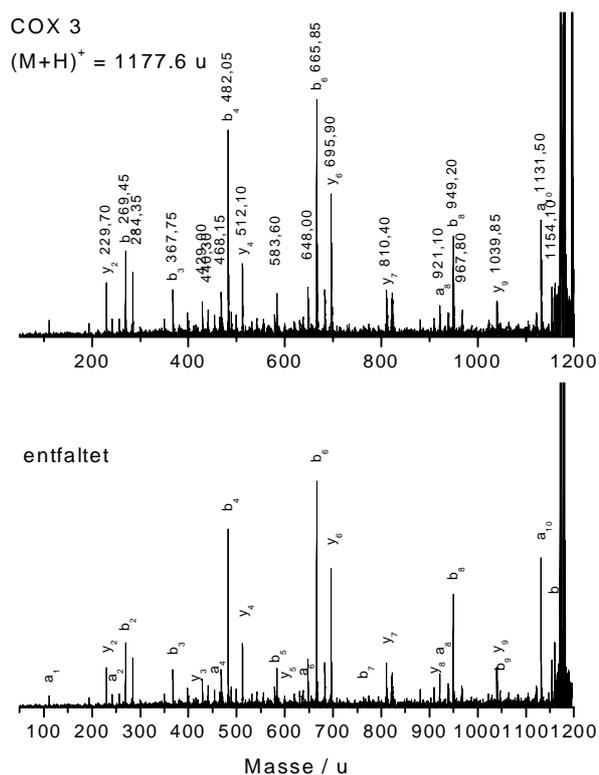


Bild 4-36: MALDI-PSD Massenspektrum des Peptids $(M+H)^+ = 1177.6 \text{ u}$, (HVMNPSWPL-OH). Oben experimentelles Spektrum, unten entfaltetes Spektrum

4.4 Entfaltung von ESI-Massenspektren

Bei der Elektrospray-Ionisations (ESI) Massenspektrometrie treten im Gegensatz zur MALDI-Massenspektrometrie nicht nur einfach geladene Molekül-Ionen auf, sondern es entstehen bevorzugt eine Reihe höher geladener Molekül-Ionen vom Typ $(M+nH)^{n+}$. Von diesen wird in einem Massenspektrometer das m/z -Verhältnis bestimmt, so daß sich daraus nicht mehr direkt wie bei MALDI-MS die Molekül-Ionen-Masse ablesen läßt. Die Anwendung der Entfaltungsprozedur ist nicht ohne Anpassung möglich, da von einer Peak-Gruppe der Ladungszustand bekannt sein muss, um sie mit einem gemittelten Isotopenmuster vergleichen zu können. Bei einem einfach geladenen Ion besitzen die Isotopenpeaks auf der m/z -Skala den Abstand 1 u, während beispielsweise die Peaks eines zweifach geladenen Ions den Abstand 0,5 u aufweisen.

4.4.1 Berücksichtigung der Ladung

Im Massenspektrum eines n -fach geladenen Ions wird ein Isotopenmuster beobachtet, dessen Isotopenpeaks auf der m/z -Achse den Abstand $1/n$ besitzen. Wird der monoisotopische Peak mit einer anderen Ladung als n interpretiert, liegen die erwarteten Isotopenpeaks bei anderen m/z -Werten, so daß das gemittelte Isotopenmuster nicht unter das Peak-Muster gelegt werden kann. Das Beispiel in Bild 4-37(a) zeigt, wie ein 2-fach geladenes gemitteltes Isotopenmuster unter ein 1-fach geladenes Peak-Muster gelegt wird.

Bei dem zweiten und vierten Isotopenpeak ist in diesem idealisierten Fall das Signal im Spektrum gleich Null, so daß der in Kapitel 4.3.1 in Bild 4-23(d) beschriebene Fall eintritt, und das gemittelte Isotopenmuster auf Null reduziert wird (Intensität des zweiten Isotops). In Bild 4-37(b) wird dagegen das Isotopenmuster eines 1-fach geladenen Ions unter ein experimentelles 2-fach geladenes Isotopenmuster gelegt. In diesem Fall liegt das experimentelle Isotopenmuster im Schwankungsbereich des gemittelten Musters und es würde bei der aktuellen Masse ein Geisterpeak erzeugt, der die halbe Masse des tatsächlichen Ions besitzt.

Die Beispiele, die in Bild 4-37 dargestellt sind, verdeutlichen, daß für die Unterdrückung von Geisterpeaks die Reihenfolge, mit der die Entfaltung durchgeführt wird, von Bedeutung ist. Zuerst müssen die höchsten Ladungszustände aus dem experimentellen Spektrum herausgerechnet werden, da diese bei den niedrigeren Ladungszuständen zu Fehlinterpretationen führen. Durch das Abziehen der Muster werden nur Peaks mit der richtigen und höheren Ladungen berücksichtigt. Bei einem experimentellen Peak mit einer niedrigeren Ladung liegt im experimentellen Spektrum bei der Masse des zweiten Isotopenpeaks das Signal in Untergrundhöhe. Deswegen wird kein Signal aus dem Originalspektrum abgezogen und in das entfaltete Spektrum eingetragen. Mit dem verbleibenden Spektrum wird die Prozedur anschließend für die nächst kleinere Ladung wiederholt. Die Peaks mit der höheren Ladung, die zu Fehlinterpretationen geführt hätten, sind durch den ersten Durchlauf bereits abgezogen worden.

Für die Zuordnung der Masse ist es wichtig zu berücksichtigen, daß die Ionen als $(M+nH)^{n+}$ -Ionen nachgewiesen werden. Zum Vergleich verschiedener Ladungszustände muss daher der gemessene m/z -Wert auf die Masse eines einfach geladenen Ions hochgerechnet werden.

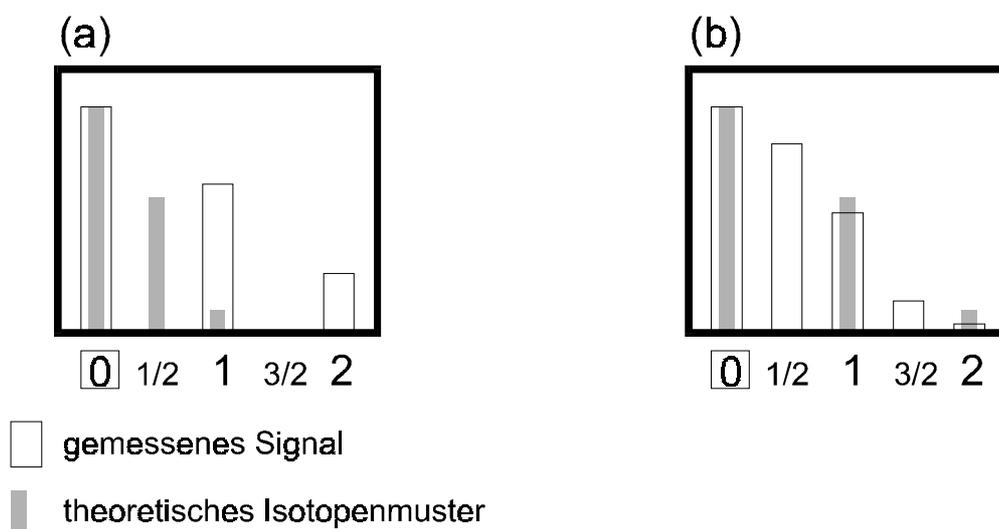


Bild 4-37: *Behandlung des Isotopenmusters bei verschiedenen Ladungen. (a) Das gemessene Molekül-Ion ist 1-fach, das gemittelte 2-fach geladen; (b) das gemessene Molekül-Ion ist 2-fach, das gemittelte 1-fach geladen.*

Der idealisierte Fall einer vollständigen Unterdrückung tritt allerdings nur ein, wenn die Auflösung der Isotopenmuster groß ist im Vergleich zu den Abständen der Isotopenpeaks von Ionen mit einer höheren Ladung. Bei einem Peak bei $m/z = 1000$ u und einer

Massenauflösung von $m/\Delta m = 8000$ beträgt die Halbwerts-Breite des Peaks $\Delta m = 0,125$ u. Wird dieser Peak mit dem Isotopenmuster eines 8-fach geladenen Molekül-Ions verglichen, liegt die monoisotopische Masse des Isotopenmusters auf der Anstiegsflanke des Peaks und der zweite Isotopenpeak an der abfallenden Flanke des selben Peaks. Eine Bearbeitung dieses Spektrums mit der Ladung $q = 8$ würde aus dem Peak bei 1000 u folglich unabhängig von der tatsächlichen Masse und Ladung des Ions einen intensiven Geisterpeak bei 8000 u produzieren.

Diese Fehlinterpretationen können reduziert werden, wenn die lokale Peakform der Datenkanäle berücksichtigt wird. Dazu wird vor der Behandlung des Spektrums zu jedem Kanal gespeichert, ob an dieser Stelle eine ansteigende oder abfallende Flanke, oder ein Maximum bzw. Minimum vorliegen. Bei der Entfaltungsprozedur wird vor dem Vergleich der Intensitäten zunächst dieser Steigungswert der Kanäle der Isotopenpeaks mit dem Steigungswert des monoisotopischen Peaks verglichen. Liegen zwei entgegengesetzte Fälle vor, zum Beispiel Anstieg und Abfall, wird davon ausgegangen, daß das Peak-Muster eine andere Ladung besitzt, und der Kanal wird übersprungen. Welche Fälle auftreten können und wie diese behandelt werden, ist in Tabelle 4-21 dargestellt. Unter „Erster Peak“ versteht man den Steigungsverlauf des Kanals bei der monoisotopischen Masse. Der Steigungsverlauf bei einem Isotopenpeak wird durch „Zweiter Peak“ angegeben. Ein Haken in der Tabelle bedeutet, daß dieser Fall akzeptiert wird, bei einem \otimes wird der Datenkanal bei dieser Ladung übersprungen. Die Symbole über den Spalten/ Zeilen stellen die Steigung an dem Datenkanal dar, indem mit den benachbarten Kanälen verglichen wird. Verläuft die Linie von links unten nach rechts oben (links oben nach rechts unten), befindet sich der Datenpunkt auf einer ansteigenden (abfallenden) Flanke. Die Haken stellen ein lokales Maximum, bzw. Minimum dar.

Berücksichtigt man die begrenzte Auflösung eines Massenspektrums, ist die Berücksichtigung der Peakform nur anwendbar, wenn Isotopenpeaks deutlich voneinander getrennt werden können. Allerdings kann die Entfaltungsprozedur bei Signalen, deren Isotopenpeaks nur leicht voneinander getrennt sind, auch ohne Berücksichtigung der Peakform, nicht vollständig die richtige Ladung bestimmen. Auch bei einer höheren Ladung wird bereits ein Teil des Signals abgezogen.

Als Faustregel kann gelten, daß die durch die Massenauflösung bedingte Halbwerts-Breite des Peaks maximal $2/3$ des Abstandes zwischen zwei Isotopenpeaks eines Molekül-Ions mit der Ladung betragen darf. Für das Beispiel des Peaks bei $m/z = 1000$ u mit der Auflösung $m/\Delta m = 8000$ ergibt sich eine Halbwerts-Breite von $\Delta m = 0,125$ u, wodurch die maximale Ladung, die man mit der Entfaltungsprozedur bearbeiten kann, $q = 5$ beträgt, bei der die Isotopenpeaks um 0,2 u getrennt sind. Folglich kann ein Molekül-Ion bei 500 u bei gleicher Auflösung bis zur Ladung $q = 10$ mit der Entfaltungsprozedur behandelt werden.

In Bild 4-38 ist der schematische Ablauf der Entfaltungsprozedur für mehrere Ladungen aufgezeigt. Nach dem Laden und der Untergrundbehandlung wird für jeden Datenpunkt die Steigung bestimmt und gespeichert. Danach folgt, angefangen bei der höchsten Ladung, die Entfaltungsprozedur. Da für jede Ladung die entfalteteten Signalintensitäten separat erzeugt werden, erhält man mehrere Einzelspektren von Ionen mit konstanter Ladung, die auf die monoisotopischen Massen transformiert werden. Zusätzlich wird die Summe der Einzelspektren gespeichert. Da die hochgerechneten Massen aus den verschiedenen

Ladungszuständen, wegen der Massengenauigkeit, unterschiedliche Werte ergeben können, muss die Summe der Einzelspektren in ein definiertes Massenraster summiert werden. Die Rasterweite darf nicht zu klein gewählt werden, da sich der Massenabstand der Kanäle im Einzelspektrum durch das Hochrechnen der Massen von Peaks mit hoher Ladung erhöht. Ist die Rasterweite zu klein, wird nicht jeder Datenkanal des zusammengesetzten Spektrums gefüllt, und es entstehen Kanäle mit Nullsignal im Wechsel mit korrekten Kanälen.

Tabelle 4-21: Behandlung der Steigung als Ausschluss-Kriterium bei der Entfaltung. Die Symbole stellen den Verlauf in der Umgebung des Datenpunktes dar. Ein Haken (✓) deutet an, daß der Fall behandelt wird, die Fälle mit einem ☹ werden nicht behandelt. Die Erklärung der Steigungssymbole erfolgt im Text.

		Zweiter Peak			
		/	\	^	v
Erster Peak	/	✓	☹	✓	✓
	\	☹	✓	✓	✓
	^	✓	✓	✓	☹
	v	✓	✓	☹	✓

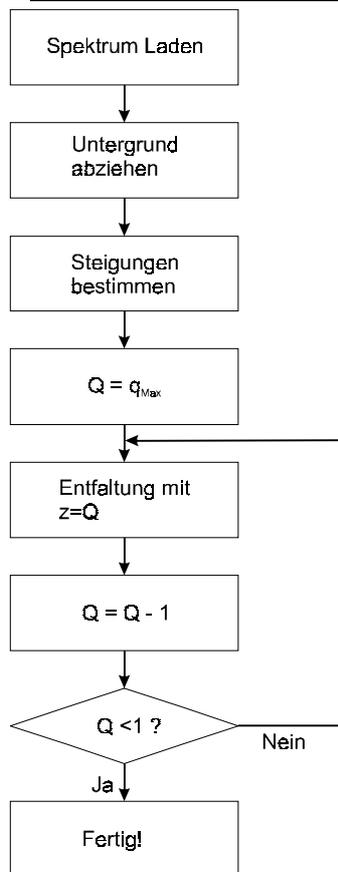


Bild 4-38: Programm-Ablauf-Plan (PAP) bei der Entfaltung von ESI-Spektren mit mehreren Ladungen.

4.4.2 Angiotensinogen (1-14) (porcine)

In Bild 4-39(a) ist ein ESI-Massenspektrum von einer Mischung aus den zwei Peptiden, Angiotensinogen (1-14) (porcine) $((M+H)^+ = 1758,92 \text{ u})$ und Melittin $((M+H)^+ = 2845,76 \text{ u})$, dargestellt. Zahlreiche der nachgewiesenen Signale lassen sich als Ladungszustände der beiden Peptide erklären (Tabelle 4-22), jedoch ist die Zuordnung nur nach einer genauen Untersuchung des Spektrums möglich, bei der die Isotopenmuster berücksichtigt werden, um die Ladung zu bestimmen.

Tabelle 4-22: Zuordnung der detektierten Peaks zu den Peptiden Angiotensinogen (1-14) (porcine) (DRVYIHPFLLVYS-OH) (Angt) und Melittin (GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂)

<i>m/z</i>	<i>Ladung</i>	<i>Molekül</i>	<i>Berechnete Masse / u</i>	<i>Fehler / u</i>
440,48	4+	Angt	1758,9085	0,0247
586,99	3+	Angt	1758,9394	-0,0062
879,96	2+	Angt	1758,8642	0,0690
569,95	5+	Melittin	2845,7237	0,0384
712,19	4+	Melittin	2845,7525	0,0096

Das Ergebnis der Entfaltung ist in Bild 4-39(b) abgebildet, wobei der Ausschnitt in Bild 4-39(c) den Bereich des Angiotensinogen Moleküls und die grosse Abbildung den Gesamtbereich zeigt. Im Gesamtbereich treten die monoisotopischen Signale von Angiotensinogen und Melittin deutlich hervor, die weiteren markierten Peaks sind als Fragmente von Angiotensinogen (1165,8 u bis 1740,9 u) erklärbar. Der Ausschnitt zeigt deutlich, daß sowohl der Peak bei 1740,87 u als auch der bei 1758,95 u nur noch ein einziges, monoisotopisches Signal produzieren, obwohl die Peaks die Summe aus mehreren Einzelspektren (Ladungen) darstellen.

Für die Entfaltungsprozedur wurde $q = 5$ als maximale Ladung gewählt. Die Schwankung der gemittelten Isotopenmuster variiert mit dem Isotopenpeak und wurde auf $20\% + 20\% \cdot (I-2)$ gesetzt, was bedeutet, daß die Schwankung des zweiten Isotopenpeaks 20 % beträgt und diese mit jedem höheren Isotop um weitere 20 % ansteigt. I ist die Nummer des Isotopenpeaks. Für den ersten Isotopenpeak (monoisotopischer Peak) ist die Schwankung gleich Null, da auf diesen normiert wird. Der gesamte in Bild 4-39(a) dargestellte Massenbereich von 300 u bis 1000 u, wurde zur Berechnung herangezogen. Oberhalb dieser Masse sind im Originalspektrum keine Signale mehr zu beobachten und unterhalb von 300 u ist der chemische Untergrund von anderen Komponenten, die unter anderem vom Lösungsmittel stammen, zu intensiv. Hauptsächlich werden in diesem Bereich einfach geladene Ionen beobachtet. Als weitere Option wurde bei der Berücksichtigung der Datenkanäle die Peak-Steigung nach den in Tabelle 4-21 beschriebenen Ausschluss-Kriterien berücksichtigt.

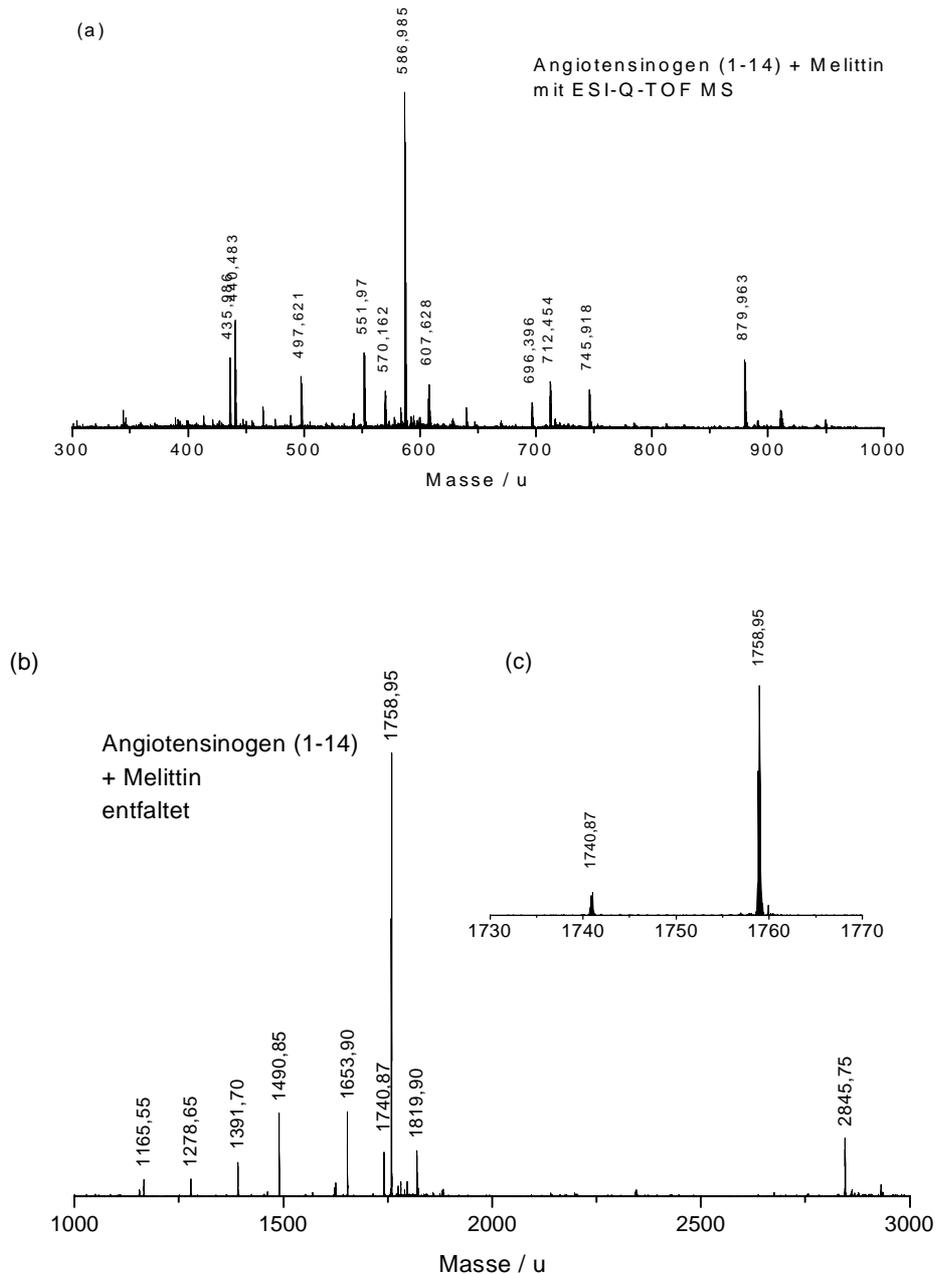


Bild 4-39: (a) ESI-Massenspektrum einer Mischung aus den Peptiden Angiotensinogen (1-14) (porcine) ($(M+H)^+ = 1758,92$ u) und Melittin ($(M+H)^+ = 2845,76$ u). (b) Entfaltetes ESI-Massenspektrum von Angiotensinogen (1-14) und Melittin. Die weiteren Peaks können als Fragmente von Angiotensinogen (1-14) erklärt werden. Als höchste Ladung wurde $q=5$ angenommen. Die Schwankung der Isotopenmuster beträgt $20\%*(I-1)$, (c) Ausschnitt aus dem entfalteten Massenspektrum

Ein wichtiger Vorteil der Entfaltungsprozedur ist der, daß die Spektren der Ionen mit konstanter Ladung separat dargestellt werden können. In Bild 4-40 sind die fünf Einzelspektren für jede Ladung abgebildet. Abhängig von der Ladung werden im beobachteten Massenbereich des Originalspektrums unterschiedliche Massenbereiche erwartet, was in der Abbildung durch die grauen Einrahmungen hervorgehoben wird. Der Anteil der Ionen mit der Ladung $q = 3$ überwiegt in diesem Spektrum, so daß alle anderen Ladungen um den Faktor 3 erhöht dargestellt werden (für $q = 1$ um den Faktor 10 erhöht).

Das Melittin Molekül-Ion wird als 4- und 5-fach geladenes Ion nachgewiesen, während das Angiotensinogen bei $q = 2, 3$ und 4 detektiert wird. Ein 5-fach geladenes Ion ist vom Angiotensinogen nicht nachweisbar, ebenso ein 3-fach geladenes Ion von Melittin, obwohl beide Ionen noch innerhalb des entfalteten Massenbereichs liegen würden. Die anderen detektierten Ionen treten hauptsächlich als 2-fach und 3-fach geladene Ionen auf. Einzige Ausnahme bildet der Peak bei $1740,9$ u, der als 4-fach geladenes Ion auftritt.

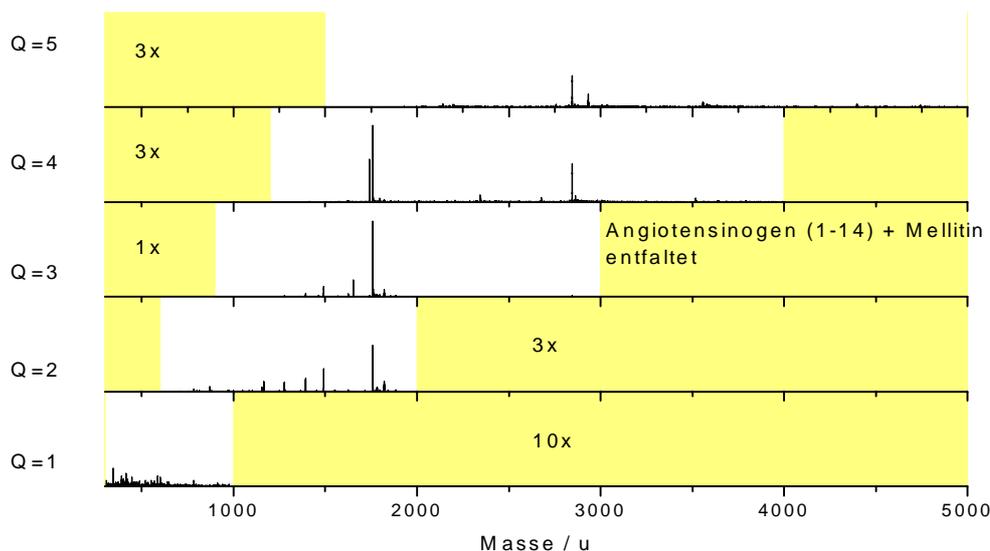


Bild 4-40: Vergleich der Ladungen, die aus dem ESI-Massenspektrum von Angiotensinogen (1-14) und Melittin entfaltet wurden. Außer dem Spektrum für $q = 3$ sind alle Spektren überhöht dargestellt.

Ein entfaltetes Spektrum kann Fehler aufweisen, falls ein Peak mit der falschen Ladung interpretiert wird. Die dadurch entstehenden Geisterpeaks können zum größten Teil bereits durch die richtige Reihenfolge der Bearbeitung (Ladung von groß nach klein) unterdrückt werden, was in Bild 4-37 schematisch beschrieben wurde. Das Beispiel in Bild 4-41 zeigt, daß zur Vermeidung von Geisterpeaks auch die Berücksichtigung der Peakform eine Rolle spielt. Dazu sind für das 2-fach geladene Ion von Angiotensinogen (1-14) ($m/z = 879,9$ u) die Massenbereiche gezeigt, bei denen dieses Ion als 5, 4, 3, 2 oder 1-fach geladenes Ion ein Signal erzeugen würde. In Bild 4-41(a) ist die Entfaltung mit Berücksichtigung der lokalen Steigung und in Bild 4-41(b) ohne Berücksichtigung der lokalen Steigung durchgeführt worden. Bei den höchsten Ladungen ($q = 4$ und 5) wird in beiden Fällen auf einigen Datenkanälen ein kleines Signal bestimmt, während der Massenbereich für die Ladungen $q = 3$ und $q = 1$ praktisch gleich Null ist. In beiden Fällen wird bei $q = 2$ das mit Abstand intensivste Signal richtig erzeugt.

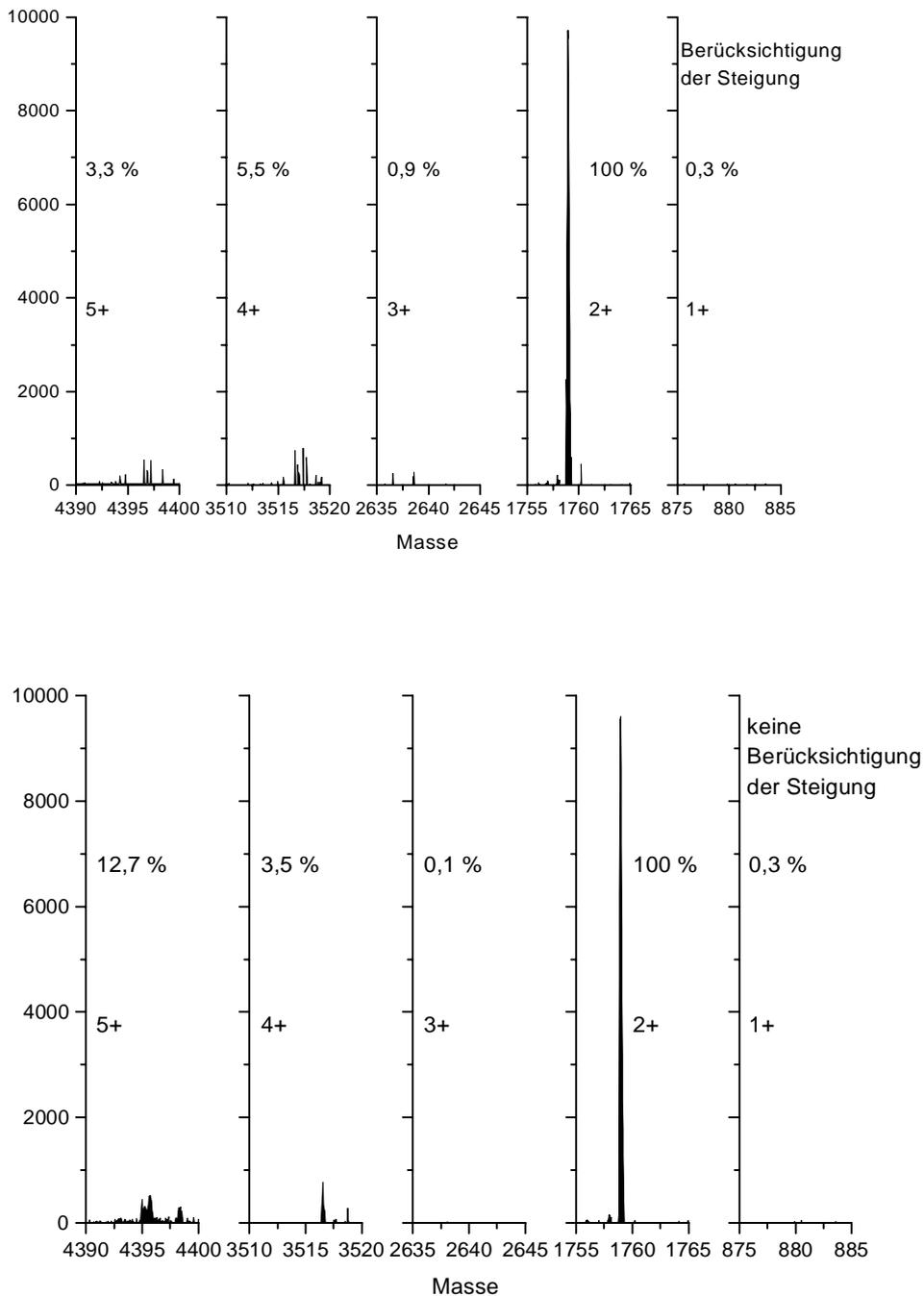


Bild 4-41: Querempfindlichkeit des 2-fach geladenen Ions von Angiotensinogen (I-14) (porcine) ($m/z = 879,9$ u) bei der Interpretation als 5-, 4-, 3-, 2- und 1-fach geladenes Ion. (a) mit Berücksichtigung der Steigung an dem aktuellen Datenkanal und den Isotopensignalen und (b) ohne Berücksichtigung der Steigungen.

Die Fläche des Signals bei $q = 4$ und 5 ist bei dem Spektrum mit Berücksichtigung der Steigung kleiner als ohne Berücksichtigung der Steigung. Die in der Abbildung angegebenen relativen Flächen sind auf die Fläche des Peaks mit der „richtigen“ Ladung bei $q = 2$ als 100 % bezogen. Der Anteil der Signalfläche bei den anderen Ladungen liegt ohne Steigung bei 16,6 % und fällt durch die Berücksichtigung der Steigung auf 10 % ab.

Insbesondere bei der höchsten Ladung ($q = 5$) ist die Abnahme der Fläche besonders deutlich. Die Signalform in den Intervallen mit der falschen Ladung unterscheidet sich deutlich von einem Molekülpeak, wie dieser bei $q = 2$ beobachtet werden kann. Statt eines breiten Peaks, werden nur einzelne Datenkanäle ungleich Null, so daß durch eine Peak-Erkennung die Molekülpeaks leicht von Fehlinterpretationen unterschieden werden können. Ohne Berücksichtigung der Steigung verläuft das Signal bei $q = 5$ ebenfalls über ein breiteres Intervall und kann als Peak fehlinterpretiert werden.

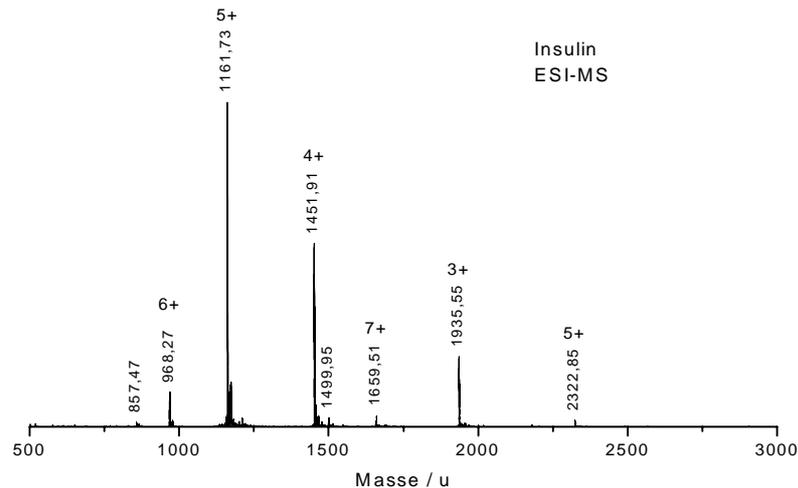


Bild 4-42: ESI-Massenspektrum von Insulin

4.4.3 Insulin, Vergleich mit Hypermass

Bei ESI-Massenspektrometrie werden Peptide und Proteine unabhängig von ihrer Masse stets bei einem Masse/Ladungs-Verhältnis im Bereich um 1000 u nachgewiesen. Dadurch entstehen von schwereren Molekülen entsprechend höher geladene Ionen. Das Spektrum in Bild 4-42 zeigt ein ESI-Massenspektrum von Insulin (Molekülmasse ~ 5800 u). Hier werden die 3- bis 6-fach geladenen Molekül-Ionen nachgewiesen. Alle Molekül-Ionen sind mit einer Auflösung von $m/\Delta m > 8000$ noch isotopenaufgelöst, so daß der Entfaltungsalgorithmus angewendet werden kann.

In Bild 4-43 ist das entfaltete Massenspektrum dargestellt. Die hierfür verwendete maximale Ladung beträgt $q_{\text{Max}} = 6$. Es fällt auf, daß neben dem korrekten Insulin-Signal bei 5804,75 u noch einige weitere Signale auftreten. Diese Peaks sind durch Fehlinterpretationen der Ladung von Insulin-Signalen entstanden, da die Isotopenpeaks nicht vollständig bis zur Grundlinie aufgelöst waren. Beispielsweise entsteht der Peak bei 6966,05 u durch die Interpretation des 5-fach geladenen Peaks bei 1161,949 u als ein 6-fach geladenes Ion.

Die Masse des Dimers ist mit 11610,3 u bestimmt worden. Dies ist 2 u schwerer, als die errechnete Masse von zwei Insulin-Molekülen. Der direkte Vergleich mit dem Isotopenmuster im Spektrum aus Bild 4-42 belegt allerdings die Zuordnung der Masse.

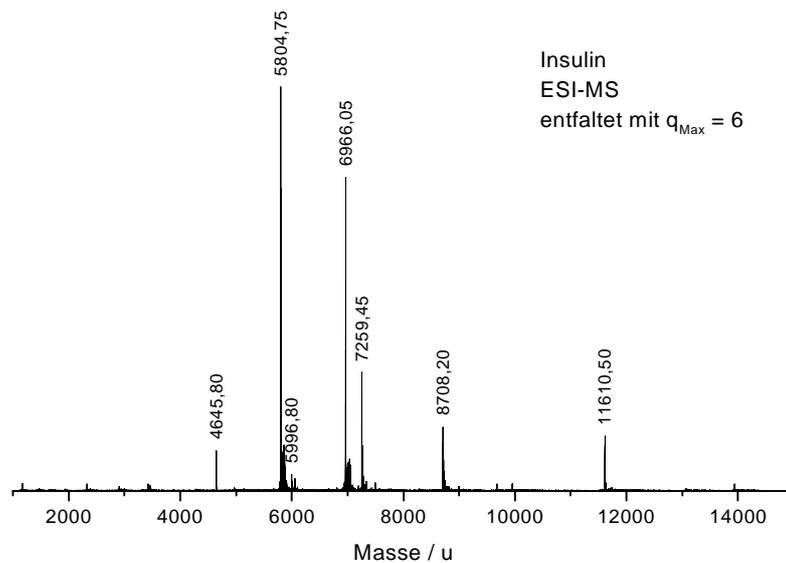


Bild 4-43: Entfaltetes ESI-Massenspektrum von Insulin. Die maximale Ladung beträgt $q_{\text{Max}}=6$. Die Einzelspektren der Ladungen wurden anschließend addiert.

Eine genauere Interpretation der Peaks ergibt sich, wenn die Einzelspektren der Ladungen direkt miteinander verglichen werden. Dies ist in Bild 4-44 für die Entfaltung mit $q_{\text{Max}} = 7$ abgebildet. Der entfaltete Massenbereich ist durch die graue Unterlegung eingerahmt, das heißt, innerhalb des grauen Bereichs können keine Ionen der angegebenen Ladung erwartet werden. In Bild 4-44 fällt auf, daß außer dem Insulin-Molekül-Ion bei 5804,7 u und dem Peak bei 11612,5 u, welcher als Dimer von Insulin interpretiert werden kann, keine Peaks bei mehr als einem Ladungszustand auftreten. Alle Peaks, die durch die Entfaltung nur bei einem Ladungszustand auftreten, sind in Bild 4-44 mit einem * gekennzeichnet und können als Geisterpeaks interpretiert werden.

Besser verdeutlicht wird dieser Zusammenhang, wenn die Einzelspektren zweier benachbarter Ladungszustände massenweise miteinander multipliziert werden, so daß ein Produktspektrum

$$P(m, q_1, q_2) = S(m, q_1) * S(m, q_2)$$

aus den entfalteten Einzelspektren $S(m, q)$ bei der Ladung q gebildet wird (Siehe Kapitel 3.6.2). Dieses Produktspektrum enthält nur dort intensive Signale, wo in beiden Einzelspektren $S(m, q)$ ein intensives Signal auftritt. Geisterpeaks, welche nur bei einer Ladung vorkommen, werden auf diese Weise unterdrückt. In Bild 4-45 sind die Produktspektren für Insulin abgebildet. Die Notation $Q=7 \times 6$ neben den Spektren bedeutet, daß das Produktspektrum für den Fall ($q_1 = 7, q_2 = 6$) gebildet wurde. In der Abbildung sind die Fälle $Q=7 \times 6, 6 \times 5, 5 \times 3$ und 4×3 zu sehen

. Diese enthalten nur noch zwei signifikante Peaks: Das Insulin Molekül-Ion bei 5804,7 u und den Dimer bei 11612,5 u. Das Spektrum von ($Q = 7 \times 6$) enthält zwar noch einige andere Peaks, allerdings ist zu beachten, daß dieses Spektrum um den Faktor 10 erhöht wurde.

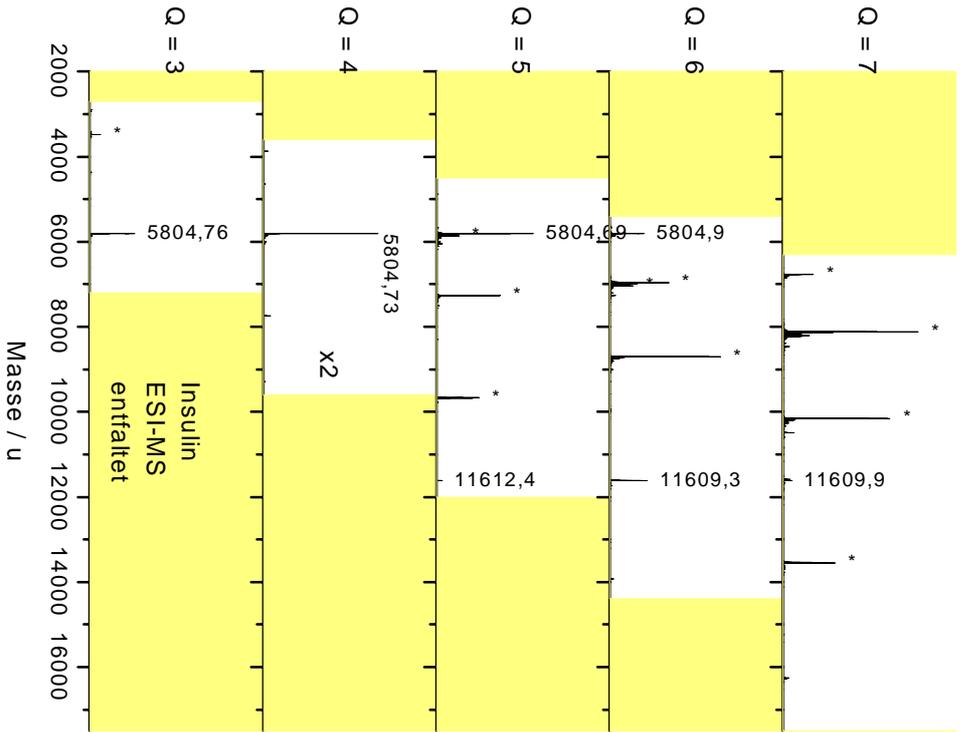


Bild 4-44: ESI-Massenspektrum von Insulin entfalteter mit $q_{max} = 7$. Darstellung der Einzelspektren der Ladungen.

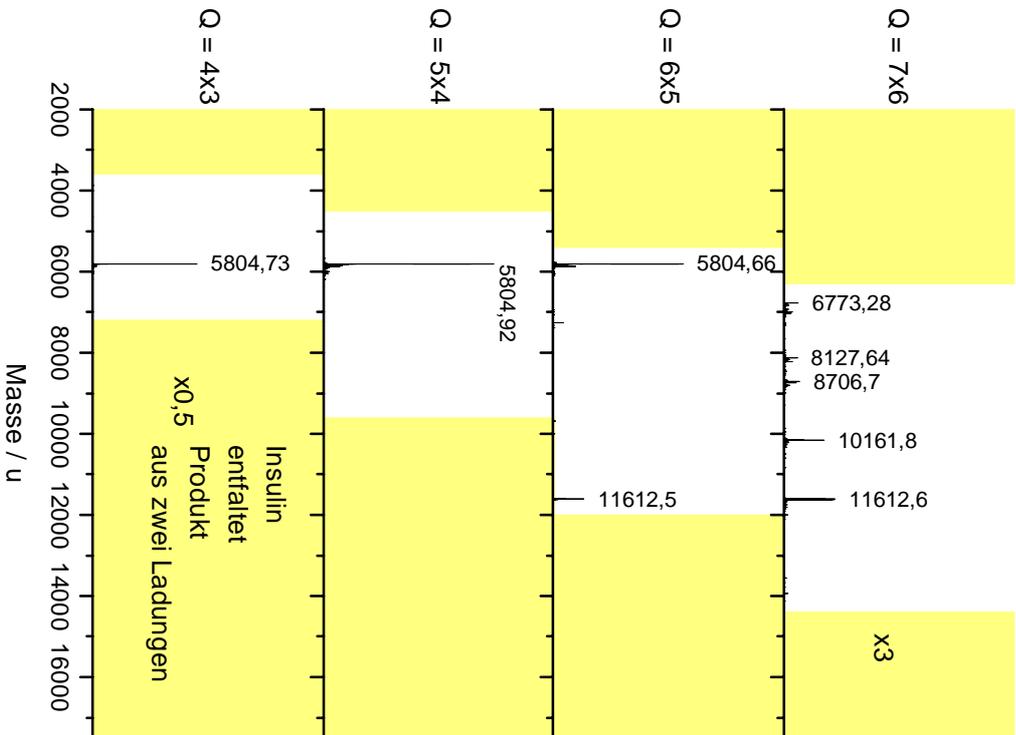


Bild 4-45: Produkt der Einzelspektren der Ladung von Insulin von je zwei benachbarten Ladungszuständen: $Q = 7x6, 6x5, 5x4$ und $4x3$

Bei den Einzelspektren und den Produktspektren fällt auf, daß die Masse des Dimers ungenau wiedergegeben wird (11609,3 u bis 11612,5 u). Die falsche Zuordnung kann durch die zu geringe Anzahl der berücksichtigten Isotopenpeaks erklärt werden. Da das Isotopenmuster des Dimer-Moleküls bereits etwa 15 Isotopenpeaks besitzt, aber nur die ersten 7 berücksichtigt werden, bleibt im Spektrum vor dem zweiten Schritt der Anteil der höheren Isotopenpeaks des Isotopenmusters stehen, der zu Fehlinterpretationen und Massenverschiebungen führt.

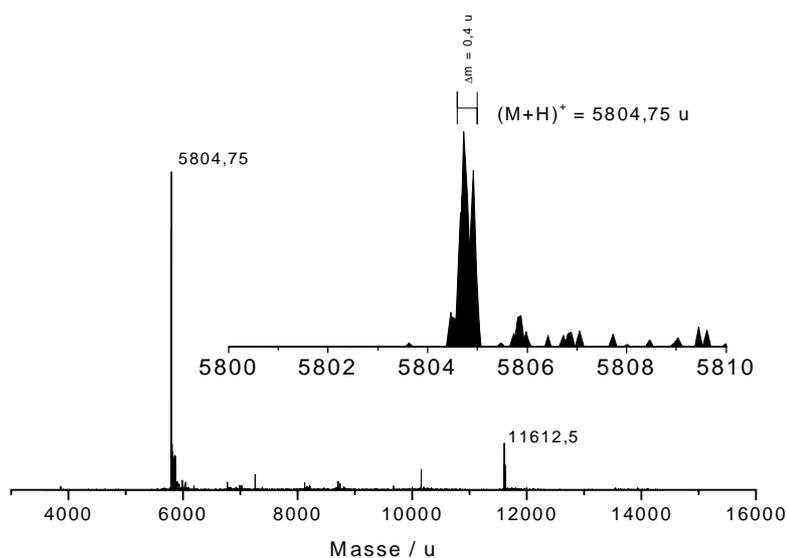


Bild 4-46: Summe der Produktspektren benachbarter Ladungen aus Bild 4-45. Der kleine Ausschnitt zeigt den Bereich des monoisotopischen Peaks von Insulin bei $(M+H)^+ = 5804,7$ u

Die Intensitäten der Peaks im entfalteten Spektrum stellen bei kleineren Massen ein direktes Maß der Intensität dar, sofern die Ladungen aller Datenkanäle korrekt interpretiert wurden. Durch die Berücksichtigung nur einiger Isotopenpeaks, ist die Zuordnung der Intensität bei der Masse von Insulin nicht mehr möglich.

Die Produktspektren aus Bild 4-45 können durch Addition zu einem entfalteten Spektrum zusammengefaßt werden. Das resultierende Spektrum enthält nur noch das Molekül-Ion und das Dimer von Insulin bei den Massen eines einfach geladenen, protonierten Ions. Der monoisotopische Insulin-Peak besitzt eine Halbwerts-Breite von 0,4 u, was eine Auflösung von $m/\Delta m = 14500$ ergibt. In Bild 4-46 ist das summierte Produktspektrum abgebildet.

Die ESI-Auswertesoftware (BioMultiviewTM, Sciex, Toronto Canada) bietet mit der Funktion *Hypermass* eine Methode zur Berechnung der Molekülmasse aus einem ESI-Spektrum mit höher geladenen Ionen. Die Funktion verwendet den in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Algorithmus einer Suche nach verschiedenen Ladungszuständen des selben Molekül-Ions, wobei durch eine einhüllende Kurve (*Envelope*) eine unterschiedliche Gewichtung der Massenbereiche erreicht werden kann. Dadurch wird insbesondere der untere Massenbereich unterdrückt. Diese Funktion wurde auf ein Spektrum von Insulin angewendet und die einhüllende Kurve dabei variiert. Die Massengenauigkeit im Ergebnisspektrum beträgt 1 u. Es traten für alle einhüllenden Gewichtungskurven relativ

viele Geisterpeaks auf. Das Resultat war zum Teil stark abhängig von der gewählten Gewichtungskurve. Das Ergebnis mit der geringsten Anzahl Geisterpeaks ist in Bild 4-47 abgebildet. Jedoch ist der Insulin-Peak in diesem Spektrum nicht der intensivste Peak, sondern der Peak bei 2904 u ist mehr als 6 mal höher als der Peak bei 5807 u. Die Breite des Insulin-Peaks beträgt 3 u, was zu einer Auflösung von etwa $m/\Delta m = 2000$ führt. Das Ergebnis 5807 u liegt höher als die monoisotopische Masse und kann als Schwerpunktmasse interpretiert werden ($M_S = 5807,97$ u), wobei die tatsächliche Massengenauigkeit des Massenspektrometers aber nicht ausgenutzt wird. Das Dimer, das bei der Entfaltung bei einer monoisotopischen Masse von 11612,5 u beobachtet werden konnte, wurde bei diesem Algorithmus nicht nachgewiesen.

Der direkte Vergleich beider Auswertemethoden zeigt deutliche Unterschiede in der Qualität der Ergebnisse. Der *Hypermass* Algorithmus ist relativ leicht anzuwenden, wobei jedoch zu der richtigen Positionierung der einhüllenden Kurve etwas Erfahrung gehört. Die Auswirkungen der Kurvenparameter sind für den Anwender nicht unmittelbar erkennbar. Durch die geringe Massengenauigkeit stellt die Anwendung auf Insulin bereits einen unteren Extremfall dar. Für kleinere Peptide konnte keine erfolgreiche Auswertung vorgenommen werden und das Verfahren ist eher bei Proteinen einsetzbar. Die Entfaltung mit dem ISOCONV-Algorithmus ist dagegen bevorzugt für kleinere Massen optimiert. Die monoisotopische Masse von Insulin wird sehr präzise bestimmt. Die Beschränkung in der Genauigkeit ist hauptsächlich durch die Auflösung des Massenspektrometers und durch die begrenzte Anzahl an Isotopenpeaks gegeben.

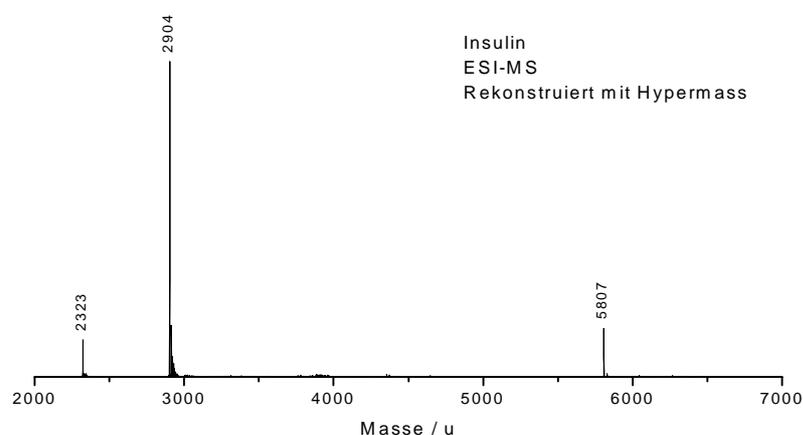


Bild 4-47: ESI-Massenspektrum mit der *Hypermass*-Routine rekonstruiert

4.4.4 Fragment-Ionen-Spektren von Angiotensinogen (1-14)

Neben der Analyse von Übersicht-Spektren bietet sich der ISOCONV-Algorithmus bei ESI-Massenspektrometrie auch für Fragment-Ionen-Spektren an. Eine Schwierigkeit bei der Interpretation von Fragment-Ionen-Spektren höher geladener Molekül-Ionen besteht in der Überlagerung von Fragmenten verschiedener Ladungszustände. Schon aus diesem Grund werden häufig nur Fragment-Ionen-Spektren von zweifach geladenen Molekül-Ionen untersucht. Die hierbei vorwiegend entstehenden einfach geladenen Fragmente

des Molekül-Ions, die im ersten Quadrupol-Filter Q1 stattfindet, muss das gesamte Isotopenmuster enthalten, da sonst keine Ladungsbestimmung erfolgen kann.

Für das Peptid Angiotensinogen (1-14) (porcine) (DRVYIHPFHLVYS-OH, $(M+H)^+ = 1758,93$ u) sind in Bild 4-48 ESI-Fragment-Ionen-Massenspektren des 2-, 3- und 4-fach geladenen Molekül-Ions dargestellt. Die Stoss-Energie Q_0 wurde jeweils so gewählt, daß das Mutter-Molekül-Ion als intensivster Peak im Spektrum verbleibt. Dabei stellt Q_0 die kinetische Energie eines einfach geladenen Ions dar. Bei dem 4-fach geladenen Ion gelang dies nicht, da das Molekül-Ion bereits bei $Q_0 = 30$ eV fast vollständig zerfallen ist, während bei kleineren Stoss-Energien kaum Fragmente entstanden sind. Dies bedeutet, daß eine scharfe Energiegrenze existiert, ab der Fragmentierung stattfindet [119]. Bei den niedrigeren Ladungszuständen liegt die benötigte Stoss-Energie höher. Da die Stoss-Energie bei dem Spektrum des 3-fach geladenen Mutter-Molekül-Ions ebenfalls 30 eV beträgt, ist dieses hier noch nicht vollständig zerfallen.

In allen drei Fragment-Ionen-Spektren treten hauptsächlich b- und a-Ionen auf, was zum Teil durch das Arginin in der Nähe des N-Terminus erklärt werden kann, da dort ein Ladungsträger lokalisiert ist.

Bei dem 2-fach geladenen Ion treten neben einer fast vollständigen b-Serie von b_4 bis b_{14} und den dazu gehörigen a-Ionen nur das y_5 , y_8 und y_{13} -Ion aus der y-Serie auf. Das y_5 -Ion entsteht gemeinsam mit dem b_6 -Ion durch einen Bruch der Peptid-Bindung vor dem Prolin (Pro^7). Das y_{13} -Ion entsteht durch den Verlust der Asparaginsäure am N-Terminus, so daß das Fragment das Arginin noch enthält.

Insgesamt zeigt sich, daß auch von entfaltetten Spektren höher geladener Ionen noch eine Bestimmung der Sequenz möglich ist.

4.4.5 Fragment-Ionen-Spektren von Melittin

An dem Peptid Melittin (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂; $(M+H)^+ = 2845,7$ u) wurde die Ladungsabhängigkeit des Fragment-Ionen-Spektrums genauer untersucht, da hierbei vor allem höher geladene Mutter-Ionen entstehen (Bild 4-40). Die Stoßenergie wurde für jedes Molekül-Ion so gewählt, daß der Großteil der Ionen fragmentiert.

Bei dem Vergleich der Fragment-Ionen-Spektren der 3-fach und der 4-fach geladenen Melittin Moleküle fallen die deutlich unterschiedlichen Fragmentierungs-Muster auf (Bild 4-49). Eine ähnliche Abhängigkeit der Fragmentierung von der Ladung wurde bereits von Jockusch et. al. für Ubiquitin-Ionen beschrieben [120].

Bei Melittin gibt es in beiden Fällen eine dominante Serie C-terminaler y-Fragment-Ionen, welche allerdings erst bei dem y_6 , bzw. y_9 , beginnen, danach aber fast vollständig bis zum y_{25} fortgesetzt werden. Darüber hinaus treten einige kürzere b-Fragment-Ionen auf (b_2 bis b_{13}). Beim 3-fach geladenen Molekül-Ion werden zusätzlich noch einige a-Ionen beobachtet.

Die Ladungszustände der einzelnen Fragment-Ionen sind in Bild 4-50 getrennt dargestellt. Die großen Fragment-Ionen tragen erwartungsgemäß eine hohe Ladung, während jene mit kleinerer Masse eine geringe Ladung tragen. Das 3-fach geladene Molekül-Ion

fragmentiert hauptsächlich in 2-fach geladene Fragmente – die anderen Ladungszustände sind überhöht dargestellt. Nur die Fragmente y_{21} bis y_{24} treten sowohl als 2-fach, als auch als 3-fach geladene Ionen auf. Des Weiteren fällt auf, daß die komplementären b-Ionen zu den 2-fach geladenen y-Ionen alle 1-fach geladen sind. Dies läßt sich aus der Ladungserhaltung verstehen. Demnach fragmentiert das dreifach geladene Mutter-Ion entweder, indem es in ein 3-fach geladenes Fragment-Ion und einen neutralen Rest, oder in ein 2-fach und ein 1-fach geladenes Fragment-Ion zerfällt.

Das 4-fach geladene Molekül-Ion bildet hauptsächlich 2-fach geladene Fragment-Ionen. Die Intensität der höher geladenen Ionen ist 30-fach geringer und auch die 1-fach geladenen Fragment-Ionen sind etwa 8 mal seltener. Folglich zerfällt das Mutter-Ion bevorzugt in zwei 2-fach geladene Fragmente. In diesem Spektrum sticht das y_{13} Ion deutlich hervor. Dieser Bruch vor dem Prolin ist fast 10 mal intensiver, als zweit intensivste Fragment-Ion im Spektrum. Ansonsten ist zu beobachten, daß die kleineren b-Ionen wiederum 1-fach geladen, während die y-Ionen 2-fach geladen sind. Insbesondere läßt sich dies bei dem Vergleich von y_9 (1228,74 u) und b_{13} (1223,77 u) erkennen.

Es gibt auf dem Peptid mehrere Orte an denen die Ladungen lokalisiert sein können. Befinden sich alle Ladungen in der Nähe des C-Terminus, treten bevorzugt y-Ionen auf. Nur wenn eine Ladung in der Nähe des N-Terminus lokalisiert ist, kann ein b-Ion nachgewiesen werden. Typische Ladungsträger sind Arginin und Lysin, wegen ihrer hohen Protonenaffinität. Diese treten bei Melittin verstärkt am C-Terminus auf (Pos. 21-24), ein weiteres Lysin befindet sich an Pos. 7.

Die Ergebnisse von Bild 4-50 zeigen, daß bei Fragment-Ionen-Spektren die Einzelspektren durch Addition zusammengefügt werden müssen. Würden die Einzelspektren, wie bei Insulin (Bild 4-46) miteinander multipliziert, wären zahlreiche Peaks aus dem Gesamtspektrum verschwunden, da Fragment-Ionen, anders als stabile Ionen, häufig nur bei einer einzigen Ladung auftreten, welche durch die Ladung des Mutter-Molekül-Ions beeinflusst wird.

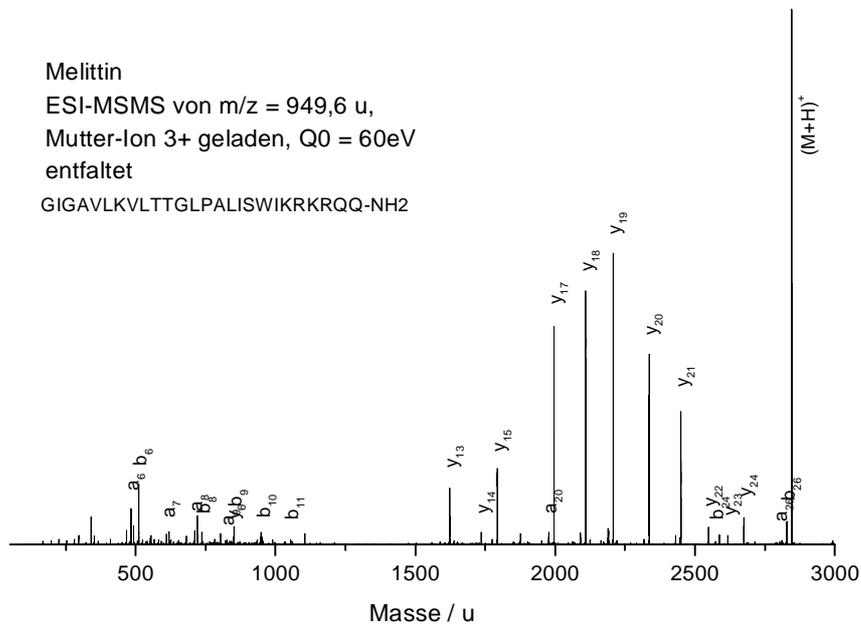
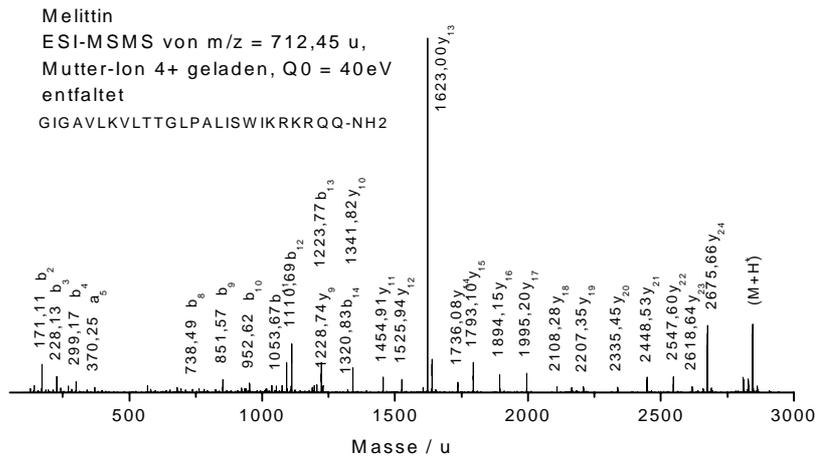


Bild 4-49: Entfaltete ESI-Fragment-Ionen-Spektren von Melittin. (a) 4-fach geladenes Mutter-Ion, (b) 3-fach geladenes Mutter-Ion

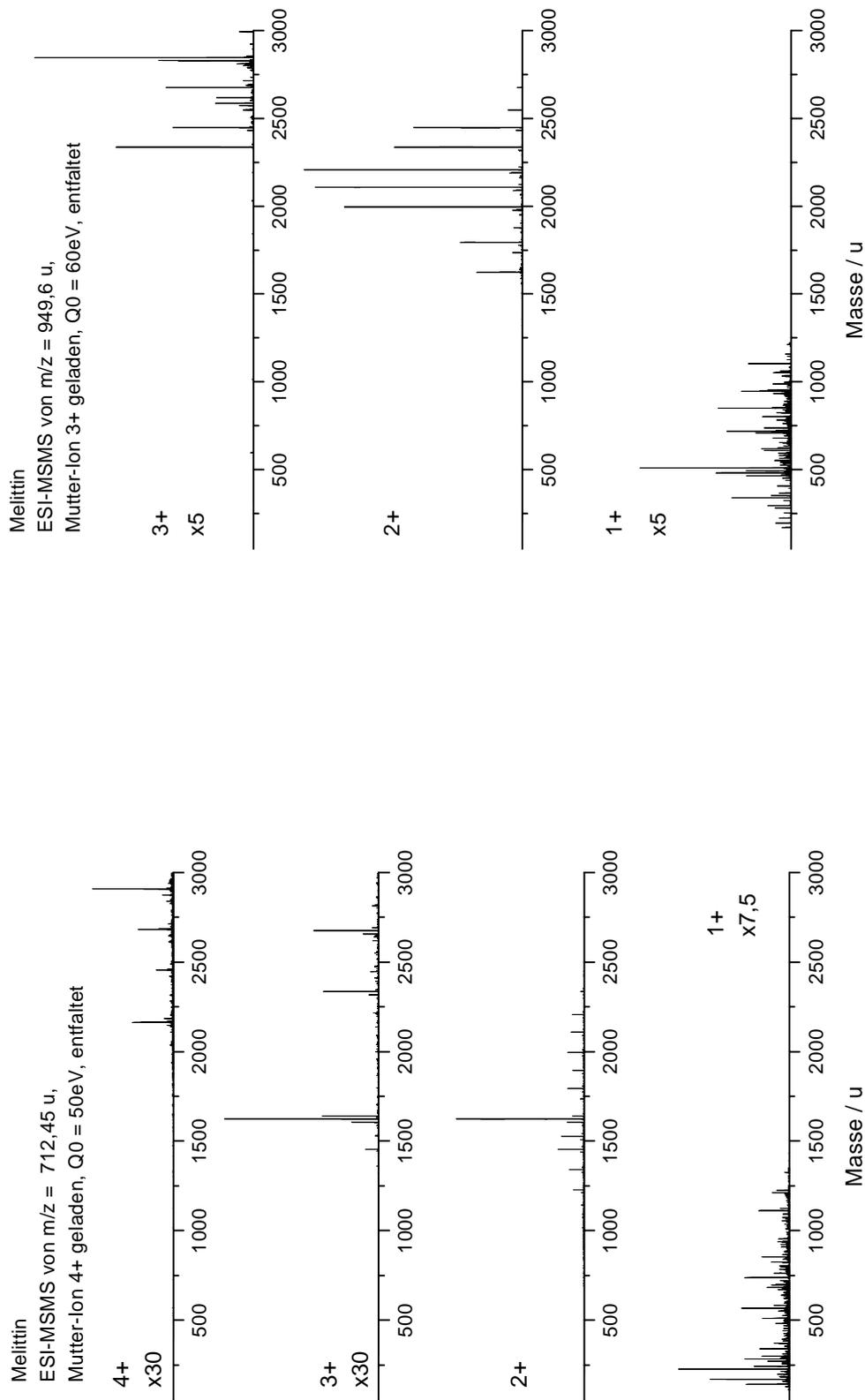


Bild 4-50: Einzelspektren der Ladungen der ESI-Fragment-Ionen-Spektren der 3-fach und 4-fach geladenen Mutter-Ionen von Melittin

4.4.6 Mischung aus Peptiden mit C-terminalen Amid- und Hydroxyl-Gruppen

Die Leistungsfähigkeit der Filterung soll an einer Peptid-Mischung demonstriert werden. Dazu wurden zwei Peptide gleicher Grundsequenz, als Amid und als Säure jeweils separat und anschließend als Mischung im ESI-Massenspektrometer untersucht und mit dem ISOCONV-Algorithmus entfaltet.

Die in diesen Messungen verwendeten Peptide sind in Tabelle 4-23 aufgelistet. Sie wurden jeweils einzeln und in einer Mischung analysiert. Es handelt sich hierbei um synthetisierte Peptide, die einer Studie über die Phosphorylierung von Tyrosin entstammen [121]. Das Ursprüngliche Sequenzmotiv stammt vom RRSRC-Protein (Tyrosin Kinase pp60src; *rous sarcoma virus encoded transforming protein*).

Tabelle 4-23: Liste der Peptide, die als Mischung untersucht wurden

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Molekülmasse / u</i>
A1-Amid	RRLIEDAEYAARG-NH ₂	1518,81
A1-Säure	RRLIEDAEYAARG-OH	1519,81
A9-Amid	RRLIEGAEYAARG-NH ₂	1460,80
A9-Säure	RRLIEGAEYAARG-OH	1461,80

4.4.6.1 A1-Peptide

Die ESI-Massenspektren der zwei A1-Peptide sind in Bild 4-51 abgebildet. Wie erwartet, ähneln sich beide Spektren sehr stark. Neben den 2-fach und 3-fach geladenen Molekül-Ionen der Peptide tritt in beiden Spektren bei 681,867 u (bzw. 682,364 u bei der Säure) noch ein intensiver 3-fach geladener Peak auf. Außerdem gibt es einige kleinere Peaks zwischen 300 u und 500 u. Der 3-fach geladene Peak läßt sich als Verlust eines N-terminalen Arginin verstehen. Da die entsprechende Masse eines einfach geladenen Peptids auch in MALDI-Massenspektren der Peptide auftritt, kann angenommen werden, daß diese Peptide ein Nebenprodukt in der Stammlösung darstellen und nicht erst im Massenspektrometer abgespalten werden.

Die Entfaltung mit ISOCONV wurde mit gleichbleibenden Standardparametern durchgeführt. Die maximale Ladung ist auf $q_{\text{Max}} = 4$ gesetzt worden, der Schwankungsbereich wächst mit der Nummer des Isotopenpeaks (I) und beträgt 20 % + 20 % (I-2). Die gemittelten Muster werden aus den interpolierten Polynomen zufällig ausgewählter Peptide bestimmt. Für das Zusammensetzen der Einzelspektren der Ladungen wurde eine Schrittweite von 0,05 u gewählt.

In Bild 4-52(a) ist das entfaltete ESI-Massenspektrum des A1-Amids abgebildet. Neben dem Molekül-Ion bei $(M+H)^+ = 1518,80$ u läßt sich, der Verlust eines Arginin bei 1362,75 u (-156,05 u) beobachten. In Bild 4-53(a) ist dagegen das entfaltete ESI-Massenspektrum der A1-Säure abgebildet. Hier liegt das Molekül-Ion bei $(M+H)^+ = 1519,75$ u und es wird ebenfalls ein Arginin-Verlust am N-terminalen Ende bei 1363,65 u beobachtet. In beiden Spektren treten die Massen 445,1 u und 983,55 u als weitere höchste Peaks auf. Die Masse 983,55 u läßt sich als b₈-Ion (RRLIEDAE) und die

Masse 445,10 u als internes Fragment B_4Y_5 -Ion (EDA E) erklären. Die Massen beider Fragmente sind sowohl beim Amid, als auch bei der Säure identisch, da sie nicht das C-terminale Ende des Peptids enthalten.

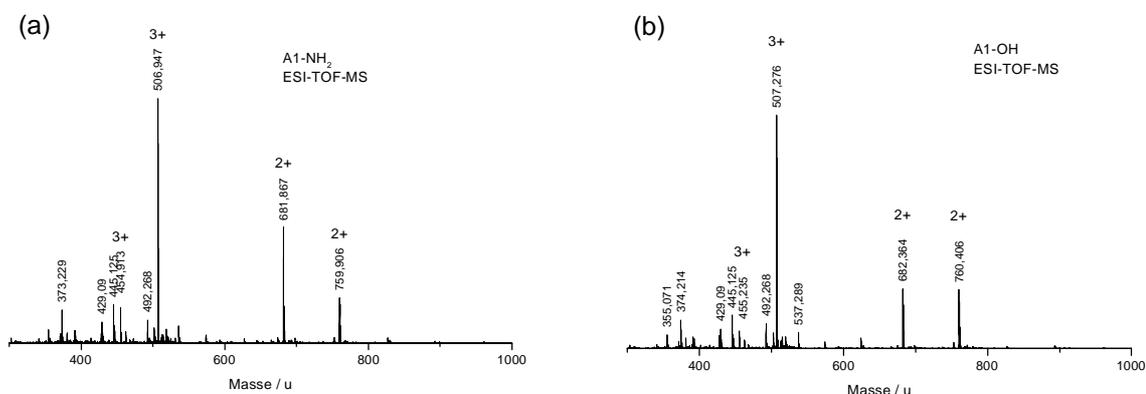


Bild 4-51: ESI-Massenspektren vom (a) amidierten Peptid RRLIEDAEYAARG-NH₂ und (b) hydroxylierten Peptid RRLIEDAEYAARG-OH

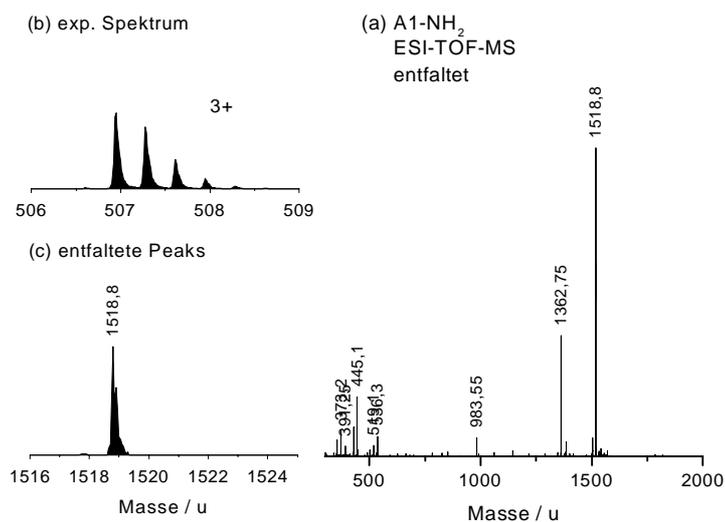


Bild 4-52: Entfaltung eines ESI-Spektrums des amidierten Peptids (A1-NH₂). (a) Überblick-Spektrum, (b) Ausschnitt des 3-fach geladenen Molekül-Ions im Original Spektrum und (c) Ausschnitt des Molekül-Ions im entfalteten Spektrum.

Der Ausschnitt des entfalteten Molekül-Ions des A1-Amids ist in Bild 4-52(c) zu sehen. Zum Vergleich ist darüber hinaus in Bild 4-52(b) ein gleicher Ausschnitt des experimentellen Spektrums in der Region des 3-fach geladenen Molekül-Ions ($m/z = 506,947$ u) abgebildet. Zunächst erkennt man hier wiederum, daß im entfalteten Spektrum ein einzelner Peak bei der monoisotopischen Masse des Peptids auftritt. Die Auflösung des Peaks ist unverändert zu der Auflösung des experimentell gemessenen monoisotopischen Peaks, allerdings ist die absolute Intensität und damit das Signal/Rausch-Verhältnis besser geworden.

Die gleichen Darstellungen wie für das Amid sind für die A1-Säure in Bild 4-53(b) und (c) zu sehen. Auch hier kann nach der Entfaltung ein einzelner Peak bei der monoisotopischen Masse des Peptids beobachtet werden. Das schwache Signal bei 1518,8 u vor dem

monoisotopischen Peak von A1-OH ist sowohl im experimentellen Spektrum als auch im entfalteten Spektrum zu sehen (Bild 4-53(b) und (c)) und stammt vermutlich vom A1-Amid, welches zu einem geringen Anteil als Verunreinigung in der Probe vorkommt.

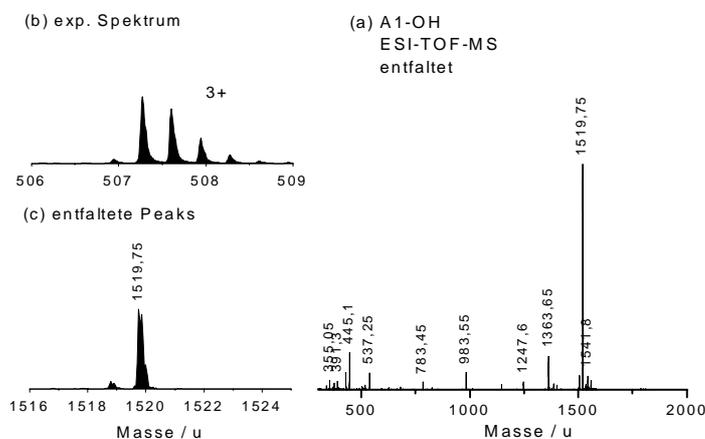


Bild 4-53: Entfaltung eines ESI-Spektrums des hydroxylierten Peptids (A1-OH). (a) Überblick-Spektrum, (b) Ausschnitt des 3-fach geladenen Molekül-Ions im Originalspektrum und (c) Ausschnitt des Molekül-Ions im entfalteten Spektrum.

In Bild 4-54 ist das entfaltete ESI-Massenspektrum einer Mischung mit unbekanntem Verhältnis aus dem Amid und der Säure abgebildet. In dem Gesamtspektrum können alle Peaks beobachtet werden, die in den Einzelspektren Bild 4-52(a) und Bild 4-53(a) separat auftauchen. Der Bereich des Molekül-Ions ist für die 3-fach geladenen Ionen aus dem experimentellen Spektrum in Bild 4-54(b) und für das entfaltete Spektrum in Bild 4-54(c) zu sehen. Das experimentelle Spektrum zeigt zwar eine Verschiebung der Intensität des zweiten Isotopenpeaks, daraus läßt sich aber noch nicht direkt die Zusammensetzung der Peak-Gruppe ablesen. Im entfalteten Spektrum lassen sich zwei Peaks mit unterschiedlichen Intensitäten erkennen. Die relative Intensität des A1-OH beträgt etwa 16 % der Intensität des A1-Amid.

Da alle Messungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, liegt der Schluß nahe, daß das Intensitätsverhältnis der entfalteten Molekül-Ionen die Konzentrationsverhältnisse in der Lösung wiedergibt. Jedoch läßt sich aus diesen Messungen nicht folgern, daß das Amid in 5-fachem Überschuss vorliegt, da die Ionisierbarkeiten der zwei Peptide durch verschiedene Protonenaffinitäten unterschiedlich sind. Ein weiterer Punkt, der diese These unterstützt, ist der, daß sich die Peaks der Arginin-Verluste bei 1362,7 u und 1363,7 u nicht im gleichen Verhältnis reduzieren (Bild 4-55 und Tabelle 4-24). In der letzten Spalte in Tabelle 4-24 sind die Intensitäten eingetragen, die erwartet werden, falls das Verhältnis aus Arginin-Verlust und Molekül-Ion konstant bleiben würde. Man erkennt hier deutlich eine starke Abnahme vom erwarteten Wert bei der Intensität des Arginin-Verlustes des Amids (Faktor 10) und eine Zunahme der Intensität des Arginin-Verlustes der Säure (Faktor 3).

Diese Verschiebung kann dadurch erklärt werden, daß die vier verschiedenen Peptide (A1-OH, A1-NH₂, (A1-Arg)-OH und (A1-Arg)-NH₂) trotz der weitestgehend identischen

Sequenz verschiedene Protonenaffinitäten besitzen und damit unterschiedlich intensiv als Ionen nachgewiesen werden können.

Die Genauigkeit, mit der das Intensitätsverhältnis zweier benachbarter Peptide bestimmt werden kann, wird durch die zulässige Schwankung der Isotopenmuster beschränkt (20 % + 20 % (I-2) für die A1-Peptide). Allerdings ist der relative Fehler in der Intensitätsbestimmung eines Peak-Musters kleiner als die relativen Fehler der Schwankungen, da der Anteil der hohen Isotopenpeaks wesentlich stärker abnimmt, als der Fehler zunimmt. Bei der nominalen Masse 1362 u ergibt sich mit den oben angegebenen Schwankungen ein relativer Fehler von 18,6 %. Die Genauigkeit wird erhöht, wenn als Referenz eine reine Probe vorliegt, da die Schwankungen in diesem Fall so weit minimiert werden können, daß die reine Probe noch gut entfaltet wird.

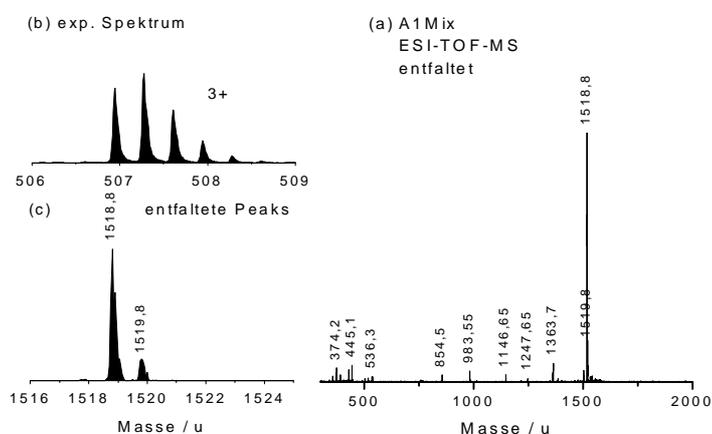


Bild 4-54: Entfaltung eines ESI-Spektrums einer Mischung aus amidierten Peptid (A1-NH₂) und hydroxylierten Peptid (A1-OH). (a) Überblick-Spektrum, (b) Ausschnitt des 3-fach geladenen Molekül-Ions im Originalspektrum und (c) Ausschnitt des Molekül-Ions im entfaltetem Spektrum.

Tabelle 4-24: Intensitäten der Molekül-Ionen und der Arginin-Verluste bei A1-Amid und A1-OH in den Einzelmessungen und in der Mischung in der letzten Spalte stehen die in der Mischung erwarteten Intensitäten der Arginin-Verluste. In Klammern in der zweiten Spalte stehen die Prozentanteile am zugehörigen Mutter-Ion

Peak	Intensität einzeln	Intensität Mischung	Intensität Erwartet
(M+H) ⁺ Amid	69939 (100 %)	103489	
(M-Arg+H) ⁺ -Amid	27324 (39,1 %)	3797	40464
(M+H) ⁺ OH	60460 (100 %)	17143	
(M-Arg+H) ⁺ -OH	8961 (14,8 %)	7513	2537

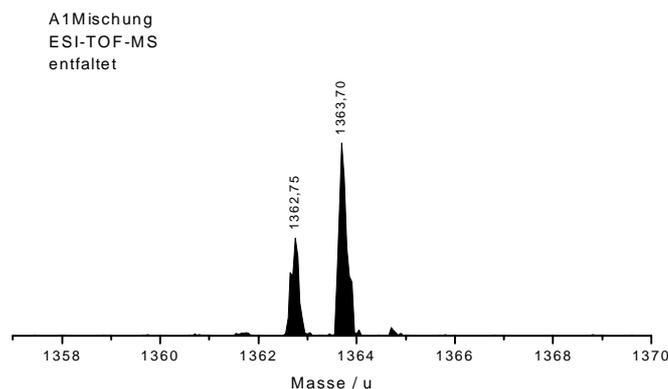


Bild 4-55: Ausschnitt der Arginin-Verluste aus der Mischung von A1-Amid und A1-Säure

4.4.6.2 Variation des Mischungsverhältnisses (A9-Peptide)

Die systematische Variation des Mischungsverhältnisses von Amid und Säure ist für das A9-Peptid (RRLIEGAEYAARG, $(M+H)^+ = 1460,81$ u bzw. $1461,81$ u) in Bild 4-56 dargestellt. In den einzelnen Ausschnitten sind die entfalteten Spektren zu sehen, bei denen der Anteil des A9-Amids von oben nach unten abnimmt. Die Parameter für ISOCONV sind $10\% + 10\%$ (I-2) für die Schwankung und gleitender Untergrundabzug über ± 200 Datenkanäle.

Die Messungen wurden mit einer Nanospray-Ionenquelle durchgeführt, um Querempfindlichkeiten zu vermeiden. Da bei dieser Quelle zu jeder Messung eine andere Glaskapillare verwendet werden muss, können keine Rückstände der anderen Mischungsverhältnisse das Ergebnis verfälschen. Experimente mit einer Ionenspray-Quelle, bei der die Proben durch die selbe Kapillare mit einer Spritze injiziert werden, zeigten auch nach längerem Spülen mit Lösungsmittel (50% Methanol/Wasser) noch Rückstände der Peptide, so daß die Ergebnisse einer Verdünnungsreihe dadurch verfälscht würden.

Zur Präparation wurden $10\ \mu\text{l}$ der vorbereiteten Peptid-Mischung mit $10\ \mu\text{l}$ Methanol und $10\ \mu\text{l}$ 10% Ameisensäure gemischt. Von dieser Mischung wurde $1\ \mu\text{l}$ mit einer Gel-Loader Pipette in eine Nanospray-Nadel injiziert.

Die Konzentration der Proben wurde zunächst grob durch Einwaage eingestellt und anschließend durch eine Aminosäureanalyse bei der Firma Protagen [122] genauer bestimmt. Die dort ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 4-25 aufgelistet, wobei für jede Probe je zwei Analysen durchgeführt wurden. In der letzten Spalte ist die, aus dem Mittelwert berechnete, molare Konzentration angegeben.

Tabelle 4-25: Ergebnisse der Aminosäureanalyse der Firma Protagen

<i>Probe</i>	<i>Analyse Nr. 1</i>	<i>Analyse Nr. 2</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Konzentration</i>
A9-Amid	0,62 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,64 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,63 \pm 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	431 \pm 7 pmol/ μl
A9-Säure	0,38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,42 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,40 \pm 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	273 \pm 14 pmol/ μl

Die Peptide wurden in 7 verschiedenen Mischungsverhältnissen analysiert, indem je zwei Verdünnungen von jedem Peptid in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurden. In Tabelle 4-26 sind in der ersten Spalte die Mischungsverhältnisse unter der Annahme

eingetragen, daß beide Stammlösungen die selbe Konzentration besitzen. In der letzten Spalte von Tabelle 4-26 sind die aus der Aminosäureanalyse ermittelten Konzentrationen verwendet worden, um das Konzentrationsverhältnis Säure/Amid anzugeben. In den zwei mittleren Spalten sind die Probenmengen (in pmol/ μ l) für die Einzelproben angegeben.

Tabelle 4-26: Mischungsverhältnisse und Substanzmengen der Verdünnungsreihe von A9

<i>Verhältnis OH:NH₂ (geschätzt)</i>	<i>Amid pmol/μl</i>	<i>Säure pmol/μl</i>	<i>Verhältnis OH:NH₂ exakt</i>
0	143,7	0,0	0,0
0,1	71,8	4,6	0,1
1	71,8	45,5	0,6
2,5	11,5	18,2	1,6
5	9,6	30,3	3,2
10	7,2	45,5	6,3
∞	0,0	91,0	∞

Da sich beide Peptide nur durch die C-terminale Gruppe voneinander unterscheiden, liegt zunächst die Annahme nahe, daß die Signalintensitäten bei identischer Konzentration gleich hoch sind. Sättigungseffekte sind bei den verwendeten Konzentrationen nicht zu erwarten. In diesem Fall müßte das Verhältnis der Intensitäten von Amid und Säure sich zwischen der 3. und 4. Probe umkehren.

Die Ergebnisse in Bild 4-56 zeigen allerdings, daß die oben beschriebenen Voraussetzungen nicht erfüllt sind. Es ist eine deutliche Zunahme der Intensität der Säure von oben nach unten (ansteigender OH – Anteil) zu sehen. Bei dem Mischungsverhältnis 1,6 (OH:NH₂) ist der Unterschied der Intensitäten beider Peptide am geringsten. Die gleichen Signalintensitäten sind bei einem Konzentrationsverhältnis zwischen 1,6 und 3,2 zu erwarten. Durch die Ungenauigkeiten der Konzentrationen (<10 %) kann diese Verschiebung nicht entstehen. Daher muss die Amino-Gruppe dafür sorgen, daß das Peptid unter gleichen Umgebungsbedingungen besser ionisiert wird, als das Peptid mit der Säuregruppe.

Die Variation der Signalintensitäten kann bei den ESI-Massenspektren über eine Poisson-Verteilung angenähert werden, da Einzelereignisse detektiert werden. Die Standardabweichung ist dabei \sqrt{N} , wobei N die Anzahl der Starterereignisse ist. Der relative Fehler ist $1/\sqrt{N}$ und liegt bei den Peaks bei etwa 0,1 % und kann somit vernachlässigt werden. Die Intensitätsverhältnisse der Peaks können folglich als nahezu konstant angesehen werden. Zur Abschätzung von N wird eine Mess-Frequenz von 7 kHz, und eine Mess-Dauer von 120 s mit dem Flugzeit-Massenspektrometer angenommen.

Ein weiterer Beleg für die Reproduzierbarkeit der Intensitätsverhältnisse ist eine parallele Messreihe der Mischungen mit MALDI-Massenspektrometrie. Die durch die Entfaltung bestimmten Intensitätsverhältnisse zwischen Amid und Säure sind von diesen Messungen in Bild 4-57, im Vergleich zu den ESI-Messungen, dargestellt. Der letzte Meßwert (nur

Säure, kein Amid) fehlt in dieser Abbildung, da sowohl das theoretische Konzentrationsverhältnis, als auch das Intensitätsverhältnis, hier unendlich wären. Die Intensität des Säuresignals steigt linear zum relativen Anteil an, obwohl die absoluten Probenmengen von Messung zu Messung variieren.

In Bild 4-57 sind zusätzlich Ausgleichsgeraden zu beiden Messreihen aufgetragen. Die Geraden-Gleichungen hierfür sind:

$$\text{Rel. Int} = 0,00986 + 0,47771 * (\text{OH}:\text{NH}_2)$$

für die ESI-MS Messungen und

$$\text{Rel. Int} = 0,09245 + 0,56234 * (\text{OH}:\text{NH}_2)$$

für die MALDI-MS Messungen.

Aus diesen Gleichungen läßt sich das Konzentrationsverhältnis bestimmen, bei dem die relativen Intensitäten 1 ergeben. Für die MALDI-MS Messungen ergibt sich $(\text{OH}:\text{NH}_2) = 1,61$ und für die ESI-MS Messungen $(\text{OH}:\text{NH}_2) = 2,07$. Demnach müssen doppelt so viele A9-Säure-Moleküle in der Probe vorliegen, um die gleiche Anzahl an A9-Säure-Ionen zu bilden, wie A9-Amid-Ionen gebildet werden.

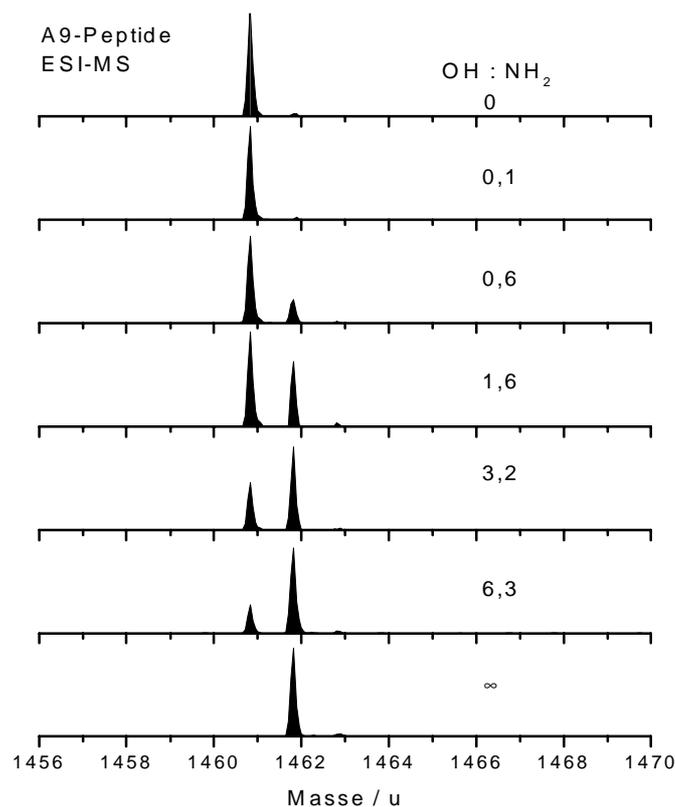


Bild 4-56: Variation des Mischungsverhältnisses von A9-Amid und A9-Säure im ESI-MS gemessen. Der Anteil des Amids nimmt von oben nach unten ab

Die unterschiedliche Ionisierbarkeit läßt sich in den Spektren der reinen Peptide nicht an den Intensitäten erkennen. In den reinen Proben sind die Signalintensitäten sowohl vom Amid als auch von der Säure vergleichbar. Erst bei der Mischung treten die Säure und Amid-Moleküle in einen gegenseitigen Wettbewerb.

Die Bildung von Ionen wird maßgeblich von der Anzahl der in der Probenlösung verfügbaren Protonen, welche durch den pH-Wert bestimmt wird, beeinflusst. Ein Maß für die Protonenaffinität eines Moleküls ist die Bruttoladung, die mit dem pH-Wert variiert. Tabelle 4-27 zeigt die Bruttoladungen der A9-Peptide. Wie zu erwarten, ist die Bruttoladung bei dem Amid durch die zusätzliche Protonen bindende Gruppe am C-Terminus größer als bei der Säure. Eine höhere Bruttoladung bedeutet, bei gleichbleibendem Angebot an Protonen durch die Umgebung, eine höhere Wahrscheinlichkeit Protonen zu binden und somit als Ion nachgewiesen zu werden. Bei gleicher Konzentration der zwei Peptide gibt das Verhältnis der Bruttoladungen das Intensitätsverhältnis wieder. Umgekehrt kann auch aus dem Intensitätsverhältnis der Peptide auf das Verhältnis der Bruttoladungen und damit den pH-Wert geschlossen werden. Diese Vorgehensweise ist analog zur kinetischen Methode, mit der die Protonenaffinitäten oder Gasphasen-Basizitäten von Molekülen durch Vergleich mit bekannten Substanzen bestimmt werden [32][94].

Tabelle 4-27: Bruttoladung der Peptide A9-OH und A9-NH₂ als Funktion des pH-Wertes. In der letzten Zeile ist das Verhältnis der Bruttoladungen angegeben.

Peptid	1	3	5	7	9	11	13
A9-OH	+3,96	+3,07	+1,30	+0,99	+0,47	-0,98	-3,30
A9-NH ₂	+5,00	+4,89	+3,30	+2,99	+2,02	+0,03	-2,30
Verhältnis NH ₂ /OH	1,26	1,59	2,54	3,02	4,29		

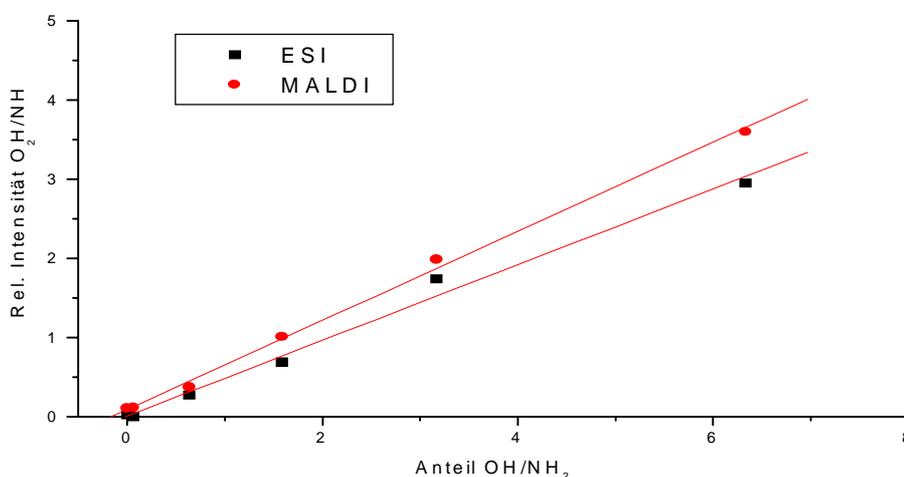


Bild 4-57: Relative Intensitäten von Säure zu Amid des A9-Peptids im MALDI-MS (Kreise) und im ESI-MS (Quadrate). Die Geraden sind Ausgleichsgeraden.

Die unterschiedlichen Verhältnisse bei der MALDI- und der ESI-Messung können durch unterschiedliche pH-Werte der Proben erklärt werden. Demnach war die MALDI-Probe, bei der als Matrix DHB verwendet wurde, saurer als die ESI-Probe. Der pH-Wert der MALDI-Probe liegt bei etwa 3, bei der ESI-Messung wird ein pH-Wert von etwa 4 erreicht.

4.5 Vorläuferionen-Spektren bei MALDI

4.5.1 Prinzip

Bei einem *Parent-Ion-Scan* oder *Precursor-Ion-Scan* wird in einem ersten Massenanalysator die Masse des Vorläufer- oder Mutter-Ions variiert und in einem zweiten Massenanalysator gleichzeitig eine Fragment-Ionen-Masse fest eingestellt und gemessen. Zwischen beiden Analysatoren findet eine Fragmentierung der Moleküle statt. Auf diese Weise läßt sich herausfinden, welche Mutter-Ionen die eingestellten Fragment-Ionen erzeugen können. Ein solches Meßverfahren bietet sich insbesondere für scannende Massenanalysatoren an, wie beispielsweise Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, bei denen, in diesem Modus, der erste Quadrupol-Analysator scannt und der Dritte auf eine feste Masse eingestellt wird, während die Fragmentierung durch ein Stoss-Gas in dem zweiten Quadrupol-Filter induziert wird.

Es soll hier gezeigt werden, daß ein solcher Meßmodus auch mit einem MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer möglich und sinnvoll ist.

4.5.2 Tandem-Modus im Reflektor-TOF-Massenspektrometer

Bei einem Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer erfolgt die Analyse der Masse von stabilen Ionen über die Gesamtflugzeit bis zum Detektor über eine Flugzeit-Kalibrierung nach der Gleichung

$$t - t_0 = L / v_{\text{Ion}} \quad , \text{ mit der Geschwindigkeit } v_{\text{Ion}} = \sqrt{2eU \frac{z}{m}} ,$$

das heißt, über eine proportionale Beziehung zwischen Wurzel der Masse m und Flugzeit $t - t_0$ (weil $v_{\text{Ion}} \sim \sqrt{1/m}$ ist). Hierbei ist L die Länge der Driftstrecke bis zum Detektor und U das Beschleunigungspotential der Ionen, welche die Masse m und Ladung z besitzen. Die Ionen werden in der Quelle auf die Geschwindigkeit v_{Ion} beschleunigt, wobei bei dieser Betrachtung zur Vereinfachung die Aufenthaltsdauer des Ions in der Ionenquelle durch die konstante Zeit t_0 abgedeckt wird. Die Gesamtflugzeit hängt nur von der erreichten (massenabhängigen) Geschwindigkeit und der Entfernung von der Quelle ab.

Wird ein Ion-Gate (Kapitel 2.2.5) eingefügt, durch das alle Ionen außerhalb eines kurzen Zeitfensters durch ein elektrisches Feld ablenkt werden, so erfolgt allein über den Pulszeitpunkt T_{Delay} des Ion-Gate, welches sich im Abstand L_{IG} von der Quelle befindet, eine Massenanalyse nach $T_{\text{Delay}} - t_0 = L_{\text{IG}} / v_{\text{Ion}}$. Bei der PSD-Analyse wird auf diese Weise eine Mutter-Ionen-Masse selektiert. Da das Ion-Gate im offenen Zustand nicht massenselektiv ist, und alle Ionen, die im eingestellten Zeit-Interval durch das Gate gelangen, nachgewiesen werden, können so auch Fragment-Ionen des gewählten Mutter-Ions nachgewiesen werden, die auf der Strecke zwischen Ionenquelle und Ion-Gate entstanden sind. Fragment-Ionen haben, wegen ihrer gleichen Geschwindigkeiten, im Reflektor unterschiedliche Durchlaufzeiten, so daß hier schließlich die Massenanalyse der Fragment-Ionen erfolgt.

Nach dieser Sichtweise ist das Ion-Gate bei einem MALDI-Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer der erste Massenanalysator, und der Reflektor mit der Trennung der

Fragment-Ionen stellt den zweiten Analysator dar. Für die Bestimmung der Fragment-Ionen-Massen reicht es bei dieser Anordnung nicht aus, nur die Detektionszeit des Fragment-Ions zu kennen, sondern es muss auch die Masse des Mutter-Ions aus der Massen-Kalibrierung des Ion-Gate berücksichtigt werden. Die Massen-Kalibrierung des Ion-Gate wird über die Flugzeit der stabilen Ionen bis zum Detektor bestimmt (Kapitel 4.5.4).

4.5.3 Anwendungsmöglichkeiten

Ein *Parent-Ionen-Scan* ist damit in Analogie zu dem oben beschriebenen Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ein schrittweises Durchfahren der Delay-Zeit des Ion-Gate, bei dem die Signalintensität eines ausgewählten Fragment-Ions aufgezeichnet wird. Im Gegensatz zum Quadrupol-Filter, bei dem immer nur eine Masse selektiert werden kann, wird bei einem Reflektor zu jeder gewählten Mutter-Ionen-Masse ein größerer Massenbereich der Fragment-Ionen aufgezeichnet, der durch den Reflektor fokussiert wird. Beispielsweise wird bei dem obersten PSD-Massen-Fenster ein Bereich von etwa 25% der Mutter-Ionen-Masse gut aufgelöst, das heißt bei $(M+H)^+ = 1000$ u wird das Intervall von 750 u bis 1000 u aufgelöst gemessen. Aus diesen „Rohdaten“ kann anschließend ein Mutter-Ionen-Spektrum eines beliebigen aufgelösten Fragment-Ions erzeugt werden. Jedoch wird auch bei der stabilen Masse, wegen der geringen Auflösung des Ion-Gate, ein größerer Massenbereich aufgezeichnet, so daß zu jedem nachgewiesenen Mutter-Ion eine mögliche Korrelation zu einem Fragment-Ion hergestellt werden kann.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit eines solchen Scans besteht in der Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses der stabilen Ionen und der gleichzeitigen Diskriminierung von Fragment-Ionen. Bei einem Reflektor treten Masseninterferenzen zwischen stabilen Ionen und PSD-Fragment-Ionen auf, was das Signal/Rausch-Verhältnis der stabilen Ionen reduziert und zu einer Beeinträchtigung der Nachweisempfindlichkeit führt.

An dem Beispiel in Bild 4-58 ist der Effekt des Ion-Gate für ein komplexes Peptid-Gemisch demonstriert. Im oberen Spektrum treten im dargestellten Massenbereich 4 Peptid-Signale deutlich hervor. Wird die mittlere Masse (1089,6 u) mit Hilfe des Ion-Gate selektiert (Bild 4-58(b)), erhöht sich die Signalintensität dieses Peptids und die beiden äußeren Peptide werden unterdrückt. Zusätzlich tritt im Massenbereich des offenen Ion-Gate (1062 u bis 1106 u) ein zweites Peptid-Signal bei 1075,6 u deutlich über den Untergrund hervor. Darüber hinaus ist in beiden Spektren zu bemerken, daß bei jeder Masse ein Signal auftritt. Das Signal bei 1075,6 u ist allerdings im Übersicht-Spektrum in der Intensität nicht von den benachbarten Massen unterscheidbar und kann erst durch die Selektion identifiziert werden.

Bei der Breite des selektierten Massenbereiches (44 u) können Masseninterferenzen mit PSD-Fragment-Ionen weitestgehend ausgeschlossen werden. Das schwerste Fragment, welches auftritt, ist der Verlust einer Amino-Gruppe (NH_3 ; $M = 17$ u). Dessen Intensität liegt jedoch in der Regel deutlich unter der Intensität des Mutter-Ions, so daß Fragmente der hier nachgewiesenen Peptide sämtlich unter der Nachweisgrenze liegen.

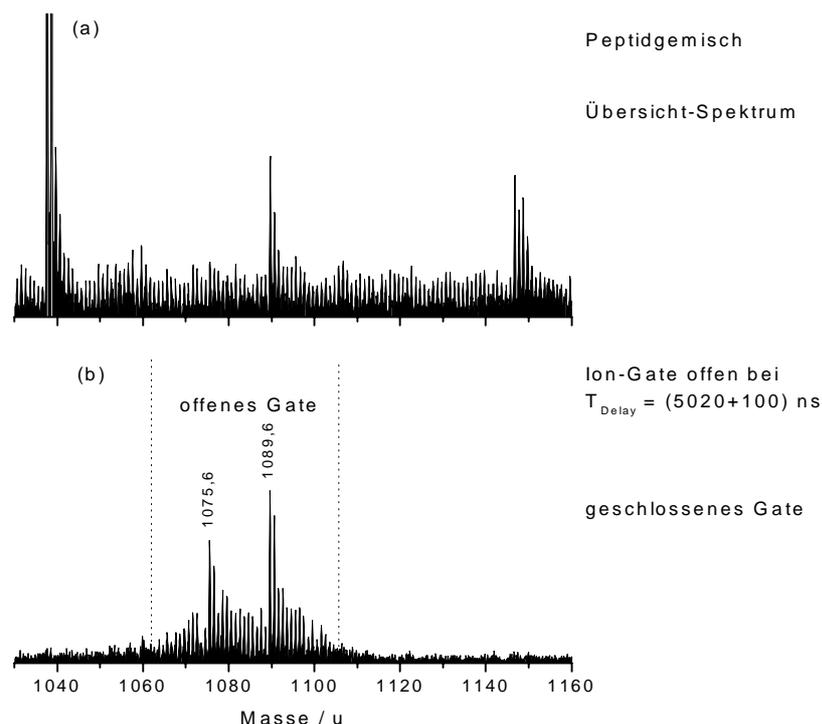


Bild 4-58: Funktionsweise des Ion-Gate bei einem Peptid-Gemisch. (a) Übersicht-Spektrum, (b) Ion-Gate bei $T_{\text{Delay}} = (5020+100) \text{ ns}$ geöffnet. Die gestrichelten Linien geben den durchgelassenen Massenbereich an

Der Scan von stabilen Ionen ist nicht mit dem *gating* des Detektors zu verwechseln, wie sie in einigen Massenspektrometern eingesetzt werden. Die Detektoren werden dabei nur für eine kurze Zeit eingeschaltet, damit leichtere Ionen (wie z. B. die Matrix) den Detektor nicht übersättigen und damit zu einem Signalverlust im interessierenden Massenbereich führen. Allerdings werden dadurch keine Masseninterferenzen zwischen stabilen Ionen und Fragment-Ionen unterdrückt.

4.5.4 Kalibrierung

Für den Scan des Ion-Gates muss zunächst die Zuordnung der Delay-Zeiten zu den Massen der Mutter-Ionen durch eine Kalibrierung erfolgen. Zwischen der Detektionszeit T eines Ions und dem Zeitpunkt T_D , zu dem das Ion durch das Ion-Gate tritt, besteht ein proportionaler Zusammenhang über das Verhältnis der jeweiligen Abstände von der Ionenquelle, L zum Detektor und L_{IG} zum Ion-Gate, daß heißt:

$$\frac{T - t_0}{T_D} = \frac{L}{L_{\text{IG}}} = N.$$

Wegen der „Totzeit“ zwischen Desorption der Ionen und Beginn der Zeitmessung muss die gemessene Flugzeit T um t_0 verschoben werden. Der Kalibrierungs-Faktor N (Verhältnis der Driftstrecken) und die „Totzeit“ t_0 werden experimentell bestimmt, indem für Ionen verschiedener Massen die maximale Delay-Zeit T_D bestimmt wird, zu der das Ion mit der Detektionszeit T noch detektiert wird. Die Parameter können schließlich durch eine lineare Regression bestimmt werden, wozu T und T_D für mindestens zwei Ionen benötigt wird. Bei einem komplexen Peptid-Gemisch, wie in Bild 4-58 dargestellt, kann die Grenze direkt

abgelesen werden, da am Rand des Ion-Gate die aufgelösten Signale verschwinden. In Tabelle 4-28 sind die Parameter für die in Bild 4-58 gezeigte Messung aufgetragen; die dort eingezeichnete Grenze des Massenbereichs wurde mit diesen Parametern bestimmt, wobei für die Öffnungsdauer 100 ns angesetzt wurde.

Tabelle 4-28: Kalibrierung des Ion-Gate durch Lineare Regression. Rechts sind die Parameter und die Funktionsgleichung der Geraden-Gleichung angegeben

T_D	T	
3860	41451	Ausgleichsgerade: $t_0 = -730 \text{ ns}, N = 10,96$
4240	45859	
5740	62343	$T = 10,96 T_D - 730 \text{ ns}$
6460	69964	

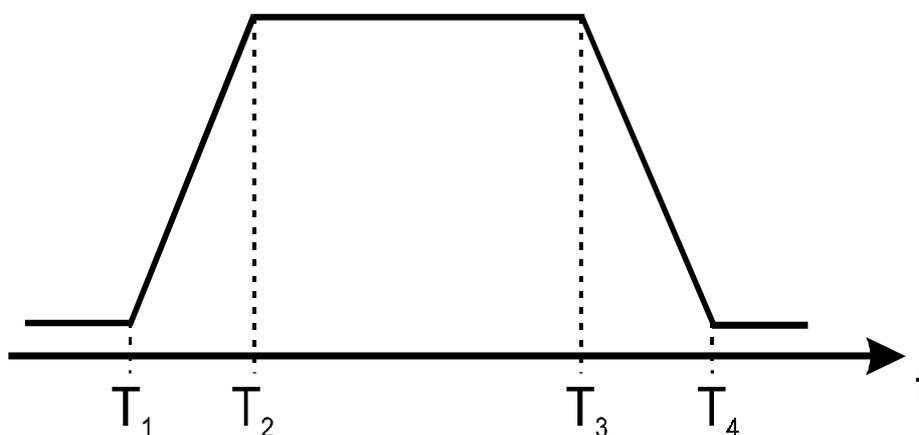


Bild 4-59: Schematischer Verlauf des Delay-Pulses eines Ion-Gate

4.5.5 Transmissions-Profil

Laut den Spezifikationen des Hochspannungsschalters, verläuft die Spannung am Ion-Gate trapezförmig (Bild 4-59). Vom Triggersignal ausgehend benötigt der Schalter eine endliche Anstiegszeit (*rise-time*), bis er vollständig geöffnet ist (Spannung am Ausgang auf 0V; maximale Transmission der Ionen). Danach ist das Ion-Gate solange geöffnet, bis das Triggersignal wieder schließt, worauf erneut eine Abfallzeit bis zum vollständigen Schließen vergeht. Die verwendeten Push-Pull Schalter besitzen eine Anstiegs- und Abfallzeit von je etwa 20 ns und eine minimale Öffnungsdauer von 80 ns.

Dieses Transmissions-Profil des Ion-Gate kann bestimmt werden, indem die Delay-Zeit in kleinen Schritten variiert und die Signalintensität eines Ions aufgezeichnet werden. In Bild 4-60 ist der Verlauf der Transmission für Melittin und Substanz P dargestellt, wobei die Schrittweite 10 ns beträgt. Der Triggerpuls besitzt eine Länge von 80 ns. Es ist zu beachten, daß das zeitliche Profil des Ion-Gate in dieser Darstellung zeitlich *rückwärts* aufgezeichnet wird, das heißt, die abfallende Flanke des dargestellten Transmissions-Profiles der ansteigenden (öffnenden) Flanke des Hochspannungsschalters entspricht. So gelangen beispielsweise bei $T_D = 5200 \text{ ns}$ nur Ionen durch das Ion-Gate, die schwerer als

Substanz P sind. Die Transmission steigt für beide Peptide innerhalb etwa 20 ns auf das Maximum an, bleibt für 50 ns maximal und fällt innerhalb von 20 bis 30 ns wieder auf Null zurück.

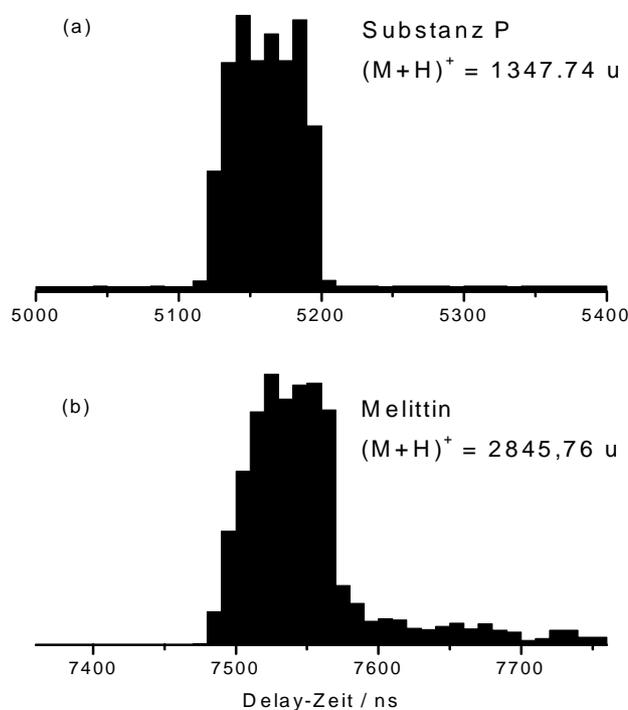


Bild 4-60: Transmissions-Profile bei verschiedenen Massen. (a) Substanz P, (b) Melittin.

4.5.6 Kombination von Einzelspektren zu einem Gesamtspektrum

Um jede Masse einzeln zu selektieren, reicht die Auflösung des Ion-Gate nicht aus. Darüber hinaus würde dadurch ohnehin die Anzahl der benötigten Laserschüsse und der Analyt-Verbrauch übermäßig ansteigen. Aus diesem Grund wird mit jedem Einzelspektrum ein begrenzter Massenbereich aufgezeichnet, der durch die in Kapitel 4.5.4 beschriebene Kalibrierung festgelegt wird. Die untere Grenze ergibt sich direkt aus der Delay-Zeit T_D , die obere Grenze aus $T_D + \Delta T$ (mit ΔT als Öffnungsdauer; typisch sind 100 ns). Durch das schrittweise Verändern der Delay-Zeit T_D , wird der gesamte Massenbereich abgedeckt (Bild 4-61), wobei sich die Massenbereiche der Einzelspektren überlappen können.

Nach erfolgter Messung aller Einzelspektren müssen diese zu einem Gesamtspektrum kombiniert werden. Der einfachste Ansatz hierzu besteht darin, aus allen Einzelspektren die definierten Massenbereiche auszuschneiden und aneinander zu hängen. Problematisch hierbei ist jedoch, daß die Transmission am Rand des offenen Bereiches reduziert ist, wie in Bild 4-58(b) zu erkennen ist, wodurch Peptide bei diesen Massen unterdrückt, bzw. unterinterpretiert werden. Weiterhin ist die genaue Definition der Schnittkante zwischen zwei Spektren kompliziert, und jede Masse wird nur in einer einzigen Messung berücksichtigt.

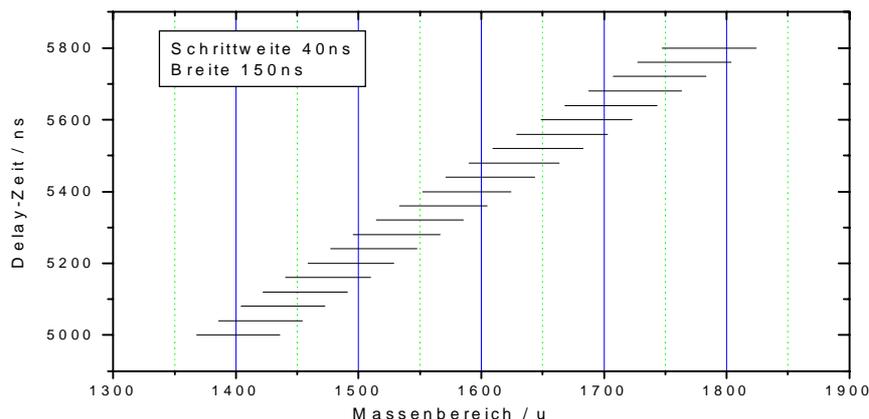


Bild 4-61: Massenbereiche in Abhängigkeit von der Delay-Zeit. Die Balken stellen den bei jeder Delay-Zeit durchgelassenen Massenbereich dar.

Aus diesen Gründen hat sich ein anderer Ansatz als vorteilhaft erwiesen. Da Masseninterferenzen zwischen stabilen Ionen und PSD-Fragment-Ionen im definierten Massenbereich ausgeschlossen werden können, wird jedes Molekül-Ionen-Signal gut aufgelöst detektiert. Das Spektrum wird in diesem Massenbereich mit Hilfe des ISOCONV Algorithmus (Kapitel 4.3.1) zu einem monoisotopischen Spektrum reduziert und schließlich nach Peaks durchsucht (Kapitel 3.6). Jeder gefundene Peak entspricht einer monoisotopischen Masse und wird als Paar (Masse; Intensität) gespeichert. Durch überlappende Massenfenster werden die gleichen Peptide in mehreren Spektren identifiziert. Anschließend wird die gesamte Peakliste mit einer angegebenen Massengenauigkeit komprimiert, indem alle gefundenen Peaks in diesem Massenraster summiert werden.

Durch diese Kompression des Spektrums auf monoisotopische Peaks, wird das Untergrundrauschen unterdrückt. Jedes im kombinierten Spektrum vorkommende Signal entspricht einer gefundenen Peptidmasse (Linienpektrum). Ein Nachteil ist allerdings, daß nur Peaks dargestellt werden, die mit dem verwendeten Peak-Suchverfahren identifiziert werden können. Es besteht folglich die Möglichkeit Peaks in den experimentellen Spektren zu „übersehen“. Dies kann verhindert werden, indem die Schwelle für die Peak-Erkennung sehr niedrig angesetzt wird (Parameter siehe Kapitel 3.6), wodurch auch Schwankungen im Untergrund in die Liste aufgenommen werden und erneut ein kontinuierliches Spektrum entsteht, welches einem transienten Flugzeit-Massenspektrum ähnlicher sieht als das Linienpektrum.

4.5.7 Analyse eines komplexen Peptid-Gemisches

Für ein komplexes Gemisch aus nativen Peptiden ist in Bild 4-62(a) das MALDI-Übersichts-Massenspektrum zu sehen. Wie bereits bei dem Ausschnitt in Bild 4-58 erkennbar ist, liegt in dieser Mischung bei jeder Masse im Bereich von etwa 500 u bis 1800 u ein Peptid vor. Zur Charakterisierung der Probe können lediglich die Peptid-Signale verwendet werden, die deutlich aus diesem Untergrund heraustreten. Die Entfaltung des Übersichtsspektrums mit dem ISOCONV Algorithmus liefert keine wesentliche Verbesserung der Situation.

Die Durchführung eines Scans der stabilen Ionen verspricht jedoch Erfolg, da durch die Selektion zusätzliche Peptide aus dem Untergrund unterschieden werden können (Bild 4-58(b)). Hierzu werden 150 Einzelspektren mit je 30 Laserschuss aufgezeichnet, und die Delay-Zeit von 3800 ns bis 6800 ns mit einer Schrittweite von 20 ns verändert. Dadurch wird der Massenbereich von 600 u bis 2000 u abgedeckt. In jeder Einzelmessung wird ein Bereich von etwa 30 bis 40 u selektiert, in dem jedes gefundene Peptid-Signal als stabiles Ion interpretiert werden kann. Die in den stabilen Massenbereichen identifizierten monoisotopischen Signale sind in Bild 4-62(b) als Linienspektrum dargestellt.

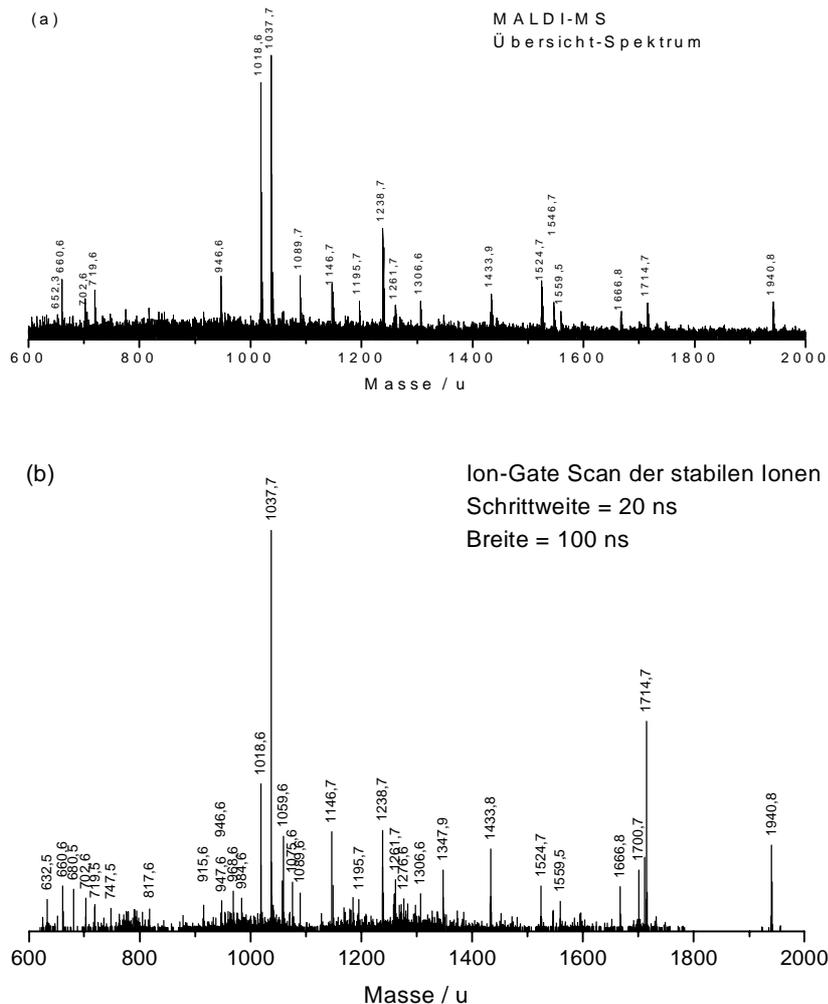


Bild 4-62: Vergleich des Übersichtsspektrums (a) und des Scans der stabilen Ionen (b) von einem komplexen Peptid-Gemisch (Parameter: Delay-Zeit von 3800 ns bis 6740 ns, Schrittweite 20 ns, Breite des Ion-Gate 100 ns).

Es fällt zunächst auf, daß bis etwa 1800 u ein dichter Untergrund existiert, der von dem Peptid-Untergrund des Gemisches stammt und den Abstand 1 u besitzt. Zusätzlich treten jedoch deutlich mehr einzelne Peptid-Signale über den Untergrund hinaus. Auffällig sind die zahlreichen zusätzlichen Signale zwischen 600 u und 800 u, bzw. 900 u und 1000 u, sowie einzelne Peaks zwischen 1000 u und 1700 u. Von den fünf Peaks bei 916,6 u, 946,6 u, 947,6 u, 968,6 u und 984,6 u kann im einzelnen MALDI-Spektrum nur der Peak bei 946,6 u gefunden werden. Insgesamt sind in Bild 4-62(b) 31 Peptide markiert, während es nur 20 im Übersichtsspektrum in Bild 4-62(a) sind.

Für das MALDI-Übersichts-Spektrum wurden insgesamt 100 Einzelspektren summiert, während für den Scan zu jedem Massenintervall 30 Einzelspektren summiert wurden, was insgesamt 4500 Laserpulsen entspricht. Eine reine Erhöhung der Anzahl der summierten Einzelspektren reicht jedoch nicht aus, um die Peptide nachzuweisen. Eine einzelne Masse wurde auch beim Scan nur in etwa 4 Einzelspektren berücksichtigt (120 Laserpulse).

4.5.8 Analyse einer Mischung aus synthetischen Peptiden

Während bei dem Beispiel in Kapitel 4.5.7 im gescannten Spektrum durch die Verbesserung der Empfindlichkeit mehr Peaks nachgewiesen werden können, als bei dem Übersichtsspektrum, sind im folgenden Beispiel einige Peaks unterdrückt (Bild 4-63).

Die Peptid-Mischung besteht aus 8 verschiedenen synthetischen Peptiden, deren Stammlösungen zu gleichen Volumenverhältnissen (je 10 µl) gemischt wurden. Die Signalintensitäten in den MALDI-Massenspektren der Einzel-Peptide variieren bei gleicher Präparation zwischen 100 mV und 600 mV Amplitudensignal der monoisotopischen Masse. In der Mischung verschieben sich die Intensitäten aufgrund unterschiedlicher Protonenaffinitäten der Peptide zum Teil sehr stark. Das intensivste Signal des Peptids bei $(M+H)^+ = 1157,7$ u (IIQGTLWKCP-NH₂) dominiert das Übersichtsspektrum deutlich. Die verwendeten Peptide sind in Tabelle 4-29 aufgelistet, wobei in der letzten Spalte (*Dämpfung*) die relative Amplitudenänderung der Peptid-Signale aus Einzelproben und Mischung angegeben ist. Die Amplitude des intensivsten Peptids wurde dabei auf 100 % normiert. Alle anderen Peptide nehmen relativ dazu um einen Faktor 4 bis 20 ab (auf 23 % bis 5 %).

Tabelle 4-29: Peptide, die in der Mischung verwendet werden. Dämpfung gibt die relative Signalintensität der Peptide in der Mischung im Vergleich zur Einzelmessung an. Das intensivste Signal (M8 SL9) wurde auf 100 % festgelegt.

<i>Nr.</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Masse</i> <i>(M+H)⁺ / u</i>	<i>Dämpfung</i>
1	Allatostatin III	GGSLYSFGL-NH ₂	899,5	5%
2	M39 SL9	IFAMITAHGP-NH ₂	1056,6	6%
3	M8 SL9	IIQGTLWKCP-NH ₂	1157,7	100%
4	M16 SL9	ELCLHHGIYT-NH ₂	1184,6	23%
5	M18 SL9	VCMTNWDCCH-NH ₂	1210,4	23%
6	M1 SL9	ENYHRCEVDK-NH ₂	1291,6	5%
7	M13 SL9	TRDYMMHMDP-NH ₂	1295,5	13%
8	Substanz P	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1347,7	6%

Bei dem Vergleich zwischen Übersichtsspektrum und dem Scan der stabilen Ionen fällt auf, daß die Signalintensität relativ zu dem größten Peak bei den meisten Peptiden zunimmt oder ähnlich bleibt. Lediglich der Peak bei 1184,6 u nimmt deutlich ab, während das Peptid bei 1210,4 u stark an Intensität zunimmt. Neben den protonierten Peptidmassen, werden teilweise zusätzlich die Massen der Natrium- und Kalium-Addukt-Ionen

beobachtet. Die Abnahme der Intensität dieser Signale kann durch verschiedene Probenorte erklärt werden.

Das Signal bei 1044,5 u ist im Übersichtsspektrum im Vergleich zu den anderen Peaks deutlich schlechter aufgelöst und das Maximum des Isotopenmusters liegt bei 1045,5 u, so daß scheinbar zwei Peptide im Abstand 1 u vorliegen. Durch den Scan der stabilen Ionen wird jedoch nur 1 Peptid bei 1044,5 u identifiziert.

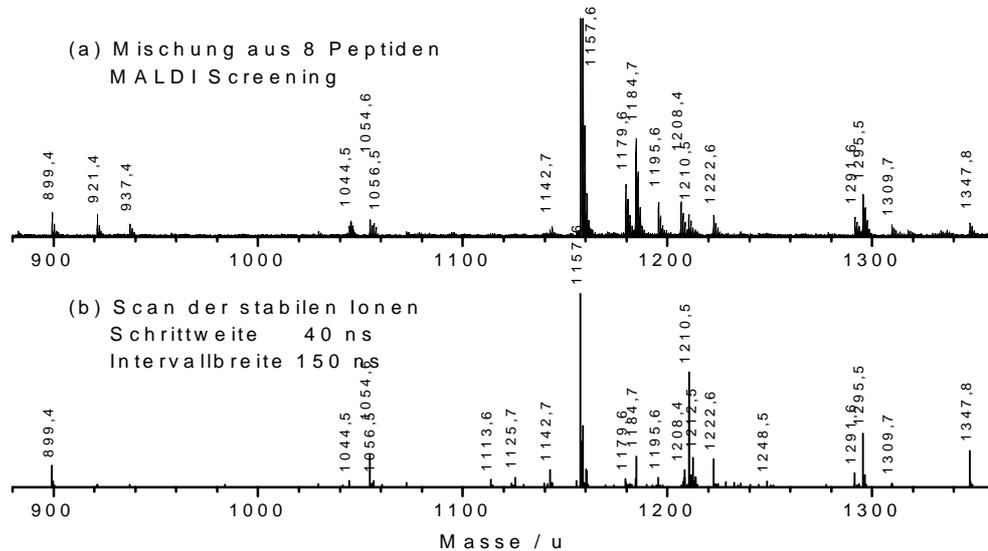


Bild 4-63: (a) MALDI-MS Übersicht-Spektrum einer Mischung aus 10 Peptiden (siehe Tabelle 4-29), (b) Scan der stabilen Ionen.

Für den Nachweis, daß es sich um ein PSD-Fragment-Ion handelt, wird eine Korrelations-Analyse durchgeführt. In den Einzelspektren, bei denen zu der Flugzeit $T = 53770$ ns (entspricht der stabilen Masse 1045,5 u) ein Peak identifiziert wird, findet eine Suche nach einem stabilen Mutter-Ion im transmittierten Massenbereich statt. Der intensivste gefundene Peak wird als potentielles Mutter-Ion zusammen mit den Signalintensitäten gespeichert. Die Intensität der gefundenen Mutter-Ionen wird in einem Korrelations-Spektrum als Linienspektrum dargestellt (Bild 4-64). In dem Linienspektrum wird für das Ion mit der Flugzeit 53770 ns bei der stabilen Masse 1157,7 u ein korreliertes Signal gefunden. Die zweite Linie liegt bei 1054,6 u und ist durch einen Isotopenpeak des stabilen Peptids mit der Masse 1044,5 u im offenen Zustand des Ion-Gate erklärbar. Folglich ist bei einer Korrelations-Analyse darauf zu achten, daß das untersuchte Ion nicht im durch das Ion-Gate definierten stabilen Massenbereich liegt. Im folgenden wird bei der Korrelations-Analyse immer die Masse der stabilen Massen-Kalibrierung angegeben, das heißt, in Bild 4-64 wird eine Korrelations-Analyse mit 1045,7 u durchgeführt).

Eine PSD-Kalibrierung mit der Masse 1157,7 u führt bei der untersuchten Flugzeit zu der Fragment-Ionen-Masse 1043,6 u, was dem b_9 -Ion des Peptids (IIQGTLWKCP-NH₂) mit einer Prolin-Abspaltung führt. Die sehr grosse Intensität ist durch den sterischen Bruch am N-terminalen Ende von Prolin erklärbar. Zusätzlich wurde diese Abspaltung (b_9) auch bei dem Peptid in der Einzelmessung beobachtet.

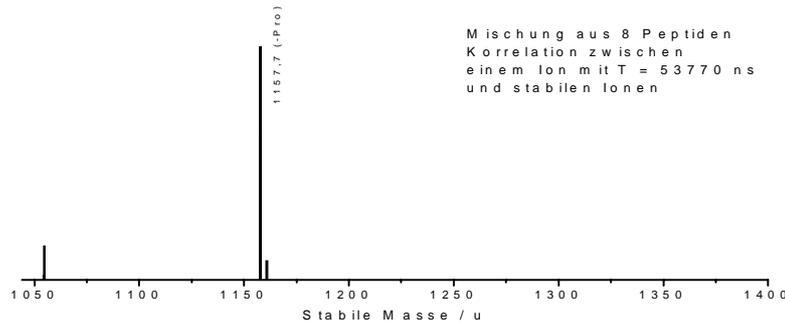


Bild 4-64: Korrelation des Signals bei 1045,6 u (stabile Masse) mit einem stabilen Ion in einer Mischung aus 10 Peptiden.

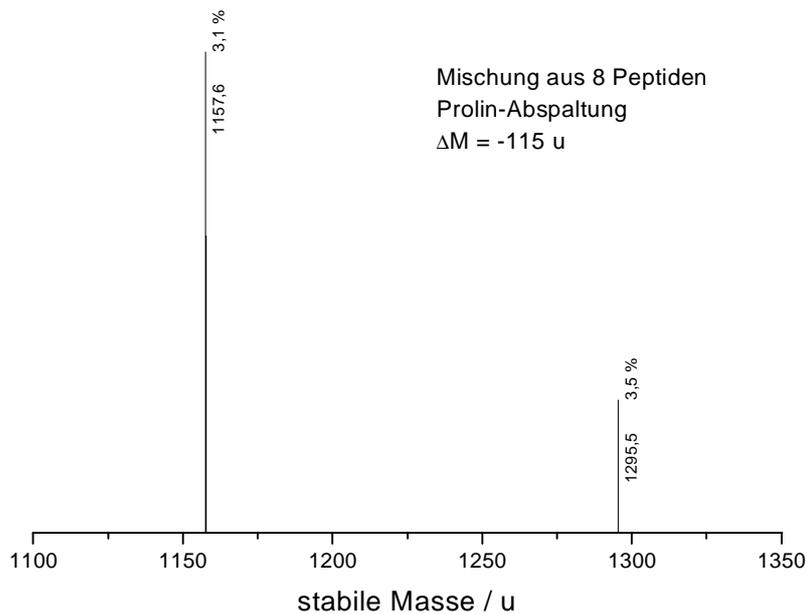


Bild 4-65: Scan der Peptid-Mischung nach einer Abspaltung eines C-terminalen Prolin ($M+H - 114$ u). Die Prozentwerte an den Peaks geben die relative Intensität des Fragment-Ions zum Mutter-Ion an

Mit Hilfe der Korrelations-Analyse läßt sich einem Fragment-Ion durch den Scan der Delay-Zeit des Ion-Gate die Masse des Mutter-Ions zuordnen. Mit einer anschließenden PSD-Fragment-Ionen Massen-Kalibrierung kann der Typ der Abspaltung identifiziert werden.

Ein Beispiel hierfür ist in Bild 4-65 dargestellt, indem der Scan des Ion-Gate nach PSD-Fragment-Ionen Massen einer C-terminalen Prolin-Abspaltung durchsucht wird. Die gefundenen Peptide sind „M8 SL9“ (1157,7 u) und „M13 SL9“ (1295,5 u). Neben den Peaks ist die relative Intensität des Fragment-Ions zum Mutter-Ion angegeben, welche bei etwa 3 % liegt. Betrachtet man Tabelle 4-29 wäre noch bei „M39 SL9“ (1056,6 u) eine Prolin-Abspaltung zu erwarten. Unter Berücksichtigung der bei den anderen Peptiden beobachteten relativen Intensitäten von 3 % und der geringen Intensität des Peptids bei 1056,6 u ist diese Abspaltung aber zu selten um nachgewiesen zu werden.

4.5.9 Analyse von Phosphopeptiden

Ein praktisches Beispiel einer intensiven Abspaltung einer einzelnen Seitenketten-Gruppe ist die O-Phosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosin. Die Phosphat-Gruppe wird entweder als HPO_3 ($(\text{M}+\text{H})^+ = 80$ u) oder $(\text{HPO}_3+\text{H}_2\text{O})$ ($(\text{M}+\text{H})^+ = 98$ u) abgespalten. Die Abspaltung kann im Übersichtsspektrum nicht direkt als PSD-Fragment-Ion identifiziert werden.

In Bild 4-67 (a) und (b) ist für ein einzelnes Phosphopeptid das Übersichtsspektrum (a) und der Scan des Ion-Gate (40 ns Schrittweite, 100 ns Intervall-Breite) (b) dargestellt. Das phosphorylierte Peptid hat die Masse 1598,8 u (RRLIEDAEYAARG-NH₂; das fett markierte Tyrosin ist phosphoryliert), die unphosphorylierte Variante besitzt eine Masse von 1518,8 u und wird ebenfalls beobachtet, da bei der Synthese keine 100%ige Phosphorylierung erreicht wird. Durch das Ion-Gate werden unterhalb von 1520 u außer dem unphosphorylierten Peptid bei 1518,8 u alle anderen Signale unterdrückt (Bild 4-67 (b)).

Die beim Scan unterdrückten Signale entstehen durch die Fragmentierung eines schwereren Moleküls. Um die stabile Masse des Mutter-Molekül-Ions zu ermitteln, wird in den Einzelspektren eine Korrelation zwischen einem unterdrückten Signal (z.B. stabile Masse $M = 1502$ u (Bild 4-67 (d))) mit Signalen im durch die Delay-Zeiten festgelegten Massenintervall stabiler Ionen hergestellt. In Bild 4-66 ist diese Korrelation zwischen einem Signal bei der stabilen Masse 1502 u und stabilen Peptiden dargestellt. Auf der Massenachse wird die Masse des stabilen Ions angegeben. Auf der Intensitätsachse wird in (a) die Intensität des Fragment-Ions und in (b) die Intensität des Mutter-Ions aufgetragen. Die Skala der Fragment-Ionen ist um den Faktor 10 erhöht. Dort treten neben der erwarteten Korrelation zum Phosphopeptid noch zwei sehr kleine Signale bei größeren Massen auf. Diese sind bei Betrachtung der Einzelspektren jedoch ebenfalls als PSD-Fragmente vom Phosphopeptid bei 1598,8 u zu deuten. Durch die unvollständige Unterdrückung des intensiven Signals am Rand des offenen Bereichs des Ion-Gate, treten die Fragment-Ionen noch mit etwa 10 % der maximalen Intensität auf, aber das Mutter-Ion wird so stark beeinflusst, daß es nicht mehr aufgelöst ist und ein falsches, aufgelöstes Mutter-Ion zugeordnet wird. Dies läßt sich auch daran erkennen, daß die Korrelation der falschen Mutter-Ionen nur in einem Einzelspektrum auftritt, während die „richtigen“ Korrelationen mehrfach vorkommen.

Der Vergleich der Linienspektren der Intensitäten des Mutter-Ions und des Fragment-Ions in Bild 4-66 zeigt, daß es sinnvoller ist, die Mutter-Ionen zu betrachten. Die Intensität der Fragment-Ionen sollte in der Regel kleiner als die der Mutter-Ionen sein. Allerdings sollte nicht ausgeschlossen werden, daß es Beispiele gibt, bei denen die Abspaltung deutlich intensiver als das Mutter-Ion ist.

Die weiteren Signale, die sich durch den Scan des Ion-Gate als PSD-Fragment-Ionen herausstellen, ergeben bei der Korrelations-Analyse ebenfalls das Phosphopeptid als Mutter-Ion (Bild 4-67 (c)-(e)). Die Signale können als $(\text{M}+\text{H} - \text{HPO}_3)^+$ ($M-80$ u), $(\text{M}+\text{H} - \text{HPO}_3 - \text{H}_2\text{O})^+$ ($M-98$ u) und als $(\text{M}+\text{H} - \text{HPO}_3 - \text{H}_2\text{O} - \text{NH}_3)^+$ ($M-115$ u) identifiziert werden (Bild 4-67).

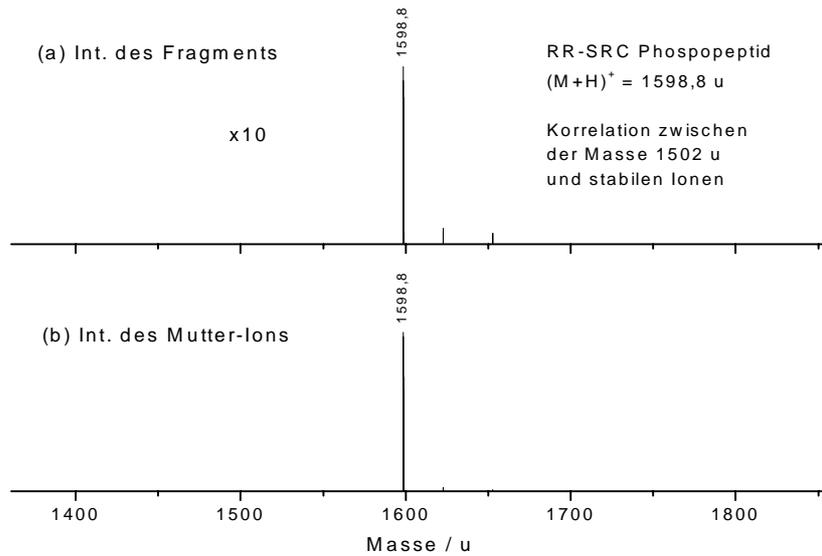


Bild 4-66: Korrelation des Signals bei 1502 u (stabile Masse) zu den stabilen Ionen. (a) Intensität des Fragments und (b) Intensität des stabilen Ions.

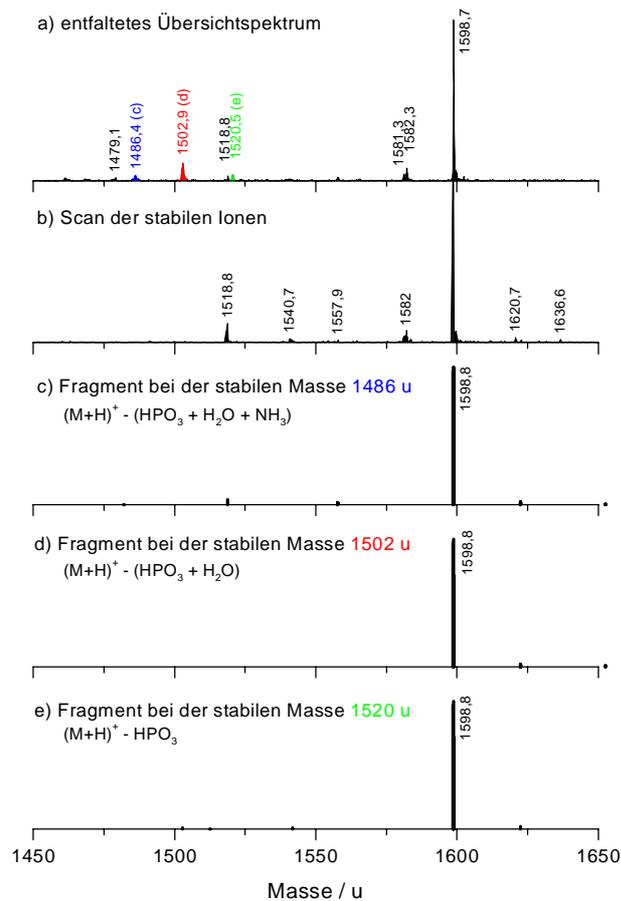


Bild 4-67: Vergleich zwischen Übersichtsspektrum und Scan der stabilen Massen. (a) Übersicht-Spektrum eines phosphorylierten Peptids (M+H)⁺ = 1598,8 u, RRLIEDAEYAARG-NH₂ und (b) Scan der stabilen Massen (Parameter: Schrittweite 40 ns, Breite des Intervalls 100 ns). Korrelation der im Scan unterdrückten Signale. Aufgetragen ist die Intensität des Mutter-Ions.. Stabile Masse der Fragmente bei (c) 1486 u, (d) 1502 u und (e) 1520 u

Ein Vorteil eines derartigen Scans mit anschließender Korrelations-Analyse gegenüber einem Mutter-Ionen-Scan in einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer ist, daß ein größerer Massenbereich der Fragment-Ionen mit einer einzigen Messung untersucht werden kann. So wurde die in Bild 4-67 dargestellte Korrelation der -115 u Abspaltung erst später bemerkt und konnte aus den „Rohdaten“ erzeugt werden. Dies ist insbesondere wichtig, da so nach Abspaltungen bisher unbekannter Masse, z. B. von posttranslationalen Modifikationen in Peptiden, gesucht werden kann.

4.5.10 Vergleich der unterschiedlichen Verfahren

Abschließend sollen die in diesem Kapitel beschriebenen Scan-Verfahren kurz zusammenfassend beurteilt werden. Bei der Analyse eines Flugzeit-Massenspektrums werden gewöhnlich bei einem einzigen Startpuls Ionen über den gesamten Massenbereich erzeugt und nachgewiesen. Bei diffizilen Proben führt dieser Umstand dazu, daß nicht alle entstandenen Ionen tatsächlich nachgewiesen werden, da das Signal der Ionen vom Untergrundrauschen stark gestört wird.

Durch die Verwendung eines zeitlich gepulsten Ion-Gate findet eine zeitliche Filterung der Ionen statt. Dadurch kann in einem Einzelspektrum nur ein eingeschränkter Massenbereich analysiert werden. Allerdings ist die Nachweisempfindlichkeit in diesem Massenbereich höher, da das Untergrundrauschen reduziert ist. Die schrittweise Veränderung der Pulszeit führt zu einer Serie von Einzelspektren, in denen unterschiedliche Massenbereiche aufgezeichnet werden.

4.5.10.1 Übersichtsspektren

Die Einzelspektren können zu Übersichtsspektren zusammengefasst werden. Dies ist für verschiedene komplexe Mischungen aus Peptiden und Phosphopeptiden durchgeführt worden. Ein zusammengesetztes Übersichtsspektrum erreicht im Vergleich zu einem einzelnen Übersichtsspektrum ein wesentlich besseres Signal/Rausch-Verhältnis, wodurch eine höhere Nachweisempfindlichkeit erreicht wird.

4.5.10.2 Korrelations-Analyse

Durch das Ion-Gate ist keine Trennung zwischen stabilen Ionen und Fragment-Ionen möglich. Diese Trennung findet jedoch im nachfolgenden Reflektor statt, so daß alle Ionen, die außerhalb eines durch Zeitpunkt und Verlauf des Pulses am Ion-Gate definierten Zeitfensters detektiert werden, zwischen Quelle und Reflektor fragmentiert sein müssen. Ionen, die innerhalb dieses Zeitfensters nachgewiesen werden, sind stabile Ionen und werden in Übersichtsspektren dargestellt.

Wird ein Fragment-Ion nachgewiesen, kann im Einzelspektrum innerhalb des Zeitfensters nach dem zugehörigen Mutter-Molekül-Ion gesucht werden. Durch eine Kalibrierung der PSD Fragment-Ionen-Masse wird die Masse des Fragment-Ions bestimmt. Durch diese Korrelation zwischen stabilem Mutter-Ion und Fragment-Ion wurden Phosphopeptide und prolinhaltige Peptide in Mischungen von anderen Peptiden getrennt.

Der Vorteil einer Korrelations-Analyse gegenüber einem Vorläufer-Ionen-Spektrum, das mit einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer durchgeführt wurde, ist, daß aus den vorhandenen Daten weitaus mehr Informationen herausgefiltert werden können. Die Masse

einer Abspaltung braucht im Vorraus nicht bekannt zu sein, sondern es kann nach jeder Abspaltung mit einer Masse zwischen 10 u und 200 u in einer einzigen Meßreihe gesucht werden. Dadurch wird der höhere Aufwand bei der Messung (es werden mehr Laserpulse akkumuliert) bei komplexen Proben wieder kompensiert.

5 Zusammenfassung

In den vorhergehenden Abschnitten wurden einige neuartige Methoden entwickelt, mit deren Hilfe die Auswertung und Interpretation von biologischen Proben mit massenspektrometrischen Methoden vereinfacht werden. Die Methoden gliedern sich in zwei Bereiche:

Einen Bereich stellen Datenverarbeitungsverfahren dar, bei dem die herkömmlichen Massenspektren weiterverarbeitet werden. Diese Methoden wurden auf Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations (MALDI) und Elektrospray-Ionisations (ESI) Massenspektrometrie, die beide in der biochemischen Analytik von Peptiden und Proteinen eine große Rolle spielen, exemplarisch angewendet.

Der zweite Bereich kann als „Verbesserung der Rohdaten“ bezeichnet werden. Hier wurde ein neuer Meßmodus für ein Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer anhand eines MALDI-MS demonstriert, durch den die Signalqualität verbessert wird. In diesem Verfahren spielt jedoch auch die Datenverbesserung des ersten Bereichs eine große Rolle.

Als erster Schwerpunkt wurde zunächst untersucht, wie gut die Reproduzierbarkeit von MALDI-Massenspektren und insbesondere Post-Source Decay (PSD) Fragment-Ionen-Spektren ist. Zu diesem Zweck wurden die Matrix und die Laserintensität des Stickstofflasers variiert.

Der Vergleich der Massenspektren mit verschiedenen Matrices zeigt keine signifikanten Differenzen der Fragment-Ionen Spektren. Sowohl die zur Desorption, als auch zur Fragmentierung benötigte Bestrahlungsstärke hängen von der jeweiligen Matrix ab. Der relative Gesamtanteil der Fragment-Ionen zum stabilen Ion nimmt mit zunehmender Bestrahlungsstärke zu, da ein höherer Energiebetrag in der Probe deponiert wird. Auf die relativen Intensitäten der Fragment-Ionen hat die Bestrahlungsstärke keinen Einfluß.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit ist auf die Untersuchung der Isotopenverteilung von Peptiden gelegt worden. Dafür wurden die mit Hilfe der natürlichen Häufigkeiten der Nuklide ermittelten theoretischen Isotopenmuster für alle Aminosäure-Kombinationen bestimmt und massenabhängig gemittelt.

Die massenabhängige Häufigkeitsverteilung der Aminosäure-Kombinationen zeigt eine ungleichmäßige Verteilung, bei der einzelne Intervalle nicht besetzt sind (Cluster-Bildung). Dadurch ist bis zu einer Masse von etwa 1600 u eine exakte Zuordnung der nominellen Masse (Anzahl der Nukleonen der Atome) eines Peptids möglich, während sich die Cluster gleicher nominaler Masse bei höheren Massen überlappen. Über den gesamten Massenbereich ist eine Periodizität von etwa 14 u erkennbar, mit der die mittleren Häufigkeiten der einzelnen Cluster schwanken.

Die Häufigkeit der Aminosäure-Kombinationen steigt im Mittel exponentiell an und verdoppelt sich etwa alle 100 u.

Die Intensitäten der Isotopenpeaks nehmen mit der Masse näherungsweise nach einem Potenzgesetz zu und variieren mit für jeden Isotopenpeak unterschiedlichen relativen

Standardabweichungen. Auch der Anstieg der Isotopen-Intensität ist nicht monoton, sondern verläuft in Wellenform mit einer Periode von 14 u.

Wird für jede Aminosäure-Kombination die relative Isotopen-Intensität über die Masse in ein Diagramm eingetragen, ordnen sich die Punkte entlang diagonaler Linien an. Die Ursache dieser Linien konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Vermutung einer Zu- oder Abnahme des Anteils nur einer Atomsorte entlang einer Linie konnte nicht bestätigt werden.

Bei den dritten und weiteren höheren Isotopenpeaks läßt sich eine Klassifizierung nach der Anzahl der Schwefelatome durchführen, da durch die große ^{34}S Häufigkeit die höheren Isotopen-Signale überdurchschnittlich intensiv sind.

Diese Verbreiterung des Isotopenmusters läßt sich ausnutzen, um durch einen Vergleich des experimentellen Isotopenmusters mit den für Schwefelklassen gemittelten Isotopenmustern den Schwefelanteil eines Peptids zu schätzen. Die Schätzmethode wurde an zahlreichen bekannten Peptiden erprobt und ergibt mit einer Sicherheit von 90 % eine Einschränkung auf nur zwei mögliche Anzahlen an Schwefelatomen. Dies führt zu einer deutlichen Reduzierung der Anzahl in Frage kommender Peptid-Sequenzen bei der Aminosäure Sequenzierung unbekannter Peptide.

Der Hauptgrund für die Untersuchungen der Isotopenmuster von Peptiden bestand in der Überprüfung der Varianz der gemittelten Isotopenmuster. Da diese klein genug ist, kann mit Hilfe des Isotopenmusters unterschieden werden, ob zwei Signale im Abstand 1 u vom Isotopenmuster eines unbekanntes Peptids oder von zwei verschiedenen Peptiden stammen.

Mit einem Entfaltungsalgorithmus, der die gemittelten Isotopenmuster von Peptiden zugrunde legt, ist es möglich Isotopenmuster aus einem Massenspektrum herauszufiltern und der monoisotopischen Masse des Peptids zuzuordnen. Dafür wurde das Programm ISOCONV entwickelt.

Die Entfaltung führt bei MALDI Massenspektren komplexer Mischungen (MHC-I Peptide) zu einer deutlichen Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses.

Die Liste der identifizierten Massen ist durch die Unterdrückung von höheren Isotopenpeaks und der Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses der monoisotopischen Signale vollständiger und genauer, als die vergleichbare Liste eines unverarbeiteten Spektrums.

Zusätzlich lassen sich Masseninterferenzen von Peptiden benachbarter Masse (+1 u) identifizieren. Dies wurde genutzt, um am Beispiel eines Gemisches aus MHC-Peptiden die Masse eines weiteren Peptids zu bestimmen, dessen Existenz bereits früher durch die Deuterierung der Probe postuliert werden konnte, wobei jedoch die Masse unbekannt blieb.

Bei der Anwendung auf PSD-Fragment-Ionen-Spektren von Peptiden ist durch die Entfaltung eine leichtere Unterscheidung zwischen Ammoniak- und Wasserabspaltung möglich. Eine Klassifizierung der Isotopenmuster nach dem Schwefelgehalt hat kaum Auswirkungen auf das Ergebnis. Für die Entfaltung ist es folglich nicht von Bedeutung, die

Anzahl der Schwefelatome des Peptids zu kennen. Dagegen ist diese Information für die Sequenzierung hilfreich.

Eine Erweiterung des Entfaltungsalgorithmus auf ESI-Massenspektren, in denen verschiedene Ladungszustände gleichzeitig auftreten, ist ebenfalls durchgeführt worden (bis $q=7$). Für höhere Ladungen tritt bei dem ESI-MS eine Begrenzung durch das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers ein. Darüber hinaus wurden bisher nur die gemittelten Isotopenmuster für 7 Isotopenpeaks bestimmt, was bei hohen Massen nicht mehr ausreicht. Hier müßten weitere Isotopenpeaks bestimmt werden um den für den Algorithmus zugänglichen Massenbereich zu erweitern.

Durch die sequentielle Anwendung des Entfaltungsalgorithmus, beginnend bei einer maximalen Ladung bis hinab zu $q = 1$, werden einzelne Massenspektren der Ionen gleicher Ladung bestimmt. Die Einzelspektren werden zu einem gesamten entfalteten Spektrum der Massen einfach geladener Ionen addiert.

Diese Methode führt zu einer Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses und zu einer deutlich reduzierten Anzahl an Peaks, da sowohl die Isotopenpeaks, als auch die verschiedenen Ladungszustände der Ionen desselben Moleküls auf einen einzigen Peak reduziert werden.

Durch die Reduzierung auf den monoisotopischen, einfach geladenen Peak ist mit dem Fehler der Schwankung der gemittelten Isotopen-Intensität eine Quantifizierung der Signalintensitäten möglich. Dies wurde am Beispiel von Mischungen aus C-terminaler Säure und Amid sowohl für MALDI, als auch für ESI-Massenspektrometrie demonstriert. Die relativen Signalintensitäten geben nicht das Konzentrationsverhältnis in der Probe wieder, da die Ladungsaffinitäten der Moleküle variieren.

Die Anwendung auf ESI-MS/MS Fragment-Ionen-Spektren ist ebenfalls durchgeführt worden. Hier ist die maximale Ladung bereits durch die Ladung des Mutter-Molekül-Ions bekannt.

Durch die Entfaltung auf Massen 1-fach geladener Ionen ist ein direkter Vergleich der Fragment-Ionen-Spektren desselben Peptids mit verschiedenen Ladungszuständen möglich. Die Entfaltung erfolgt für jede Ladung einzeln, so daß von jedem Fragment-Ion zusätzlich die Ladung bekannt ist. Diese Information kann als zusätzliche Sequenzinformation genutzt werden.

Es gilt ein Prinzip der Ladungserhaltung. Die Ladungen korrespondierender Fragment-Ionen (z. B. ein b-Fragment-Ion und ein y-Fragment-Ion) ergeben in der Summe die Ladung des Mutter-Molekül-Ions. Dies spricht für eine Lokalisierung der Protonen bei den Aminosäuren und gegen eine ladungsinduzierte Fragmentierung.

Neben den bisher beschriebenen Methoden, die sich im wesentlichen auf eine Verbesserung der Verarbeitung von experimentellen Daten beschränken, wurde im zweiten Bereich an Verfahren gearbeitet, die unter dem Stichwort „Verbesserung der Rohdaten“ zusammen gefasst werden können. In diesen Bereich fallen alle Methoden, die eine Aufzeichnung qualitativ besserer Massenspektren ermöglichen, indem beispielsweise die Empfindlichkeit oder die Massenauflösung des Massenspektrometers gesteigert werden.

In dieser Arbeit wurde ein MALDI Reflektor Flugzeit-Massenspektrometer in Kombination mit einem zeitlich gepulsten elektrischen Ablenkkfeld (Ion-Gate) verwendet, um Moleküle aus einem, durch die Pulszeit bestimmten, Massenintervall zu selektieren.

Durch Variation der Pulszeit kann mit mehreren Einzelspektren aus den Massenintervallen ein Spektrum des gesamten Massenbereichs zusammengesetzt werden, wobei in jedem Einzelspektrum nur Signale von stabilen Ionen auftreten, deren Signal/Rausch-Verhältnis und Signalintensität deutlich besser als bei einem ohne Selektion gemessenen Massenspektrum sind.

In komplexen Mischungen ist die Unterdrückung zum Teil so stark, daß einige Peptide erst durch die Verwendung des Ion-Gate nachgewiesen werden. Auf diese Weise können bei Protein-Verdauen verbesserte Massenlisten (*peptide fingerprints*) erzeugt werden. Dies gilt insbesondere, wenn wegen geringer Substanzmengen in einem einfachen Übersichtsspektrum kaum Peptid-Signale auftreten.

Der Vergleich eines Scans der stabilen Ionen mit dem Übersichtsspektrum bietet die Möglichkeit Fragment-Ionen zu identifizieren und dem Mutter-Molekül-Ion zuzuordnen.

Bei der Selektion des Ion-Gates sind alle Signale, die außerhalb eines mit Hilfe der Delay-Zeit definierten Massenintervalls liegen, als PSD-Fragment-Ionen zu interpretieren. Das dazugehörige Mutter-Molekül-Ion muss folglich innerhalb dieses Massenintervalls auftreten. Hiermit ist eine Neutralverlust-Analyse von Abspaltungen beliebiger Masse mit einem einzigen Scan bei einem Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer möglich. Eine Erweiterung auf eine Vorläufer-Ionen-Analyse beliebiger Masse ist denkbar. Hier müssen die Potentiale am Reflektor dynamisch im Einklang mit den Delay-Zeiten variiert werden, um immer die konstante Fragment-Ionen-Masse zu detektieren.

Beide Bereiche, die in dieser Arbeit behandelt wurden (Datenauswertung und Datenaufnahme), ergänzen einander. So ist es nicht ausreichend allein die Empfindlichkeit des Massenspektrometers zu steigern, sondern mit zunehmender Komplexität der analysierten Proben nimmt auch der Bedarf an fortgeschrittenen Methoden zur Auswertung und Analyse zu.

Der Scan des Ion-Gate erhöht zum einen zwar die Empfindlichkeit, dies geht jedoch auf Kosten der Geschwindigkeit der Messung, weswegen diese Methode nur bei speziellen Fragestellungen nützlich ist. Einige Beispiele für solche Fragestellungen sind post-translationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung) von Peptiden oder eine Suche der terminalen Aminosäuren.

Die Entfaltung mit ISOCONV wird dagegen innerhalb weniger Sekunden mit einem herkömmlichen Massenspektrum von Peptiden durchgeführt und kann als Standardschritt bei der Verarbeitung des Massenspektrums eingesetzt werden. Es ist nur noch notwendig das entfaltete Spektrum zu analysieren, wobei im Zweifelsfall das Originalspektrum überprüft werden kann. Anwendbar ist dieses Verfahren bei allen Anwendungen von MALDI- oder ESI-Massenspektrometrie, wie zum Beispiel PSD-Fragment-Ionen-Spektren, Peptid-Massenlisten (*Fingerprints*), z. B. von Protein-Verdauen, oder ESI-Fragment-Ionen-Spektren höher geladener Ionen. Insbesondere im letzten Beispiel ist durch das Entfalten die Beschränkung der Ladungszahl des Mutter-Ions auf maximal 2-3 aufgehoben.

Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden unterstützen die Analyse komplexer Fragestellungen in der modernen Bioanalytik. Während die Entfaltung als Standardverfahren für die Analyse von Peptidmischungen eingesetzt werden kann, liefert der Vorläuferionen-Scan ein Hilfsmittel um komplexe Peptidmischungen zu untersuchen, die mit chemischen Methoden nicht mehr weiter fraktioniert werden können.

Danksagung

Zum Abschluß möchte ich noch einigen Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Bernhard Spengler danke ich dafür, daß er sich als Betreuer der Arbeit zur Verfügung gestellt hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, in diesem interessanten Gebiet der Naturwissenschaften einen Beitrag zu leisten. Bei ihm muss ich mich ebenfalls für die kritischen Diskussionen der Ergebnisse und des Dissertationsentwurfs bedanken.

Bei Prof. Dr. Michael Karas möchte ich mich dafür bedanken, daß er sich zur Begutachtung meiner Arbeit bereitgefunden hat.

Dr. Ralf Hoffmann gebührt ein großer Dank für die Bereitstellung des massenspektrometrischen Labors und die Herstellung zahlreicher Proben. Er hat mich vor Ort immer sehr gewissenhaft betreut.

Für die Herstellung der synthetischen Peptide danke ich zusätzlich auch noch Carsten Böhnke.

Sabine Metzger danke ich für die lebhaften Diskussionen im „Klassenzimmer“ und im Labor.

Nadine Schneider und meiner Frau Nicole möchte ich danken, daß beide beim Korrekturlesen so geduldig nach Fehlern gesucht haben. Nicole danke ich auch für die Geduld, die sie mit mir, vor allem in der Schlußphase, an manchem Abend haben mußte.

Marco Wehofsky, April 2001

Literaturverzeichnis

- [1] Lawson, A. M. (Hrsg.): Mass Spectrometry. De Gruyter **1989**
- [2] Munsen, M. S. B.; Field, F. H.: „Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction“. *Journal of the American Chemical Society*, **88**, **1966**, 2621-2630
- [3] Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C.; Ten Noever de Brauw, M. C.: „Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules“. *Analytical Chemistry* **50**, **1978**, 985-991
- [4] Heck, A. J. R.: „Throwing light on molecules falling apart: photofragment imaging“. *European Mass Spectrometry* **3** (3), **1997**, 171-183
- [5] Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.: „Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry“, *Nature* **293**, **1981**, 270-275
- [6] Barber, M.; Bordoli, R. S.; Elliot, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.: „Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry“, *Analytical Chemistry* **54**(4), **1982**, 645A-657A
- [7] Benninghoven, A.; Jaspers, D.; Sichtermann, W.: „Secondary-Ion Emission of Amino Acids“. *Applied Physics* **11**, **1976**, 35-39
- [8] Benninghoven, A.; Sichtermann, W. K.: „Detection, Identification and Structural Investigation of Biologically Important Compounds by Secondary Ion Mass Spectrometry“. *Analytical Chemistry* **50**, **1978**, 1180-1184
- [9] Torgerson, D.; Skowronski, R.; Macfarlane, R.: „New Approach to the Mass Spectroscopy of Non-Volatile Compounds“, *Biochemical and Biophysical Res. Comm.*, **60**(2), **1974**
- [10] Macfarlane, R.; Torgerson, D.: „Californium-252 Plasma Desorption Mass Spectroscopy“, *Science*, **191**(920), **1976**
- [11] Wien, K.: „PDMS Introduction“, in: *PDMS and Clusters, Proc. Wang.*, 269 Lecture Notes in Phys., **1986**
- [12] Nguyen, D.N. ; Becker, G.W. ; Riggin, R.M.: „Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology“. *Journal of Chromatography A*, **705**, **1995**, 21-45
- [13] Fenn, J.B., Mann, M; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.: „Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules“. *Science* **1989**, **246**, 64-71
- [14] McCormack, A. L.; Schieltz, D. M.; Goode, B. and Yang, S.; Barnes, G.; Drubin, D.; Yates III, J. R.: „Direct Analysis and Identification of Proteins in Mixtures by LC/MS/MS and Database Searching at the Low-Femtomole Level“. *Analytical Chemistry* **69**, **1997**, 767-776
- [15] Karas, M.; Hillenkamp, F.: „Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons“, *Analytical Chemistry*, **60**, **1988**. 2299-2301

-
- [16] Zenobi, R.; Knochenmuss, R.: „Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry“. *Mass Spectrometry Reviews* 17, **1998**, 337-366
- [17] Overberg, A.; Karas, M.; Bahr, U.; Kaufmann, R.; Hillenkamp, F.: „Matrix-assisted infrared-laser (2.49 μm) desorption/ionization mass spectrometry of large biomolecules“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 4, **1990**, 293
- [18] Overberg, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.: „Matrix-assisted laser desorption of large biomolecules with a TEA-CO₂-laser“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5, **1991**, 128
- [19] Stevenson, T. I. ; Loo, J. A. ; Greis, K. D. : „Coupling capillary high-performance liquid chromatography to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and N-terminal sequencing of peptides via automated microblotting onto membrane substrates“. *Analytical Biochemistry*, **1998**, 262(2), 99-109
- [20] MacLuckey, Scott A. [Hrsg.]: „Special issue quadropole ion trap mass spectrometry : a collection of invited papers in honour of the scientific contributions of John F. J. Todd and Raymond E. March“. *International journal of mass spectrometry* 190/191, **1999**
- [21] Guilhaus, M.; Mlynski, V.; Selby, D.: „Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11, **1997**, 951-962
- [22] Wiley, W. C.; McLaren, I. H.: *Rev. Sci. Instrum.* 26, **1955**, 1150
- [23] Papayannopoulos, I. A.: „The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectra of Peptides“. *Mass Spectrometry Reviews*, 14, **1995**, 49-73
- [24] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.: „Metastable Decay of Peptides and Proteins in Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5, **1991**, 198-202
- [25] Polce, M. J.; Beranova, S.; Nold, M. J.; Wesdemiotis, C.: „Characterization of Neutral Fragments In Tandem Mass Spectrometry: A Unique Route to Mechanistic and Structural Information“. *Journal of Mass Spectrometry* 31(10), **1996**, 1073-1085.
- [26] Kenny, P. T.; Nomoto, K.; Orlando, R.: „Fragmentation studies of peptides: the formation of γ ions.“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6(2), **1992**, 95-7
- [27] Henry, C. M.: „Electrospray in Flight: Orthogonal acceleration brings the advantages of time of flight to electrospray“. *Analytical Chemistry News and Features*, March 1, **1999**, 197A-201A
- [28] Karas, M.; Glückmann, M.; Schäfer, J.: „Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors“. *Journal of Mass Spectrometry* 35, **2000**, 1-12
- [29] Spengler, B.; Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F.: „Excimer Laser Desorption Mass Spectrometry of Biomolecules at 248 and 193 nm“. *Journal of Physical Chemistry* 91, **1987**, 6502
- [30] Karbach, V; Knochenmuss, R: „Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12 (14), **1998**, 968-974

- [31] Allwood, D. A. ; Dyer, P. E. ; Dreyfus, R. W.: „Ionization Modelling of Matrix Molecules in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11, **1997**, 499-503
- [32] Jorgensen, T. J. D.; Bojesen, G.; RahbekNielsen, H.: „The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions“. *European Mass Spectrometry* 4 (1), **1998**, 39-45
- [33] Bökelmann, V.; Spengler, B.; Kaufmann, R.: „Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization“. *European Mass Spectrometry* 1, **1995**, 81-93
- [34] Spengler, B.; Bökelmann, V.: „Angular and time resolved intensity distributions of laser-desorbed matrix ions“. *Nuclear Instruments and Methods B* 82, **1993**, 379-385
- [35] Knochenmuss, R.; Karbach, V.; Wiesli, U.; Breuker, K.; Zenobi, R.: „The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: Application to negative ions and further characteristics“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12 (9), **1998**, 529-534
- [36] Lehmann, E.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R.: „Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: Contribution of pre-formed ions“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(14), **1997**, 1483-1492
- [37] Dubois, F.; Knochenmuss, R.; Steenvoorden, R. J. J. M.; Breuker, K.; Zenobi, R.: „On the mechanism and control of salt-induced resolution loss in matrix-assisted laser desorption/ionization“. *European Mass Spectrometry* 2(2-3), **1996**, 167-172
- [38] Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Rossel-Larsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J.; Mirgorodskaya, E.; Kroll-Kristensen, A.; Palm, L.; Roepstorff, P.: „Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes“. *Journal of Mass Spectrometry*, 32, **1997**, 593-601.
- [39] Dai, Y.; Whittall, R. M.; Li, L.: „Confocal Fluorescence Microscopic Imaging for Investigating the Analyte Distribution in MALDI Matrices“. *Analytical Chemistry* 68, **1996**, 2494-2500
- [40] Dreisewerd, K ; Schurenberg, M ; Karas, M ; Hillenkamp, F: „Influence Of The Laser Intensity And Spot Size On The Desorption Of Molecules And Ions In Matrix-Assisted Laser- Desorption Ionization With A Uniform Beam Profile“. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 141(2), **1995**, 127-148
- [41] Bouschen, W.; Spengler, B.: „Analytik biologischer Proben mittels Raster-Mikrosonden-MALDI-MS“. *Verhandlungen DPG (VI)* 35, **2000**, 965-966
- [42] Beavis, R. C.; Chait, B. T.: „Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption“. *Chemical Physics Letters* 181(5), **1991**, 479

-
- [43] Glückmann, M ; Karas, M: „Special feature: Perspective - The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption ionization“. *Journal of Mass Spectrometry*, **1999**, 34(5), 467-477
- [44] Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Martin, S. A.: „On the Initial Velocity of Ions Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization and its Effect on the Calibration of Delayed Extraction Time-of-Flight Mass Spectra“. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8, **1997**, 209-217
- [45] Ens, W.; Mao, Y; Mayer, F.; Standing, K. G.: „Properties of matrix-assisted laser desorption. Measurements with a time-to-digital converter“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5(3), **1991**, 117-123.
- [46] Cotter, R. J. [Hrsg.]: Time-of-Flight Mass Spectrometry: developed from symposia held at the 204th National Meeting of the American Chemical Society, Washington , DC, August 23 - 28, 1992, and the Pittsburgh Conference on Analytical, ACS Symposium Series 549, **1994**
- [47] Beavis, R.C.: „The Interpretation of Reflectron Time-of-Flight Mass Spectra“. In: Time-of-Flight Mass Spectrometry Hrsg.: Cotter, R. J., ACS Symposium Series 549, **1994**
- [48] Mamyrin, B. A.; Karatajev, V. J.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A.: „The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution“. *Sov. Phys. JETP* 37, **1973**, 45-48
- [49] Brown, R.S.; Lennon, J. J.: „Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer“. *Analytical Chemistry* 67, **1995**, 1998-2003
- [50] Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin , S. A.: „Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9, **1995**, 1044-1050
- [51] Whittal, R. M.; Li, L.: „High-Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization in a Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer“. *Analytical Chemistry* 67, **1995**, 1950-1954.
- [52] Juhasz, P.; Roskey, M. T.; Smirnov, I. P.; Haff, L. A.; Vestal, M. L.; Martin, S. A.: „Applications of Delayed Extraction Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry to Oligonucleotide Analysis“. *Analytical Chemistry* 68, **1996**, 941-946.
- [53] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R: „Fundamental Aspects of Post-Source Decay in Matrix-Assisted Laser desorption Mass Spectrometry: I. Residual Gas Effects“. *Journal of Physical Chemistry* 96, **1992**, 9678-9684
- [54] Cornish, T. J.; Cotter, R. J.: „A Curved-field Reflectron for Improved Energy Focusing of Product Ions in Time-of-flight Mass Spectrometry“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 7, **1993**, 1037-1040

- [55] Spengler, B.: „Postsource Decay Analysis in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules“. *Journal of Mass Spectrometry* 32, **1997**, 1019-1036
- [56] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.: „Peptide Sequencing by Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6, **1992**, 105-108
- [57] Kaufmann, R.; Chaurand, P.; Kirsch, D.; 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* 10, **1996**, 1199-1208
- [58] Russell, D. H.; Edmondson, R. D.: „High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry“. *Journal of Mass Spectrometry* 32, **1997**, 263-276
- [59] Piyadasa, C. K. G.; Håkansson, P. ; Ariyaratne, T. R.; Barofsky, D. F.: „A high resolving power ion selector for post-source decay measurements in a reflecting time-of-flight mass spectrometer“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12(22), **1998**, 1655-1664
- [60] Roepstorff, P.; Fohlman, J.: „Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides“. *Biomedical Mass Spectrometry* 11, **1984**, 601.
- [61] Johnson, R. S.; Martin, S. A.; Biemann, K.: „Collision-Induced Fragmentation of $(M+H)^+$ Ions of Peptides. Side Chain Specific Sequence Ions“. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 86, **1988**, 137-154.
- [62] Yergey, James; Heller, David; Hansen, Gordon ; Cotter, Robert J.; Fenselau, Catherine: „Isotopic Distributions in Mass Spectra of Large Molecules“. *Analytical Chemistry* 55, **1983**, 353-356
- [63] Lide, D. R. (Hrsg.): CRC Handbook of Chemistry and Physics, 72nd edition, CRC Press, Boca Raton, **1991**, 11:28-11:132
- [64] H. Kuchling: *Taschenbuch der Physik*. Leipzig: Fachbuchverlag GmbH Leipzig, **1991** – ISBN 3-343-00759-5
- [65] Senko, M. W.; Beu, S. C.; McLafferty, F. W.: „Determination of Monoisotopic Masses and Ion Populations for Large Biomolecules from Resolved Isotopic Distributions“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 6, **1995**, 229-233
- [66] Marshall, A. G.; Senko, M. W.; Li, W.; Li, M.; Dillon, S.; Guan, S.; Logan, T. M.: „Protein Molecular Mass to 1 Da by ^{13}C , ^{15}N Double-Depletion and FT-ICR Mass Spectrometry“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 119, **1997**, 433-434
- [67] Spengler, B.; Lützenkirchen, F.; Kaufmann, R.: „On-target Deuteration for Peptide Sequencing by Laser Mass Spectrometry“. *Organic Mass Spectrometry* 28, **1993**, 1482-1490

-
- [68] Kuster, B.; Mann, M.: „O-18-labeling of N-glycosylation sites to improve the identification of gel-separated glycoproteins using peptide mass mapping and database searching.“. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71(7). 1431-1440
- [69] Schnolzer, M.; Jedrzejewski, P.; Lehmann, W. D.: „Protease-catalyzed incorporation of ¹⁸O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.“. *Electrophoresis* 17(5), **1996**, 945-53
- [70] Zubarev, R. A.; Bondarenko, P. V.: „An A Priori Relationship between the Average and Monoisotopic Masses of Peptides and Oligonucleotides“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5, **1991**, 276-277
- [71] Cheng, K. N.; Elsom, L. F.; Hawkins, D. R.: „Identification of metabolites of halofantrine, a new candidate anti-malarial drug, by gas chromatography-mass spectrometry“. *Journal of Chromatography* 581(2), **1992**, 203-11
- [72] Do Lago, C. L.; Kascheres, C.: „New method of isotope pattern analysis“. *Comput. Chem.* 15(2), **1991**, 149-55
- [73] Moraes, M. C.; Neto, J. G. A. B.; Juliano, V. F.; doLago, C. L.: „Eliminating the interference of M-nH ions in isotope patterns from low-resolution mass spectra“. *International Journal of Mass Spectrometry* 178(3), **1998**, 129-141
- [74] Wehofsky, M.; Hoffmann, R.; Spengler, B.: „Berücksichtigung von Isotopenverteilungen bei der Interpretation von PSD-Massenspektren“. *Verhandlungen DPG (VI)* 34, **1999**, 333-333
- [75] Wehofsky, M.; Hoffmann, R.; Hubert, M.; Spengler, B.: „Isotopic Deconvolution of MALDI-Mass Spectra for Substance-class Specific Analysis of Complex Samples“. *European Mass Spectrometry* submitted **31.5.2000**
- [76] Gras, R.; Müller, M.; Gasteiger, E.; Gay, S.; Binz, P.-A.; Bienvenut, W.; Hoogland, C.; Sanchez, J.-C.; Bairoch, A.; Hochstrasser, D. F.; Appel, R. D.: „Improving Protein Identification from Peptide Mass Fingerprinting through a Parametrized Multi-Level Scoring Algorithm and an Optimized Peak Detection“. *Electrophoresis* 20, **1999**, 3535-3550
- [77] Gay, S.; Binz, P.-A.; Hochstrasser, D. F.; Appel, R. D.: „Modeling Peptide Mass Fingerprinting Data Using the Atomic Composition of Peptides“, *Electrophoresis* 20, **1999**, 3527-3534
- [78] Berndt, P.; Hobohm, U.; Langen, H.: „Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints“. *Electrophoresis* 20, **1999**, 3521-3526
- [79] Zhang, Z.; Marshall, A. G.: „A Universal Algorithm for Fast and Automated Charge State Deconvolution of Electrospray Mass-to-Charge Ratio Spectra“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 9(3), **1998**, 225-233

- [80] Horn, D. M.; Zubarev, R. A.; McLafferty, F. W.: „Automated Reduction and Interpretation of High Resolution Electrospray Mass Spectra of Large Molecules“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 11, **2000**, 320-332
- [81] Takayama, M.; Tsugita, A.: „Does in-source decay occur independent of the ionization process in matrix-assisted laser desorption?“. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 181, **1998**, L1-L6
- [82] Katta, V.; Chow, D. T.; Rohde, M. F.: „Applications of in-source fragmentation of protein ions for direct sequence analysis by delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry“. *Analytical Chemistry* 70(20), **1998**, 4410-4416
- [83] Pfeifer, T.; Drewello, M.; Schierhorn, A.: „Using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer for combined in-source decay/post-source decay experiments“. *Journal Of Mass Spectrometry* 34(6), **1999**, 644-650
- [84] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Lemoine, J.: „Structure Analysis of Branched Oligosaccharides Using Post-source Decay in Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry“. *Journal of Mass Spectrometry* 30, **1995**, 782-787
- [85] Yamagaki, T.; Ishizuka, Y.; Kawabata, S.; Nakanishi, H.: „Analysis of glycosidic linkages in saccharide compounds by post-source decay fragment methods in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(5), **1997**, 527-31
- [86] Gross, J.; Leisner, A.; Hillenkamp, F.; Hahner, S.; Karas, M.; Schafer, J.; Lutzenkirchen, F.; Nordhoff, E.: „Investigations of the metastable decay of DNA under ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization conditions with post-source-decay analysis and hydrogen/deuterium exchange“. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 9(9), **1998**, 866-78
- [87] Jainhuknan, J.; Cassady, C. J. (Reprint Author): „Anion and Cation Post Source Decay Time of Flight Mass Spectrometry of Small Peptides: Substance P, Angiotensin II, And Renin Substrate“. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 10 (13), **1996**, 1678-1682
- [88] Shevchenko, A.; Chernushevich, I.; Ens, W.; Standing, K. G.; Thomson, B.; Wilm, M.; Mann, M.: „Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(9), **1997**, 1015-24
- [89] Bowdler, A. R.; Demetriades, N.; Humphrey, P.; Resch, M.: „Enhanced Post Source Decay (PSD) Fragmentation by the use of Collision Gases“. *ASMS 97*, **1997**
- [90] Qin, J.; Chait, B. T.: „Collision-induced dissociation of singly charged peptide ions in a matrix-assisted laser desorption ionization ion trap mass spectrometer“. *International Journal Of Mass Spectrometry* 191, **1999**, 313-320

- [91] Wolfender, J. L.; Chu, F. X.; Ball, H.; Wolfender, F.; Fainzilber, M.; Baldwin, M. A.; Burlingame, A. L.: „Identification of tyrosine sulfation in *Conus pennaceus* conotoxins alpha-PnIA and alpha-PnIB: Further investigation of labile sulfo- and phosphopeptides by electrospray, matrix- assisted laser desorption/ionization (MALDI) and atmospheric pressure MA“. *Journal of Mass Spectrometry* 34(4), **1999**, 447-454
- [92] Spengler, B.; Lützenkirchen, F.; Metzger, S. ; Chaurand, P.; Kaufmann, R.; Jeffery, W.; Bartlet-Jones, M. ; Pappin, D.J.C.: „Peptide Sequencing of Charged Derivatives by Postsource Decay MALDI Mass Spectrometry“. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 10, **1997**, 127-140
- [93] Price, W. D.; Schnier, P. D.; Williams, E. R.: „Binding Energies of the Proton Bound Amino Acid Dimers Gly * Gly, Ala * Ala, Gly * Ala, and Lys * Lys Measured by Blackbody Infrared Radiative Dissociation“. *Journal Of Physical Chemistry B* 101(4), **1997**, 664-673
- [94] Steenvoorden, R. J. J. M.; Breuker, K.; Zenobi, R.: „The gas-phase basicities of matrix-assisted laser desorption/ionization matrices“. *European Mass Spectrometry* 3 (5), **1997**, 339-346
- [95] Nold, M. J.; Cerda, B. A.; Wesdemiotis, C.: „Proton affinities of the N- and C-terminal segments arising upon the dissociation of the amide bond in protonated peptides.“. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 10(1), **1999**, 1-8
- [96] Harrison, A. G.: „The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides“. *Mass Spectrometry Reviews* 16, **1997**, 201-217
- [97] Baer, T.; Mayer, P. M.: „Statistical Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus Quasiequilibrium Theory Calculations in Mass Spectrometry“. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 8, **1996**, 103-115
- [98] Wehofsky, M.; Bahr, I.; Spengler, B.: „Discrimination of ions from fast decay reactions in MALDI-Postsource Decay by pulsed ion deflection“. *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando FL, May 31-June 4, 1998*.
- [99] Vekey, K.; Somogyi, A.; Wysocki, V.: „Average activation energies of low-energy fragmentation processes of protonated peptides determined by a new approach.“. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 10(8), **1996**, 911-8
- [100] Vekey, K.: „Role of internal energy in mass spectrometric fragmentation“. In: R.M. Caprioli et al. (eds.) *Selected Topics/Mass Spectrometry in the Biomolecular*, **1997**
- [101] Jensen, O. L.; Podtelejnikov, A.; Mann, M.: „Delayed Extraction Improves Specificity in Database Searches by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Peptide Maps“. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10, **1996**, 1371-1378
- [102] Hines, W. M.; Falick, A. M.; Burlingame, A. L.; Gibson, B. W.: „Pattern-Based Algorithm for Peptide Sequencing from Tandem High Energy Collision-Induced Dissociation Mass Spectra“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 3, **1991**, 326-336

- [103] Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates III, J. R.: „An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 5, **1994**, 976-989
- [104] Yates, John R.; Eng, J. K.; Clauser, K. R.; Burlingame, A. L.: „Search of Sequence Databases with Uninterpreted High-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 7, **1996**, 1089-1098
- [105] Scarberry, R. E.; Zhang, Z.; Knapp, D. R.: „Peptide Sequence Determination from High-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra Using Artificial Neural Networks“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 6, **1995**, 947-961
- [106] Van Dongen, W. D.; Ruijters, H. F. M.; Luinge, H. J.; Heerma, W. (Reprint Author): „Statistical Analysis of Mass Spectral Data Obtained from Singly Protonated Peptides Under High Energy Collision Induced Dissociation Conditions“. *Journal of Mass Spectrometry* 31(10), **1996**, 1156-1162
- [107] Chaurand, P.; Luetzenkirchen, F.; Spengler, B.: „Peptide and Protein Identification by MALDI and MALDI-PSD Time-of-Flight Mass Spectrometry“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 10, **1999**, 91-103.
- [108] Geno, P. W.; Macfarlane, R. D.: „Secondary Electron Emission Induced by Impact F Low-Velocity Molecular Ion On a Microchannel Plate“. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 92, **1989**, 195-210
- [109] Papayannopoulos, I. A.; Biemann, K.: „A Computer Program (COMPOST) for Predicting Mass Spectrometric Information from Known Amino Acid Sequences“. *Journal of American Society of Mass Spectrometry* 2, **1990**, 174-177
- [110] Spengler, B.: „PSD-MALDI Analysis of Peptides“. in: „Selected Topics and Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences“, R. M. Caprioli et al. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1997**, 377-398.
- [111] Metzger, S.: „Massenspektrometrische Analytik komplexer Peptidgemische“, Dissertation, Düsseldorf 2000.
- [112] Blom, Karl F.: „Elemental composition from moment analyses of the low-resolution isotope pattern“. *Organic Mass Spectrometry*. 23(3), **1988**, 194-203
- [113] She, J.; McKinney, M.; Petreas, M.; Stephens, R.: „Design and application of an isotope pattern calculator for Microsoft Windows“. *Organohalogen Compd.* 23, (Dioxin 95, 15th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds), **1995**, 171-4
- [114] Rockwood, A. L.: „Relationship of Fourier-Transforms to Isotope Distribution Calculations“. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 9(1), **1995**, 103-105
- [115] Rockwood, A. L.; VanOrden, S. L.: „Ultrahigh-speed calculation of isotope distributions“. *Analytical Chemistry* 68(13), **1996**, 2027-2030
- [116] Rockwood, A. L. ; VanOrden, S. L.; Smith, R. D.: „Ultrahigh resolution isotope distribution calculations“. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 10(1), **1996**, 54-59

-
- [117] Bronstein, I. N. ; Semendjajew, K. A.: *Taschenbuch der Mathematik* / Grosche, G.; Ziegler, V. (Hrsg.). 25. Aufl. Frankfurt/Main: Verlag Harri Deutsch, **1991**
- [118] Flad, T.; Spengler, B.; Kalbacher, H.; Brossart, P.; Baier, D.; Kaufmann, R.; Bold, P.; Metzger, S.; Meyer, H.; Kurz, B.; Müller, C. A.: „Direct Identification of MHC Class I-Bound Tumor-Associated Peptide Antigens of a Renal Carcinoma Cell Line by a Novel Mass Spectrometric Method“, *Cancer Research* 58, **1998**, 5803-5811
- [119] Jones, J. L.; Dongre, A. R.; Somogyi, A. ; Wysocki, V. H.: „Sequence Dependence of Peptide Fragmentation Efficiency Curves Determined by Electrospray Ionization/Surface-Induced Dissociation MassSpectrometry“. *Journal of American Chemical Society* 116, **1994**, 8363-8369. .
- [120] Jockusch, R. A. ; Schnier, P. D. ; Price, W. D. ; Strittmatter, E. F. ; Demirev, P. A. ; Williams, E.: „Effects of charge state on fragmentation pathways, dynamics, and activation energies of ubiquitin ions measured by blackbody infrared radiative dissociation.“. *Analytical Chemistry* 69(6), 55 **1997**, 1119-26. .
- [121] Hoffmann, R.; Metzger, S.; Spengler, B.; Otvos, Jr. L.: „Sequencing of Peptides Phosphorylated on Serines and Threonines by Post-Source Decay in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flighth Mass Spectrometry“, *Journal of Mass Spectrometry* 34, **1999**, 1195-1204.
- [122] Protagen: www.protagen.de<http://www.protagen.de/>

Abbildungen

Bild 2-1: Schematischer Aufbau eines Flugzeit-Massenspektrometers. In diesem Beispiel dient ein Laserpuls zur Ionisierung und zum Start der Zeitmessung.....	13
Bild 2-2: (a) Einbau der Analyt-Moleküle in den Matrix-Kristall. (b) Desorption eines Clusters aus Matrix- und Analyt-Molekülen durch den Laserpuls	16
Bild 2-3: Funktionsweise einer Ionenlinse. (a) Flugzeit-Massenspektrometer ohne und (b) mit Ionen-Fokussierung in der Quelle	18
Bild 2-4: Funktionsweise der verzögerten Ionen-Extraktion	18
Bild 2-5: Aufbau eines Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometers mit dem schematisch angedeuteten Flugbahnen der Ionen.	20
Bild 2-6: Auftrennung der PSD-Fragment-Ionen in einem zweistufigen Reflektor. Ionen mit einer kinetischen Energie kleiner als eU_1 werden nicht aufgelöst, während Ionen mit Energien zwischen eU_1 und eU_2 aufgelöst werden können (nach [53]).	21
Bild 2-7: Prinzipielle Funktionsweise eines Ion-Gate. (a) Flugbahn eines leichten Ions B, welches abgelenkt wird, und eines schweren Ions A, das durchgelassen wird. (b) Zeitlicher Verlauf der Spannung U_{Gate}	23
Bild 2-8: Aufbau eines Ion-Gate. Die Drähte liegen alternierend auf einer positiven (+) oder negativen Spannung. Für Ion B sind die Spannungen eingeschaltet, so daß das Ion abgelenkt wird. Bei Ion A sind beide Spannungen auf 0V, so daß Ion A nicht abgelenkt wird.....	24
Bild 2-9: Blockschema der Datenaufnahme [55].	24
Bild 2-10: Schematischer Aufbau der Peptid-Bindung	26
Bild 2-11: Zerfallsmodell mit einer Beispiel-Reaktion aus drei Fragmenten B, C und D und dem Mutter-Ion A. Die Raten sind für alle Reaktionswege gleich groß ($k = 30000 / \text{s}$) (aus [98])	33
Bild 3-1: Bildschirmausschnitt der Benutzeroberfläche des Programms ISOCONV.....	40
Bild 3-2: Schematische Darstellung der Peak-Identifikation. Der Peak muß auf der Halbwertshöhe die grauen Balken berühren, damit die Auflösung im zulässigen Bereich liegt.	43
Bild 4-1: Transmission des Lasers hinter dem Abschwächer als Energiedichte (J/cm^2) für einen geschätzten Fokus-Durchmesser von $100 \mu\text{m}$ und als absolute Energie (rechte Achse)	46
Bild 4-2: Abhängigkeit der Signalintensität von der relativen Energiedichte. (a) Anteil der neutralen Fragmente an der Gesamtintensität, für das Peptid AIGEFYGR-OH ($(\text{M}+\text{H})^+ = 954,5 \text{ u}$). (b) Relative Intensitäten der Einzelsignale von Molekül-Ion ($(\text{M}+\text{H})^+$) und neutralen Fragmenten (M^0).....	48
Bild 4-3: Vergleich des PSD Fragment-Ionen-Spektrums von Substanz P bei den Matrices 4HCCA (oben) und DHB (unten). Die relativen Bestrahlungsstärken sind bei beiden Messungen ähnlich.....	50
Bild 4-4: PSD Fragment-Ionen-Spektrum von Substanz P mit 4HCCA als Matrix. Die relative Energiedichte des Lasers liegt bei (a) 2,7, (b) 1,6 und (c) 1,2 über der Schwelle.	52

Bild 4-5: Relative Intensitäten der verschiedenen Fragment-Typen bei Substanz P an den spezifischen Aminosäure-Positionen. Dargestellt sind die a-, b- und y-Ionen.....	52
Bild 4-6: Anzahl der Aminosäure-Kombinationen (Summenformeln) pro 0,05 u Massenintervall im Massenbereich von (a) 600 u bis 1100 u und (b) 800 u bis 810 u. In (a) ist eine periodische Modulation von 14 u zu sehen. Die Peptidmassen sind in Clustern gruppiert (b).....	59
Bild 4-7: Breite der Cluster (95 % Bereich) für theoretische Aminosäure-Kombinationen abhängig von der nominalen Masse des Clusters	61
Bild 4-8: Anzahl der Aminosäure-Kombinationen. Vergleich zwischen exakter Bestimmung mit Hilfe kombinatorischen Abzählens und Extrapolation mit Gausschen Normalverteilungen der Cluster.	62
Bild 4-9: Verhältnis der Intensitäten des zweiten und ersten Isotopen-Signals für alle Aminosäure-Kombinationen im Massenintervall 999 u – 1001 u Als Funktion der Masse (a). Jedes Kreuz stellt mindestens eine Aminosäure-Kombination dar. In (b) ist die Anzahl der Aminosäure-Kombinationen pro 0,1% Intensitätsintervall für den Cluster zwischen 1000 u und 1001 u aufgetragen.	63
Bild 4-10: Häufigkeitsverteilung der relativen Intensitäten des 2., 3. und 4. Isotopenpeaks aller theoretischen Aminosäure-Kombinationen bei einer nominalen Masse von (a) 1000 u mit einer Intervall-Breite von 0,1 % und (b) 700 u bei einer Intervall-Breite von 0,5 %	64
Bild 4-11: Die gemittelten Intensitäten und Standardabweichungen des zweiten und dritten Isotopenpeaks, relativ zum ersten Isotopenpeak als Funktion der Masse. Die Werte wurden über alle theoretisch möglichen Aminosäure-Kombinationen im Massenintervall 350 u bis 1100 u berechnet. Der gesamte Intensitätsbereich, der erreicht wird, ist grau unterlegt.....	65
Bild 4-12: Massenabhängigkeit der relativen Intensitäten der Isotopenpeaks aus einer zufälligen Auswahl von $1,5 \cdot 10^6$ Sequenzen. Die Darstellung erfolgt in doppelt logarithmischer Form.	67
Bild 4-13: Vergleich der kombinatorisch bestimmten Isotopenmuster (inkl. Standardabweichung) mit dem Mittelwert aus zufällig bestimmten Sequenzen.....	68
Bild 4-14: Häufigkeitsverteilung der Intensitäten pro 0,5 % Intervall des 3. Isotopenpeaks bei 1000 u, klassifiziert nach der Anzahl der Schwefelatome.....	73
Bild 4-15: Intensitäten des 2. und 3. Isotopenpeaks relativ zum monoisotopischen Peak für alle theoretischen Aminosäure-Kombinationen im Massenintervall 1000 u – 1001 u als Funktion der Masse. Die Graustufen kennzeichnen die Anzahl der Schwefelatome in den Aminosäure-Kombinationen.	75
Bild 4-16: Die Abhängigkeit nach Schwefelgehalt klassifizierter Isotopenpeaks von der Masse. Gezeigt werden der 2., 3. und 4. Isotopenpeak für je 0-3 Schwefelatome.....	77
Bild 4-17: Der Exponent der Potenz-Extrapolation ändert sich mit der Anzahl der Schwefelatome.....	77
Bild 4-18: Vergleich der Isotopenmuster von zwei Peptiden ähnlicher Masse. Oben: Peptid ohne Schwefelatome; Unten: Peptid mit 2 Schwefelatomen.....	79
Bild 4-19: Schematische Darstellung der Berechnung der Abweichung. Die Fläche der hellen Balken wird summiert und sollte minimal sein	80
Bild 4-20: Abweichung des gemessenen Isotopenmusters von den gemittelten Mustern, für Peptide mit 0 bis 3 Schwefelatomen. (a) EEKGQETIIQ-NH ₂ , (M+H) ⁺ = 1173,61 u (M25SL9), (b) RPKPQQFFGLM-NH ₂ , (Substanz P) (M+H) ⁺ = 1347,74 u, (c) CTMVNIHIKI-NH ₂ , (M+H) ⁺ = 1170,65 u (M27SL9), (d) TRDYMMHMDP-NH ₂ , (M+H) ⁺ = 1295,53 u (M13SL9).....	82

- Bild 4-21: Verteilung der Differenz D zwischen tatsächlicher Anzahl an Schwefelatomen und Muster mit geringster Abweichung. (a) Alle Peptide (151), (b) unterschieden nach Schwefelgehalt und (c) unterschieden nach Masse..... 83
- Bild 4-22: Schematischer Ablauf des Entfaltungsalgorithmus für den idealisierten Fall, daß alle Datenpunkte genau eine Masseneinheit voneinander entfernt sind und kein Untergrundrauschen vorliegt. (Erklärung im Text) 88
- Bild 4-23: Schematische Darstellung der Behandlung von Schwankungen des Isotopenmusters. Es lassen sich vier Fälle unterscheiden: (a) $I_M + \Delta I < I_g$, (b) $I_M < I_g < I_M + \Delta I$, (c) $I_M - \Delta I < I_g < I_M$ und (d) $I_g < I_M - \Delta I$. Dabei sind I_M die gemittelte Isotopen-Intensität, ΔI die absolute Schwankung der Intensität und I_g die gemessene Isotopen-Intensität (Rest nach Bearbeitung der vorigen Kanäle). 89
- Bild 4-24: (a) Bestimmen der Intensität des Signals bei einer exakten Masse M aus den diskreten Datenkanälen $k-1$ und k . (b) Umkehrung, bei der die abziehende Intensität der Kanäle aus der Intensität bei der Masse M bestimmt wird. 91
- Bild 4-25: Wirkungsweise des gleitenden Untergrundabzugs. (a) experimentelles Spektrum von Melittin, (b) Abzug des Minimums von ± 20 Kanälen (± 3 u) und (c) Abzug des Minimums von ± 7 Kanälen (± 1 u) 92
- Bild 4-26: MALDI-TOF Massenspektrum von Substanz P mit DHB als Matrix und in Gegenwart von Natrium- und Kalium-Ionen. (a) Originalspektrum (Rohdaten) und (b) das entfaltete Spektrum. Parameter zur Entfaltung: Fehler 20 % + $(I-2) * 20$ % (I = Nummer des Isotops). Untergrundintervall ± 50 Kanäle 93
- Bild 4-27: Entfaltung einer Mischung aus drei Peptiden (Substanz P (1347,74 u), Angiotensinogen (1758,93 u), Melittin (2845,76 u)). (a) Experimentelles MALDI-Massenspektrum, (b) Entfaltetes Spektrum mit markierten Peaks, (c) Massenbereich von Substanz P (oben) und Angiotensinogen (unten) mit markierten Peaks im experimentellen und (d) Massenbereich von Substanz P und Angiotensinogen im gefilterten Spektrum 94
- Bild 4-28: Verschiedene Peak-Klassen, die durch unterschiedliche Parameter bei der Entfaltung des Peptids EEKGQETIIQ-NH₂ ($(M+H)^+ = 1173,61$ u) entstehen. Die Buchstaben neben den Peaks werden in Tabelle 4-18 verwendet..... 97
- Bild 4-29: Entfaltung mit klassifizierten Isotopenmustern. (a) Peptid ohne Schwefelatome, (b) Peptid mit 1 Schwefelatom und (c) mit 2 Schwefelatomen 98
- Bild 4-30: Relative Intensitäten der mit klassifizierten Isotopenmustern entfalteten monoisotopischen Peaks für drei Peptide mit 0, 1, 2 Schwefelatomen (EEKGQETIIQ-NH₂ ; $(M+H)^+ = 1173,6$ u; EHHQCYKYYV-NH₂; $(M+H)^+ = 1368,6$ u und CTMVNLHIKI-NH₂; $(M+H)^+ = 1170,6$ u) abhängig von der Schwefelklasse..... 99
- Bild 4-31: MALDI-TOF Massenspektrum einer komplexen MHC-Peptidmischung von humanen Nieren-Karzinom-Zellen. (a) experimentelles Spektrum, (b) gefiltertes Spektrum..... 100
- Bild 4-32: Entfaltung eines komplexen Peptid-Gemisches aus MHC-Peptiden. (a) Übersichtsspektrum, und Ausschnitt im Bereich 1100 u (b) entfaltet und (c) experimentelles MALDI-Spektrum 101
- Bild 4-33: Ausschnitt aus dem entfalteten Spektrum eines Fragment-Ionen-Spektrum eines Peptids (GAKAVGEAKAAV-OH) $(M+H)^+ = 1071,62$ u 102

Bild 4-34: Entfaltung eines MALDI-PSD Massenspektrums eines Peptids (CTMVNLHIKI-NH ₂ ; (M+H) ⁺ = 1170,6 u) mit verschiedenen gemittelten Isotopenmustern.....	103
Bild 4-35: MALDI-Übersichts-Spektrum des Verdaus (Chymotrypsin) von COX 3 (Cytochrome C Oxidase III). Oben experimentelles Spektrum, unten entfaltetes Spektrum. Die Peptide des Eigenverdaus sind mit E, die COX 3 Fragmente mit COX gekennzeichnet.	105
Bild 4-36: MALDI-PSD Massenspektrum des Peptids (M+H) ⁺ = 1177.6 u, (HVMNPSPWPL-OH). Oben experimentelles Spektrum, unten entfaltetes Spektrum.....	106
Bild 4-37: Behandlung des Isotopenmusters bei verschiedenen Ladungen. (a) Das gemessene Molekül-Ion ist 1-fach, das gemittelte 2-fach geladen; (b) das gemessene Molekül-Ion ist 2-fach, das gemittelte 1-fach geladen.	107
Bild 4-38: Programm-Ablauf-Plan (PAP) bei der Entfaltung von ESI-Spektren mit mehreren Ladungen.	109
Bild 4-39: (a) ESI-Massenspektrum einer Mischung aus den Peptiden Angiotensinogen (1-14) (porcine) ((M+H) ⁺ = 1758,92 u) und Melittin ((M+H) ⁺ = 2845,76 u). (b) Entfaltetes ESI-Massenspektrum von Angiotensinogen (1-14) und Melittin. Die weiteren Peaks können als Fragmente von Angiotensinogen (1-14) erklärt werden. Als höchste Ladung wurde q=5 angenommen. Die Schwankung der Isotopenmuster beträgt 20%*(I-1), (c) Ausschnitt aus dem entfaltetem Massenspektrum	111
Bild 4-40: Vergleich der Ladungen, die aus dem ESI-Massenspektrum von Angiotensinogen (1-14) und Melittin entfaltet wurden. Außer dem Spektrum für q = 3 sind alle Spektren überhöht dargestellt.	112
Bild 4-41: Querempfindlichkeit des 2-fach geladenen Ions von Angiotensinogen (1-14) (porcine) (m/z = 879,9 u) bei der Interpretation als 5, 4, 3, 2 und 1-fach geladenes Ion. (a) mit Berücksichtigung der Steigung an dem aktuellen Datenkanal und den Isotopensignalen und (b) ohne Berücksichtigung der Steigungen.	113
Bild 4-42: ESI-Massenspektrum von Insulin	114
Bild 4-43: Entfaltetes ESI-Massenspektrum von Insulin. Die maximale Ladung beträgt q _{Max} =6. Die Einzelspektren der Ladungen wurden anschließend addiert.	115
Bild 4-44: ESI-Massenspektrum von Insulin entfaltet mit q _{Max} = 7. Darstellung der Einzelspektren der Ladungen.	116
Bild 4-45: Produkt der Einzelspektren der Ladung von Insulin von je zwei benachbarten Ladungszuständen: Q = 7x6, 6x5, 5x4 und 4x3	116
Bild 4-46: Summe der Produktspektren benachbarter Ladungen aus Bild 4-45. Der kleine Ausschnitt zeigt den Bereich des monoisotopischen Peaks von Insulin bei (M+H) ⁺ = 5804,7 u	117
Bild 4-47: ESI-Massenspektrum mit der Hypermass-Routine rekonstruiert.....	118
Bild 4-48: Entfaltete ESI-Fragment-Ionen-Massenspektren von Angiotensinogen (1-14). (a) 2-fach geladenes Mutter-Ion m/z = 880,1 u, (b) 3-fach geladenes Mutter-Ion m/z = 586,9 u und (c) 4-fach geladenes Mutter-Ion m/z = 440,0 u	119
Bild 4-49: Entfaltete ESI-Fragment-Ionen-Spektren von Melittin. (a) 4-fach geladenes Mutter-Ion, (b) 3-fach geladenes Mutter-Ion	122
Bild 4-50: Einzelspektren der Ladungen der ESI-Fragment-Ionen-Spektren der 3-fach und 4-fach geladenen Mutter-Ionen von Melittin	123

- Bild 4-51: ESI-Massenspektren vom (a) amidierten Peptid RRLIEDAEYAARG-NH₂ und (b) hydroxylierten Peptid RRLIEDAEYAARG-OH..... 125
- Bild 4-52: Entfaltung eines ESI-Spektrums des amidierten Peptids (A1-NH₂). (a) Überblick-Spektrum, (b) Ausschnitt des 3-fach geladenen Molekül-Ions im Original Spektrum und (c) Ausschnitt des Molekül-Ions im entfalteten Spektrum. 125
- Bild 4-53: Entfaltung eines ESI-Spektrums des hydroxylierten Peptids (A1-OH). (a) Überblick-Spektrum, (b) Ausschnitt des 3-fach geladenen Molekül-Ions im Originalspektrum und (c) Ausschnitt des Molekül-Ions im entfalteten Spektrum. 126
- Bild 4-54: Entfaltung eines ESI-Spektrums einer Mischung aus amidierten Peptid (A1-NH₂) und hydroxylierten Peptid (A1-OH). (a) Überblick-Spektrum, (b) Ausschnitt des 3-fach geladenen Molekül-Ions im Originalspektrum und (c) Ausschnitt des Molekül-Ions im entfalteten Spektrum. .. 127
- Bild 4-55: Ausschnitt der Arginin-Verluste aus der Mischung von A1-Amid und A1-Säure..... 128
- Bild 4-56: Variation des Mischungsverhältnisses von A9-Amid und A9-Säure im ESI-MS gemessen. Der Anteil des Amids nimmt von oben nach unten ab 130
- Bild 4-57: Relative Intensitäten von Säure zu Amid des A9-Peptids im MALDI-MS (Kreise) und im ESI-MS (Quadrate). Die Geraden sind Ausgleichsgeraden..... 131
- Bild 4-58: Funktionsweise des Ion-Gate bei einem Peptid-Gemisch. (a) Übersicht-Spektrum, (b) Ion-Gate bei $T_{\text{Delay}} = (5020+100)$ ns geöffnet. Die gestrichelten Linien geben den durchgelassenen Massenbereich an 134
- Bild 4-59: Schematischer Verlauf des Delay-Pulses eines Ion-Gate..... 135
- Bild 4-60: Transmissions-Profile bei verschiedenen Massen. (a) Substanz P, (b) Melittin. 136
- Bild 4-61: Massenbereiche in Abhängigkeit von der Delay-Zeit. Die Balken stellen den bei jeder Delay-Zeit durchgelassenen Massenbereich dar. 137
- Bild 4-62: Vergleich des Übersichtsspektrums (a) und des Scans der stabilen Ionen (b) von einem komplexen Peptid-Gemisch (Parameter: Delay-Zeit von 3800 ns bis 6740 ns, Schrittweite 20 ns, Breite des Ion-Gate 100 ns)..... 138
- Bild 4-63: (a) MALDI-MS Übersicht-Spektrum einer Mischung aus 10 Peptiden (siehe Tabelle 4-29), (b) Scan der stabilen Ionen. 140
- Bild 4-64: Korrelation des Signals bei 1045,6 u (stabile Masse) mit einem stabilen Ion in einer Mischung aus 10 Peptiden..... 141
- Bild 4-65: Scan der Peptid-Mischung nach einer Abspaltung eines C-terminalen Prolin ($M+H - 114$ u). Die Prozentwerte an den Peaks geben die relative Intensität des Fragment-Ions zum Mutter-Ion an 141
- Bild 4-66: Korrelation des Signals bei 1502 u (stabile Masse) zu den stabilen Ionen. (a) Intensität des Fragments und (b) Intensität des stabilen Ions. 143
- Bild 4-67: Vergleich zwischen Übersichtsspektrum und Scan der stabilen Massen. (a) Übersicht-Spektrum eines phosphorylierten Peptids $(M+H)^+ = 1598,8$ u, RRLIEDAEYAARG-NH₂ und (b) Scan der stabilen Massen (Parameter: Schrittweite 40 ns, Breite des Intervalls 100 ns). Korrelation der im Scan unterdrückten Signale. Aufgetragen ist die Intensität des Mutter-Ions.. Stabile Masse der Fragmente bei (c) 1486 u, (d) 1502 u und (e) 1520 u 143

Anhang: Liste der Peptide

Nr.	Name	Sequenz	Monoisotop. Masse (M+H) ⁺
1	M1 SL9	ENYHRCEVDK-NH2	1291,59
2	M2 SL9	THKGMAPIKS-NH2	1068,60
3	M3 SL9	HCGQVNPVTW-NH2	1139,54
4	M4 SL9	RNRYDHNSGK-NH2	1245,62
5	M5 SL9	CDQEMEQRMC-NH2	
6	M6 SL9	MSEPLSHQCT-NH2	1131,50
7	M7 SL9	EEKITQPNGC-NH2	1117,53
8	M8 SL9	IIQGTLWKCP-NH2	1157,66
9	M9 SL9	FWFAQLQSIF-NH2	1285,69
10	M10 SL9	RKFNDGHTMY-NH2	1267,60
11	M11 SL9	LGNLNHWWEI-NH2	1280,68
12	M12 SL9	YQDWHAYYNE-NH2	1387,57
13	M13 SL9	TRDYMMHMDP-NH2	1295,53
14	M14 SL9	CWPCKQMWSM-NH2	1298,53
15	M15 SL9	TERQHEWLEC-NH2	1329,61
16	M16 SL9	ELCLHHGIYT-NH2	1184,61
17	M17 SL9	WYWQTVASRH-NH2	1332,66
18	M18 SL9	VCMTNWDCCH-NH2	1210,43
19	M19 SL9	KKNTFQYKMG-NH2	1243,66
20	M20 SL9	MQNVPLYLTDI-NH2	1192,61
21	M22 SL9	PWMIMNHCPI-NH2	1240,58
22	M23 SL9	DQKNQVTDDW-NH2	1247,57
23	M24 SL9	EWPVKFRQDT-NH2	1304,68
24	M25 SL9	EEKGQETIIQ-NH2	1173,61
25	M26 SL9	EHHQCYKYYV-NH2	1368,62
26	M27 SL9	CTMVNLHIKI-NH2	1170,65
27	M28 SL9	MYDDPNCSVP-NH2	1139,45

Nr.	Name	Sequenz	Monoisotop. Masse (M+H) ⁺
28	M29 SL9	FCRMPMWCMF-NH2	1350,54
29	M30 SL9	SQPDNYWWMM-NH2	1356,55
30	M31 SL9	FFVAQWDVSK-NH2	1225,64
31	M32 SL9	LNKQKENNCE-NH2	1218,60
32	M33 SL9	NPDHSTTICQ-NH2	1114,49
33	M34 SL9	AWLFNRHVCA-NH2	1215,63
34	M35 SL9	DMALQLTFTG-NH2	1095,57
35	M36 SL9	LSCADNEVRE-NH2	1134,53
36	M37 SL9	MHMTTLVFWQ-NH2	1292,64
37	M38 SL9	MKHSNMDKHN-NH2	1240,57
38	M39 SL9	IFAMITAHGP-NH2	1056,57
39	M40 SL9	EQSQHTCLMS-NH2	1162,51
40	M41 SL9	QGSNDCIYME-NH2	1158,46
41	M42 SL9	HDGWHISKKM-NH2	1237,63
42	M43 SL9	DTNSMGIPSG-NH2	977,44
43	M44 SL9	DYTVDIGNGC-NH2	1055,45
44	M45 SL9	TKSHWFMRCR-NH2	1350,67
45	M47 SL9	YNVILYLEIH-NH2	1122,47
46	M48 SL9	SCGMCHKVMQ-NH2	1347,69
47	M49 SL9	WECVRNWRS�-NH2	1188,71
48	M50 SL9	VLGTQMRKTR-NH2	1101,52
49	M51 SL9	WYQFKCNMLW-NH2	1417,67
50	M52 SL9	SWTERTWSRY-NH2	1370,66
51	M53 SL9	PESEPELLKD-NH2	1155,61
52	M54 SL9	QASAYHVWGH-NH2	1154,55
53	M55 SL9	GVQISDHYIK-NH2	1158,63
54	M56 SL9	CTMVNIHIKI-NH2	1170,65
55	M57 SL9	GVKLSSDEMNI-NH2	1078,53
56	M58 SL9	FKPHFIWNIA-NH2	1271,71
57	M59 SL9	VQRFEGKWNA-NH2	1233,65

Nr.	Name	Sequenz	Monoisotop. Masse (M+H) ⁺
58	M60 SL9	MFPCSSIKRD-NH2	1182,58
59	Synth. Peptid M1	AICVEYGR-NH2	909,45
60	Synth. Peptid M2	ACIVYEGR-NH2	909,45
61	Synth. Peptid M3	LRGEATSYFL-NH2	1155,62
62	Synth. Peptid M4	LRGEACSYFL-NH2	1157,59
63	Synth. Peptid M5	AIEAFYGR-NH2	925,48
64	Synth. Peptid M6	AIAEFYGR-NH2	925,48
65	Synth. Peptid M7	AINAFGYR-NH2	910,48
66	Synth. Peptid M8	AIANFGYR-NH2	910,48
67	Synth. Peptid M9	RAINAFGY-NH2	910,48
68	Synth. Peptid M10	RAIANFGY-NH2	910,48
69	Synth. Peptid M11	LRWGATCYFL-NH2	1228,64
70	Synth. Peptid M12	LRGWATYCFL-NH2	1228,64
71	Synth. Peptid M13	LRGAWTYCFL-NH2	1228,64
72	Synth. Peptid M14	AIWVEYGR-NH2	992,52
73	Synth. Peptid M15	RAIWVEYG-NH2	992,52
74	Synth. Peptid M16	WAIVEYGR-NH2	992,52
75	Synth. Peptid M17	AIVEYGRW-NH2	992,52
76	Synth. Peptid M18	EAIAFGYR-NH2	925,48
77	Synth. Peptid M19	AIAFGYRE-NH2	925,48
78	A1	RRLIEDAEYAARG-NH2	1518,80
79	A5	RRLIEDAESAARG-NH2	1442,80
80	A6	RRLIEDAETAARG-NH2	1456,80
82	RK-1	LPRATSYFL-OH	1067,59
83	RK-2	LPGRATSYFL-OH	1124,63
84	RK-3	LATPRSYFL-OH	1067,59
85	RK-4	LATPGRTSYFL-OH	1225,65
86	RK-5	LATSYPRFL-OH	1067,59
87	RK-6	LATSYPGRFL-OH	1124,63
88	RK-7	LRPATSYFL-OH	1067,59

Nr.	Name	Sequenz	Monoisotop. Masse (M+H) ⁺
89	RK-8	LRGPATSYFL-OH	1124,61
90	RK9-3	LARPTSYFL-OH	1067,59
91	RK9(5)	LAHPTSYFL-OH	1048,55
92	Koehrer Peptid AD	AIADFYGR-OH	912,46
93	Koehrer Peptid DA	AIDAFYGR-OH	912,46
94	Koehrer Peptid MP	AIMPFYGR-OH	954,49
95	Koehrer Peptid PM	AIPMFYGR-OH	954,49
96	Koehrer Peptid VS	AIVSFYGR-OH	912,49
97	Koehrer Peptid SV	AISVFYGR-OH	912,49
98	Koehrer Peptid DL	AIDLFYGR-OH	954,50
99	Koehrer Peptid LD	AILDFYGR-OH	954,50
100	Koehrer Peptid GE	AIGEFYGR-OH	912,46
101	Koehrer Peptid EG	AIEGFYGR-OH	912,46
102	Koehrer Peptid NN	AINNFYGR-OH	954,48
103	synth. Peptide I	GAKAVGEAKAAG-OH	1029,57
104	synth. Peptide II	LAKAVGEAKAAG-OH	1085,63
105	synth. Peptide III	GAKAVGEAKAAL-OH	1085,63
106	synth. Peptide IV	GAKAVGEAKAAA-OH	1043,59
107	synth. Peptide V	GAKAVGEAKAAV-OH	1071,62
108	Anti-Inflammatory Peptide 2	HDMNKVLDL-OH	1084,57
109	Met-Lys-Bradykinin	MKRPPGFSPFR-OH	1319,71
110	Dynorphin 1-9	YGGFLRRIR-OH	1137,66
111	Enkephalin-Met	YGGFM-OH	574,23
112	Leu-enkephalin	YGGFL-OH	556,28
113	Demorphin	YAFGYPS-NH ₂	803,36
114	D-Ala ² Deltorphin I	YAFDVVG-NH ₂	769,39
115	synth. Peptid GRGDSPK	GRGDSPK-OH	716,37
116	synth. Peptid GRGD	GRGD-OH	404,19
117	synth. Peptid GRGDS	GRGDS-OH	491,22
118	Deltorphin II	YAFEVVG-NH ₂	783,40

Nr.	Name	Sequenz	Monoisotop. Masse (M+H) ⁺
119	Dynorphin 1-13	YGGFLRRIRPKLK-OH	1603,99
120	Allatostatin III	GGSLYSFGL-NH ₂	899,49
121	[Val ⁵]-Angiotensin I	DRVYVHPFHL-OH	1282,68
122	Substance P	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1347,736
123	Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	2845,76
124	Angiotensinogen (1-14) (porcine)	DRVYIHPFLLVYS-OH	1758,93