

Massenspektrometrisches Fragmentierungsverhalten
oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren
und
ihr Nutzen für die Proteomforschung

I n 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 Universität zu Köln

vorgelegt von

Davor Turkovic
aus Nürnberg

Köln 2009

Berichterstatter:

Prof. Dr. Axel G. Griesbeck

Prof. Dr. Günter Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07. 2009

meinem Neffen Niklas und meiner Nichte Emma

„Es ist vollbracht!“

Joh 19,30

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Axel G. Griesbeck danke ich für die Übernahme des Erstreferats, die konstruktiven Gespräche und die nützlichen Tips und Ideen.

Herrn Prof. Dr. Günter Schwarz danke ich für die Übernahme des Zweitreferats.

Herrn Dr. Axel Römer von der Firma A&M GmbH danke ich für die Betreuung und den nötigen Drill, der mich stets veranlasst hat mich weiter zu entwickeln und meine Arbeitsweise zu verbessern.

Herrn Dr. Lejon Martens von der Firma A&M STABTEST danke ich für die Co-Betreuung der Arbeit, die Einweisung in die Massenspektrometrie und die Vermittlung der Kunst des analytischen Denkens.

Herrn Dr. Hans J. Diehl danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Finanzierung meiner Promotion.

Meinen Kolleginnen und Kollegen bei A&M STABTEST danke ich für die nette und freundliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich **Antje Heil, Björn Hoffmann, Mary Pasler** und **Stefanie Honvehlmann** für Hilfestellungen im Labor, die schöne Zeit, die erholsamen Pausen, die Spaziergänge und die Ausflüge zu McDonalds.

Andrea Hunold, Birthe Kortner, Daniel Fielitz, Jonas Wiebke und **Jutta Schütte** danke ich für die Hilfe bei der Literatursuche und die Korrekturen meiner Arbeit. Ich danke euch, **Heiko Baag** und **Kristina Hackelöer** für eure Freundschaft, für die Zuversicht immer auf euch zählen zu können, die moralische Unterstützung, die Ablenkung wenn ich sie nötig hatte und die schönen Stunden, die ich mit euch verbringen durfte. Ihr seid die besten Freunde, die man sich wünschen kann.

Meiner Familie, insbesondere meiner Schwester und meinem Schwager **Romina** und **Roland Gurt**, danke ich für den Halt, den Glauben an mich und die Gewissheit nie alleine zu sein.

Abkürzungsverzeichnis

18-Krone-6	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooktadekan
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ACN	Acetonitril
äq.	Äquivalent
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrosprayionisation
GluC	Staphylococcus aureus Endotroproteinase V8
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GS(O)SG	Glutathion-S-Oxid
G-SO₃H	Glutathion-Sulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HX	Hypoxanthin
IAA	2-Iodacetamid
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
IT	Ion trap (Ionenfalle)
LC	Liquid chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LysC	Lysylendotroproteinase
M	Molar
mCPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
Met	Methionin
Met(O)	Methioninsulfoxid

MS	Massenspektrometer
m/z-Verhältnis	Masse zu Ladungs-Verhältnis
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
PeOH	Pentanol
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SOP	Standard operation protocol (Standardarbeitsanweisung)
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Th	Thompson (massenspektrometrische Einheit: 1 Th = 1 Da / z)
TOC	total organic carbon (absoluter organischer Kohlenstoff)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UA	uric acid (Harnsäure)
UV	Ultraviolett
Vis	Visible (sichtbar)
XO	Xanthinoxidase
z	Ladung

Abstract

The growing market of protein-based drugs leads to a growing demand of analytical methods for the elucidation of protein structures and age-related damages. The aim of this work is to establish new analytical methods, which can be applied by industrial routine protein analysis. The work focuses on the modification and the detection of the sulfur-containing amino acids, as well as the characterization of disulfide bonds, which is a major objective of proteomic research. Based on LC-MS/MS techniques, the analytical methods developed in this work are suitable for the qualitative and quantitative determination of methionine and cysteine by mass spectrometry. For this, oxidation experiments are performed to selectively oxidize and detect the amino acids. The procedure facilitates the clarification of unknown peptides, gained from standard analytical procedures like *peptide mapping*. For the elucidation of intramolecular linkages in proteins and peptides a new timesaving way was found to detect disulfide bridges with mass spectrometric methods. The disulfide is oxidized fast and efficiently by a suitable oxidizing agent to the corresponding monoxide, which can be detected by fragmentation experiments in ion trap mass spectrometers. The result is a cleavage of the sulfur-sulfur bond, leading to ions of the formerly connected peptides in which the modified cysteine easily can be detected. Thus, methods for the clarification of primary and tertiary protein structures under economical aspects are developed, optimized and established.

Kurzzusammenfassung

Der wachsende Markt an Arzneistoffen auf Proteinbasis führt zu einem wachsenden Bedarf an analytischen Methoden, die zur Aufklärung der Proteinstruktur und auftretenden alterungsbedingten Schäden beitragen. Ziel dieser Arbeit ist es, Methoden zu entwickeln, die in der industriellen Protein-Routineanalytik Anwendung finden können. Im Fokus stehen die Veränderung und der Nachweis der schwefelhaltigen Aminosäuren sowie die Identifizierung von Disulfidbrücken, die für die Proteomforschung von besonderer Relevanz ist. Durch die in der vorliegenden Arbeit entwickelten, auf LC-MS/MS basierenden Analysemethoden, können die Aminosäuren Methionin und Cystein massenspektrometrisch sicher qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Hierzu werden Oxidationsversuche durchgeführt, mit denen die Aminosäuren selektiv oxidiert und nachweisbar gemacht werden. Das Verfahren erleichtert die Aufklärung unbekannter Peptide, die durch analytische Standardverfahren wie dem *Peptide Mapping* erhalten werden. Für die Charakterisierung intramolekularer Verknüpfungen wird ein Weg aufgezeigt mit dem sich Disulfidbrücken massenspektrometrisch mit geringem Zeitaufwand aufklären lassen. Dabei wird das Disulfid durch die Wahl eines geeigneten Oxidationsmittels schnell und effizient ins Monooxid überführt, das durch Fragmentierungsexperimente im Ionenfallen-Massenspektrometer sicher nachgewiesen werden kann. Das Ergebnis ist ein Bruch der Schwefel-Schwefel-Bindung, der Ionen der ehemals verknüpften Peptide liefert, in denen das oxidierte Cystein eindeutig identifiziert werden kann. Vorgestellt werden die Entwicklung, Optimierung und Etablierung von Methoden, die unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten zur Aufklärung der Primär- und Tertiärstruktur von Proteinen verwendet werden können.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Oxidativer Stress an Aminosäuren und Proteinen.....	13
1.2	Bedarf an analytischen Methoden zum Nachweis von Schäden und zur Aufklärung von Proteinstrukturen.....	16
1.3	Methoden der Proteinanalytik	18
1.3.1	Chromatographie.....	18
1.3.1.1	Gelfiltration.....	19
1.3.1.2	Ionenaustauschchromatographie.....	19
1.3.1.3	Umkehrphasenchromatographie	19
1.3.1.4	Affinitätschromatographie	20
1.3.1.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	20
1.3.2	Optische Spektroskopie.....	21
1.3.2.1	UV/Vis-Spektroskopie.....	21
1.3.2.2	Fluoreszenzspektroskopie	21
1.3.2.3	IR-/Raman-Spektroskopie.....	21
1.3.2.4	Röntgenstrukturanalyse	22
1.3.2.5	NMR-Spektroskopie.....	22
1.3.3	Bioinformatik	22
1.3.4	Elektrophoretische Techniken	23
1.3.4.1	Isoelektrische Fokussierung	23
1.3.4.2	SDS-PAGE	23
1.3.4.3	2D-Gelelektrophorese.....	23
1.3.5	Sequenzanalyse mit Hilfe des Edman-Abbaus.....	24
1.4	Massenspektrometrie in der Proteinanalytik.....	24
1.4.1	Geschichte der Massenspektrometrie	24
1.4.2	Genereller Aufbau eines Massenspektrometers.....	26
1.4.2.1	Die Ionenquelle	26
1.4.2.2	Der Analysator.....	27

1.4.2.3	Der Detektor.....	28
1.4.3	ESI-IT-MS	29
1.4.3.1	Elektrospray Ionisation.....	29
1.4.3.2	Die Ionenfallen-Analysatoren.....	30
2	Aufgabenstellung	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software.....	35
3.1.1	Chemikalien	35
3.1.2	Proteine, Enzyme und Peptide.....	36
3.1.3	Verbrauchsmaterial.....	36
3.1.4	Geräte	37
3.1.5	Verwendete Software.....	38
3.2	Präparative Methoden	39
3.2.1	Präparation von Proteinproben und enzymatischer Verdau	39
3.2.1.1	Reduktion und S-Carboxymethylierung von IgG	39
3.2.1.2	Proteolytischer Verdau von reaktiv alkyliertem IgG mit V8 Protease.....	39
3.2.1.3	Proteolytischer Verdau von Somatostatin mit Lysylendoproteinase (LysC)	40
3.2.1.4	Proteolytischer Verdau von Apamin mit Trypsin	40
3.2.2	Oxidationsversuche	40
3.2.2.1	Oxidation von reaktiv alkyliertem GluC-Verdau des IgG Materials	41
3.2.2.2	Oxidation von intaktem IgG.....	41
3.2.2.3	Oxidation von Somatostatin	41
3.2.2.4	Oxidation von Apamin	41
3.2.2.5	Oxidation von Glutathion (GSSG) für das Reaktionsmonitoring.....	41
3.2.2.6	Oxidation von Glutathion (GSSG) zur Methodenoptimierung und für kinetische Untersuchungen.....	42
3.2.3	Derivatisierung von Methioninsulfoxid	43
3.2.3.1	Derivatisierung von Methioninsulfoxid durch Mikrowellenstrahlung.....	43
3.2.3.2	Derivatisierung von Methioninsulfoxid durch Oxidation	44
3.3	Analytische Methoden.....	45
3.3.1	Manganometrische Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration	45
3.3.2	UV/Vis-Spektroskopische Untersuchungen	45
3.3.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Methode von Bradford.....	45
3.3.2.2	Bestimmung der Absorptionsmaxima von Methionin und Methioninsulfoxid	45

3.3.3	LC-MS und LC-MS/MS Messungen.....	46
3.3.3.1	Messung von Methionin und seinen Derivaten.....	47
3.3.3.2	Messung von GSSG und dessen Oxidationsprodukten.....	48
3.3.3.3	Messung von Somatostatin und dessen Oxidationsprodukten	50
3.3.3.4	Messung von Apamin und dessen Oxidationsprodukten	51
3.3.3.5	Messung von reaktiv alkyliertem GluC-Verdau des IgG	53
4	Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Teil 1 – Nachweis geschädigter Aminosäuren in Peptiden und Proteinen	55
4.1.1	Wahl des Probenmaterials	55
4.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration der verwendeten IgG-Lösung	56
4.1.3	Erstellung eines Referenzchromatogramms.....	57
4.1.4	Oxidation des IgG-Materials und Untersuchung der eingetretenen Schäden auf Peptid- und Proteinebene.....	61
4.1.4.1	Oxidativer Stress durch H ₂ O ₂ am Peptid.....	61
4.1.4.2	Oxidativer Stress durch H ₂ O ₂ am intakten Protein.....	69
4.1.5	Fixierung der Schädigung des Methionins	76
4.1.5.1	Umsetzung des Methionins zu Vinylglycin.....	77
4.1.5.2	Selektive Oxidation von Methioninsulfoxid zum Sulfon	80
4.2	Teil 2 – Der Nutzen oxidiertes schwefelhaltiger Aminosäuren als analytische Sonde	87
4.2.1	Nachweis von Methionin und Cystein.....	87
4.2.2	Nachweis von Cystin und Disulfidbrücken	96
4.2.2.1	Oxidation von Gluthation.....	96
4.2.2.2	Mechanistische Betrachtung der Fragmentierung oxidiertes Disulfidbrücken.....	102
4.2.2.3	Oxidation von Somatostatin	109
4.2.2.4	Oxidation von Apamin	113
4.2.3	Fragmentierungsverhalten cyclisch verbrückter Peptide nach Oxidation	120
4.2.4	Optimierung der Methode der Disulfidbrückenoxidation	125
4.2.4.1	Der Einfluss der Säure und des pH-Wertes	125
4.2.4.2	Der Einfluss von Persäuren und mCPBA	128
4.2.4.3	Der Einfluss von Katalysatoren	130
4.2.4.4	Die Kinetik der Oxidationsreaktion unter verschiedenen Bedingungen	132
4.2.4.5	Abschließende Beurteilung der Optimierungsmöglichkeiten für die Oxidation von Disulfidbrücken	138

5	Zusammenfassung	141
6	Fazit	143
7	Anhang	i
7.1	Literaturverzeichnis.....	i
7.2	Nomenklatur der Peptidfragmentierung.....	xii
7.3	Abkürzungen der Aminosäuren	xiii

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Ionenerzeugung mit ESI.....	30
Abb. 2:	Schematischer Aufbau einer Ionenfalle.....	31
Abb. 3:	Schematischer Aufbau eines Immunglobulins	56
Abb. 4:	Kalibrierkurve für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	57
Abb. 5:	Chromatogramm des nativen Peptide Mass Fingerprint Maps von IgG (verdaut mit GluC).....	58
Abb. 6:	Ausschnitt aus den Ionenspuren des doppelt geladenen Peptids E117-141 von IgG1 bei verschiedenen Bedingungen.	62
Abb. 7:	MS/MS Spektrum eines methioninhaltigen Peptids und der zugehörigen oxidierten Spezies.....	64
Abb. 8:	Ausschnitt aus den Ionenspuren des doppelt geladenen Peptids E117-141 von IgG1 bei verschiedenen Bedingungen.	65
Abb. 9:	MS/MS Spektrum eines methionin- und cysteininhaltigen Peptids und der zugehörigen zweifach oxidierten Spezies.....	67
Abb. 10:	Strukturen von Hydroxytryptophan, Kynurenin, N-Formylkynurenin und 3-Hydroxykynurenin	67
Abb. 11:	Ausschnitt aus dem Basisionenchromatogramm des Peptids Igκ: E36-53.....	68
Abb. 12:	Oxidativer Stress am intakten Protein	70
Abb. 13:	Oxidativer Stress auf Peptidebene	71
Abb. 14:	Verhältnis der oxidierten Peptidmenge zur Gesamtmenge des Peptids in Prozent bei 100-facher H ₂ O ₂ -Konzentration	73
Abb. 15:	Verhältnis der oxidierten Peptidmenge zur Gesamtmenge des Peptids in Prozent bei 500-facher H ₂ O ₂ -Konzentration.	74
Abb. 16:	Verhältnis der oxidierten Peptidmenge zur Gesamtmenge des Peptids in Prozent bei 2000-facher H ₂ O ₂ -Konzentration	75
Abb. 17:	Basisionenchromatogramm des Peptids MRFA	76
Abb. 18:	UV-Spektren von 500 µM Methionin und Methioninsulfoxid in wässriger Lösung	79

Abb. 19:	Basionenchromatogramm der mikrowellenbestrahlten Methioninsulfoxidprobe	80
Abb. 20:	Basionenchromatogramm von Methionin, Methioninsulfoxid und Methioninsulfon ..	82
Abb. 21:	Basionenchromatogramm des Oxidationsversuches von Methionin mit KO_2	83
Abb. 22:	Basionenchromatogramm des Oxidationsversuches von Met(O) mit KO_2	84
Abb. 23:	Basionenchromatogramm der Oxidation von Methionin mit HX/XO nach 120 min und 16 h	85
Abb. 24:	Basionenchromatogramm der Oxidation von Methioninsulfoxid mit HX/XO nach 120 min und 16 h	86
Abb. 25:	Basionenchromatogramm des IgG-Verdaus und Ionenspur des gesuchten Peptides mit dem m/z-Verhältnis 1585,1	89
Abb. 26:	MS^1 -Spektrum des Peaks zur Retentionszeit 42,0 min mit vergrößertem Ausschnitt	89
Abb. 27:	MS^2 -Spektrum des gesuchten Peptides zur Retentionszeit 42,0 min	90
Abb. 28:	Ionenspuren der m/z-Werte 1585,1, 1601,1, 1617,1 und 1633,1 der Referenzprobe und der mit 500 äq. H_2O_2 bei pH 5 gestressten Methionin-Testprobe.....	93
Abb. 29:	Ionenspuren der m/z-Werte 1585,1, 1601,1, 1617,1 und 1633,1 der Referenzprobe und der mit 2000 äq. H_2O_2 bei pH 3 gestressten Cystein-Testprobe	94
Abb. 30:	MS^2 -Spektrum des Vorläuferions $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1601,1$ des einfach oxidierten Peptides	95
Abb. 31:	MS^2 -Spektrum des aufgeklärten Peptids VTCVVVDVSHEDPE.....	96
Abb. 32:	Basionenchromatogramm der mit H_2O_2 bei pH 3 oxidierten GSSG-Probe nach $t = 300$ min.....	98
Abb. 33:	Zeitlicher Verlauf der Oxidation von GSSG zu GS(O)SG und G- SO_3H bei pH 3	99
Abb. 34:	Basionenchromatogramm der mit H_2O_2 bei pH 11 oxidierten GSSG-Probe nach $t = 300$ min.	100
Abb. 35:	Zeitlicher Verlauf der Oxidation von GSSG zu G- SO_3H und Abbauprodukten bei pH 11	100
Abb. 36:	MS^2 -Spektrum von GSSG	101
Abb. 37:	MS^2 -Spektrum von GS(O)SG.....	102
Abb. 38:	MS^3 -Spektrum der Glutathionsulfensäure: 629→324.....	105
Abb. 39:	Vergleich des MS^4 -Spektrums (629→324→306) mit dem MS^3 -Spektrum (629→306)	106
Abb. 40:	MS^4 -Spektrum des Ions mit dem m/z-Wert 177 (629→306→177).....	107
Abb. 41:	Mögliche Vorläuferionen mit dem m/z-Verhältnis 177	108
Abb. 42:	Oxidation von Somatostatin-Peptid T1-T3 zum korrespondierenden S-Oxid.....	110
Abb. 43:	Oxidation von Somatostatin-Peptid T2 zu den Hydroxytryptophan-Derivaten	111

Abb. 44:	Basitionenchromatogramm des Somatostatinverdaus und der 105 min mit H_2O_2 oxidierten Probe	111
Abb. 45:	MS^2 -Spektrum des Somatostatin-Peptids T1-T3.....	112
Abb. 46:	MS^2 -Spektrum des oxidierten Somatostatin-Peptids T1-T3-S-Oxid.....	113
Abb. 47:	Chromatogramm von Apamin-Peptid T2-T1-T4 nach 180 min Oxidation mit 8000 äq. H_2O_2 bei pH 3.	116
Abb. 48:	MS^1 -Spektrum von Apamin-Peptid T2-T1-T4 nach 180 min Oxidation mit 8000 äq. H_2O_2 bei pH 3.	117
Abb. 49:	MS^2 -Spektrum des $[M+2H]^{2+}$ -Ions des Apamin Peptids T2-T1-T4.....	117
Abb. 50:	MS^2 -Spektrum des $[M+2H]^{2+}$ -Ions des einfach oxidierten Apamin-Peptids T2-T1-T4	118
Abb. 51:	MS^3 -Spektrum des Thioaldehyd-Fragmentes T1-T4.....	119
Abb. 52:	MS^3 -Spektrum des Thioaldehyd-Fragmentes T2-T1.....	120
Abb. 53:	Mögliche cyclische Verknüpfungsvarianten SS-verbrückter Peptide	121
Abb. 54:	Sequenz von Somatostatin.....	121
Abb. 55:	MS^2 -Spektrum von nativem Somatostatin und von der oxidierten Spezies	122
Abb. 56:	MS^2 -Spektrum von LsyC-verdaulichem Apamin und von der oxidierten Spezies	123
Abb. 57:	MS^2 -Spektrum von Trypsin-verdaulichem Anthopleurin-A und von der einfach oxidierten Spezies.....	125
Abb. 58:	Prozentuale Bildung von GS(O)SG und G-SO ₃ H aus GSSG durch Oxidation von GSSG.....	128
Abb. 59:	Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H_2O_2 , Peressigsäure und Perpropionsäure nach einer Reaktionszeit von 840 min	129
Abb. 60:	Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H_2O_2 und mCPBA nach einer Reaktionszeit von 100 min	130
Abb. 61:	Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H_2O_2 in reinem Wasser und einer 10 %igen wässrigen HFIP-Lösung nach einer Reaktionszeit von 840 min	131
Abb. 62:	Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H_2O_2 ohne und mit Katalysatorzusatz nach einer Reaktionszeit von 840 min	132
Abb. 63:	Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von GSSG zu GS(O)SG in Abhängigkeit der Konzentration der Reaktanden	133
Abb. 64:	Auswertung der Geschwindigkeitskonstante der Bildung von GS(O)SG durch Oxidation von GSSG mit H_2O_2 bei pH 7 über die Steigung der Regressionsgerade.....	136
Abb. 65:	Auswertung der Geschwindigkeitskonstante der Bildung von G-SO ₃ H durch Oxidation von GSSG mit H_2O_2 bei pH 7 über die Steigung der Regressionsgerade.....	136

Abb. 66: Prozentuale Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten der Produktbildung
verglichen mit dem Referenzansatz..... 137

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über bekannte oxidative Modifikationen an Aminosäuren	15
Tab. 2:	Bezugsquellen der verwendeten Peptide und Proteine	36
Tab. 3:	Verwendetes Verbrauchsmaterial	36
Tab. 4:	Geräte für die LC-MS Analytik	37
Tab. 5:	Sonstige verwendete Gerätschaften	37
Tab. 6:	Übersicht über die verwendete Software	38
Tab. 7:	Verwendete Puffer und Lösungen für die reduktive Alkylierung von IgG	39
Tab. 8:	Verwendete Puffer und Lösungen für den pretoelytischen Verdau diverser Proteine und Peptide	40
Tab. 9:	Verdünnungsreihe der BSA-Standardlösung für die Erstellung der Kalibrierreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration	46
Tab. 10:	Zusammenfassung der Messwerte der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	57
Tab. 11:	Zuordnung aller identifizierten Peptide aus dem IgG-Verdau mit GluC	60
Tab. 12:	Redoxpotentiale ausgewählter Thiole	71
Tab. 13:	Theoretisch mögliche Peptidsequenzen mit $[M+H]^+$ -Ionen der Masse 1585,1 innerhalb einer Massentoleranz von $\pm 0,05$ %	92
Tab. 14:	Zu berücksichtigende Sequenzen für das gesuchte Peptid	95
Tab. 15:	Detektierte Produkte der Zersetzung von GSSG in basischem Millieu	99
Tab. 16:	Durchgeführte Versuche zur Bestimmung der Abhängigkeit der Oxidationsreaktion beim Zusatz verschiedener Säuren und der Abhängigkeit vom pH-Wert	126
Tab. 17:	Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung der Bildung von GS(O)SG und G-SO ₃ H aus GSSG mit prozentualer Veränderung gegenüber dem Referenzansatz	137
Tab. 18:	Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Bildung von GS(O)SG und G-SO ₃ H aus GSSG bei den Ansätzen mit mCPBA und MoO ₂ Cl ₂ ..	138

Schemenverzeichnis

Schema 1:	Proteinsequenzierung nach Edman	25
Schema 2:	Fragmentierungsmechanismus von oxidiertem Methionin in der Ionenfalle	63
Schema 3:	Fragmentierungsmechanismus von S-carboxymethyliertem, oxidiertem Cystein	66
Schema 4:	Schematische Darstellung der Reduktion von oxidiertem Cystin mit Thiolen	72
Schema 5:	Photochemische Umwandlung von L-Met zum Vinylglycin-Derivat	78
Schema 6:	Oxidation von Thianthren-5-Oxid mit nucleophilen und elektrophilen Oxidationsmitteln.	81
Schema 7:	Umsetzung von Hypoxanthin zu Harnsäure durch Xanthinoxidase.....	84
Schema 8:	Oxidation von GSSG unter sauren Bedingungen.....	97
Schema 9:	Mechanismus der asymmetrischen Fragmentierung von GS(O)SG	103
Schema 10:	Vermuteter Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke	103
Schema 11:	Alternativer Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke I.....	104
Schema 12:	Alternativer Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke II	104
Schema 13:	Alternativer Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke III.....	104
Schema 14:	Übersicht über die entstehenden Fragmentionen aus der Fragmentierung von A'	109
Schema 15:	Verdau von Somatostatin mit LysC	110
Schema 16:	Verdau von Apamin mit Trypsin	114
Schema 17:	Übersicht über die Fragmentierungsprodukte des Apamin-Peptids T2-T1-T4, je nach Oxidationsstelle.....	115
Schema 18:	Verdau von Apamin mit LysC	122
Schema 19:	Verdau von Anthopleurin-A mit Trypsin.....	124
Schema 20:	Rolle von HFIP bei der Oxidation von Sulfiden	131

1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress an Aminosäuren und Proteinen

Proteine stellen die größte und wichtigste Gruppe der Biomoleküle dar und übernehmen vielfältige Funktionen in lebenden Organismen. Neben den strukturgebenden Proteinen, die maßgeblich am Aufbau und Erhalt von Zellen beteiligt sind, übernehmen sie Aufgaben des Transports in Lebewesen, wie den Sauerstofftransport durch Hämoglobin, oder den allgemeinen Stofftransport durch die Albumine^[1,2,3,4]. Ferner wirken sie als Katalysatoren und ermöglichen so biochemische Prozesse, die das Leben unter den Bedingungen unseres Planeten erst möglich machen. Ohne ihren Einfluss wären endotherme biochemische Synthesen im Körper nicht zu bewerkstelligen. Sie sind entscheidend für die Reproduktion der Arten, da auch die DNA- bzw. RNA-Replikation mit Hilfe von Proteinen bewerkstelligt wird^[5,6]. Sie steuern komplexe biochemische Abläufe, bilden Ionenkanäle und aktive Transporter in Zellen und sorgen so für die Zufuhr von Nähr- und Mineralstoffen, sowie die Entgiftung des Körpers. Ferner wirken sie als Botenstoffe und Hormone und bilden das immunologische Abwehrsystem der höher entwickelten Arten.

Aufgrund der besonderen Bedeutung der Proteine für das Leben auf der Erde besteht ein großes wissenschaftliches Interesse an ihrem Aufbau, ihrer Struktur und vor allem ihrer biologischen Stabilität. Bereits geringfügige chemische Modifikationen an den Aminosäuren der Proteine führen u.U. zum vollständigen Verlust der Funktionalität. Diese natürliche Alterung von Proteinen steht seit Jahren im Fokus der wissenschaftlichen Forschung, um das Rätsel des Alterungsprozesses und letztlich des Lebens und Sterbens zu klären und der Menschheit Antworten auf jahrtausende alte Fragestellungen über die Vergänglichkeit des Lebens zu liefern.

Seit langem ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit, die im Körper z.T. entscheidende regulatorische Funktionen übernehmen^[7,8], maßgeblich daran beteiligt sind, körpereigene Proteine zu schädigen und letztlich den Prozess der Alterung voran zu treiben^[9,10,11]. Daher ist die Erforschung der Proteinveränderung und -inaktivierung durch oxidativen Stress ein Hauptanliegen der Altersforschung. Ferner stehen viele Erkrankungen im direkten Zusammenhang mit einem vermehrten körpereigenen oxidativen Stress und die dadurch bedingte proteinschädigende Wirkung. In diesem Zusammenhang werden die Koronare Herzkrankheit^[12,13], Arteriosklerose^[13,14,15], diabetische Nephropathie^[16] sowie Parkinson^[17,18] genannt. Die Häufigkeit dieser so genannten Zivilisationskrankheiten weckt den Wunsch eines besseren Verständnisses der ablaufenden Prozesse und bedingt das intensive Studium der Veränderung von Proteinen bzw. der proteinogenen Aminosäuren durch oxidative Einflüsse.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der Proteine im Bereich der medizinischen Behandlung (genannt seien hier beispielhaft Insulin, Erythropoetin und monoklonale Antikörper mit verschiedenen Funktionalitäten) ist das Verständnis des „Protein-Agings“ zunehmend auch unter wirtschaftlichen Aspekten von Bedeutung. So wäre es wünschenswert sichere Nachweise für die vielfältigen Alterungsprozesse zu besitzen, mit denen bestenfalls auch quantitative Aussagen getroffen werden können, um letztendlich die Gesamtschädigung eines Proteins bzw. Wirkstoffs zu beurteilen.

Viele Arbeitsgruppen haben sich bereits mit den vielfältigen Oxidationsprozessen an Aminosäuren beschäftigt, um mögliche Veränderungen in der Proteinstruktur aufzuklären. Besonders betroffen von oxidativen Schädigungen sind die aromatischen Aminosäuren Tyrosin^[19,20] und Tryptophan^[21], die Aminosäure Histidin^[22] und die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und insbesondere Methionin^[23]. Daneben sind aber auch an fast allen anderen proteinogenen Aminosäuren Veränderungen durch die Einwirkung oxidativer Agentien bekannt.

1.1 Oxidativer Stress an Aminosäuren und Proteinen

Die wichtigsten Veränderungen der am häufigsten betroffenen Aminosäuren sind in Tab. 1 zusammen gefasst.

Aminosäure	Oxidationsprodukt(e)	Literatur
Cys,	Sulfensäure	[24]
	Sulfinsäure	[25,26,27]
	Sulfonsäure	[23,28]
	Disulfide	[23,29]
Cys ₂	Cystinmono- und Dioxid	[30]
Met	Methioninsulfoxid und -sulfon	[23,31,32,33,34]
Lys	Carbonylbildung (2-Aminioadipin-Semialdehyd)	[35,36]
	Chloramine	[37]
Arg	Carbonylbildung (Glutamat-Semialdehyd)	[35,36]
Pro	Glutamat-Semialdehyd	[35]
	2-Pyrrolidon	[38]
	4-/5-Hydroxyprolin	[39]
	Pyroglutaminsäure	[40]
Thr	2-Amino-3-keto-buttersäure	[41]
His	2-Oxohistidin	[22,42]
Tyr	Dityrosin	[43,44]
	Chlorotyrosin	[45]
	Nitrotyrosin	[46]
	Hydroxytyrosin- und Hydroperoxytyrosinderivate	[19,20]
Trp	Hydroxytryptophan, Kynurenin, N-Formylkynurenin, 3-Hydroxykynurenin	[21, 47]
Val, Leu, andere	Hydroxy- und Hydroperoxyderivate, Aggregate, Fragmente	[40, 48, 49, 50]

Tab. 1: Übersicht über bekannte oxidative Modifikationen an Aminosäuren

1.2 Bedarf an analytischen Methoden zum Nachweis von Schäden und zur Aufklärung von Proteinstrukturen

Der globale Markt für Arzneistoffe auf Proteinbasis wächst kontinuierlich in hohem Tempo. Protein-Wirkstoffe gewinnen aufgrund ihrer Reaktivität, ihrer Sicherheit, ihrer spezifischen Wirkung und nicht zuletzt durch einfache Produktionsverfahren, ermöglicht durch die im letzten Jahrzehnt rapide Verbesserung und Optimierung gentechnischer Methoden, zusehends an kommerziellem Interesse.

Zunehmend steigt durch die rasche zivilisatorische Entwicklung und das superexponentielle Bevölkerungswachstum der Erde der Bedarf an biopharmazeutischen Arzneistoffen. Der globale Markt für proteinbasierte Wirkstoffe hatte 2007 einen weltweiten Umsatzwert von 87 Milliarden US Dollar (USD). Bei den zugrunde liegenden jährlichen Wachstumsraten dieses Sektors von über 10 % wird für das Jahr 2013 ein globaler Umsatz von 160 Milliarden USD erwartet, was fast einer Verdopplung der Produktion entspricht^[51].

Allein der Bedarf am wohl bekanntesten und ältesten Wirkstoff auf Proteinbasis, dem Insulin, wird sich Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO zufolge bis zum Jahr 2030 mehr als verdoppeln. Bereits heute sind über 171 Millionen Menschen von Diabetes betroffen und auf die Gabe von Insulin angewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass alleine in den Entwicklungsländern die Zahl der Diabetes-Erkrankungen, die täglich 8700 Menschen weltweit das Leben kostet, innerhalb der nächsten 25 Jahre um 150 % ansteigt^[52].

Die größte Gruppe an proteinbasierten Wirkstoffen bilden die Peptid-Hormone, wie Insulin, mit einem Marktwert von 26 Mrd. USD im Jahr 2007, 28 USD im Jahr 2008 und bei einer jährlichen Wachstumsrate (JWR) von z.Zt. über 12 % einem erwarteten Marktwert von 50 Mrd. USD im Jahr 2013^[51].

Als zweit umsatzstärkste Gruppe werden die Cytokine genannt. Ihr Jahresumsatz lag im Jahr 2007 bei 16 Mrd. USD, 2008 bei 17,5 Mrd. USD und bei einer durchschnittlichen JWR von 9 % wird im Jahr 2013 mit einem Umsatz von 26,8 Mrd. USD gerechnet^[51].

Die drittgrößte Gruppe wird von Medikamenten zur Behandlung des Blutdrucks gebildet. Hoher Blutdruck ist eine der häufigsten Zivilisationskrankheiten^[53,54], die verstärkt durch die Verwendung proteinbasierter Medikamente therapiert wird. Hier wurden 2007 15 Mrd. USD und 2008 16 Mrd. USD umgesetzt. 2013 wird ein Umsatz von 21 Mrd. USD erwartet. Mit einer JWR von 6 % wird gerechnet^[51].

Die viertgrößte Gruppe der proteinbasierten Therapeutika bilden die Immunglobuline. Diverse Erkrankungen werden durch die Gabe von Immunglobulin-Präparationen behandelt. Darunter fallen z.B. die rheumatoide Arthritis^[55], Multiple Sklerose^[56], Psoriasis (Schuppenflechte)^[57] und diverse Krebserkrankungen wie Darmkrebs, der in Europa zu den dritthäufigsten Krebserkrankungen zählt, Kopf- und Nackenkrebs, sowie Brustkrebs^[58]. Die aktuellen Umsatzzahlen für Immunglobuline lagen 2007 bei 15 Mrd. USD und 2008 bei 18 Mrd. USD. Aufgrund der relativ hohen JWR von 15,4 % wird im Jahr 2013 mit einem Gesamtumsatz 37 Mrd. USD gerechnet^[51]. Damit stellt diese Gruppe der proteinbasierten Wirkstoffe das am stärksten wachsende Marktsegment dar. Neben den bereits genannten Wirkstoffgruppen finden Proteine auch Verwendung als Impfstoffe, Antibiotika und Enzyme, ebenfalls mit wachsendem Potential.

Die hohe Nachfrage nach biopharmazeutischen Produkten, zieht eine vermehrte Produktion, sowie ein verstärktes Interesse der Forschung nach sich. Damit verbunden ist die Entwicklung einer Vielzahl neuer Medikamente auf Proteinbasis, um den Bedarf neuer Therapeutika zu decken.

Wie auch andere Arzneimittel unterliegen die wirksamen Proteine und Peptide der Zulassungspflicht, wenn sie als Medikament auf den Markt gebracht werden sollen. Dabei ist das europäische Arzneimittelrecht auf alle Substanzen anzuwenden, die *„in den Mitgliedstaaten in den Verkehr gebracht werden sollen und die entweder gewerblich zubereitet werden oder bei deren Zubereitung ein industrielles Verfahren zur Anwendung kommt“*^[59]. Als Voraussetzung für die Zulassung muss das Nutzen-Risiko-Verhältnis günstig sein, die therapeutische Wirksamkeit nachgewiesen werden und die pharmazeutische Qualität gewährleistet sein, wobei das deutsche Arzneimittelrecht die Qualität definiert als *„die Beschaffenheit eines Arzneimittels, die nach Identität, Gehalt, Reinheit, sonstigen chemischen, physikalischen, biologischen Eigenschaften oder durch das Herstellungsverfahren bestimmt wird.“*^[60]

Dadurch ergeben sich stark reglementierte Zulassungsbedingungen, in denen die Hersteller u.a. dokumentieren müssen, wie das Arzneimittel in hinreichender pharmazeutischer Qualität herzustellen ist. Ferner werden nichtklinische pharmakologische und toxikologische Studien erwartet, die die Sicherheit des Wirkstoffes gewährleisten sollen, sowie im letzten Schritt des Zulassungsverfahrens klinische Studien am Menschen. Diese sind nach §4 AMG Abs. 23 definiert als *„eine am Menschen durchgeführte Untersuchung, die dazu bestimmt ist,*

klinische oder pharmakologische Wirkungen von Arzneimitteln zu erforschen oder nachzuweisen oder Nebenwirkungen festzustellen^[61].“

Insbesondere in den letzten beiden Zulassungsphasen besteht folglich ein erhöhter Bedarf an analytischen Methoden, um die Identität, die Reinheit und den Gehalt des Wirkstoffes oder der Formulierung zu überprüfen und zu gewährleisten. Der Anstieg der Produktionsmengen und der Anzahl neuer Wirkstoffe verursacht die Notwendigkeit immer besserer, effizienterer und wirtschaftlicherer Analyseverfahren, um auf dem globalen Markt konkurrenzfähig zu bleiben. Ferner stellen die Komplexität biopharmazeutischer Wirkstoffe die Forscher und Analytiker vor neue Aufgaben, für die eigens analytische „Tools“ neu oder weiterentwickelt werden müssen. Dabei ist jede neue Methode, die zu einem Erkenntnisgewinn unter wirtschaftlichen Aspekten führt, ein willkommenes Mittel.

1.3 Methoden der Proteinanalytik

Je nach Anwendungsgebiet werden für die Proteinanalytik unterschiedliche analytische Methoden eingesetzt. Generell kommen die Chromatographie, optische Spektroskopie, NMR-Spektroskopie, die Bioinformatik, elektrophoretische Techniken, die Röntgenstrukturanalyse, die Sequenzanalyse und die Massenspektrometrie zum Einsatz. Die Techniken werden im Folgenden kurz vorgestellt und ihr Verwendungszweck erläutert.

1.3.1 Chromatographie

Chromatographische Trennverfahren werden für viele Fragestellungen der Proteinforschung als analytische Mittel eingesetzt, wobei je nach Anwendungsgebiet unterschiedliche Techniken angewandt werden. Genannt seien hier die Gelfiltration, die Ionenaustauschchromatographie, die Affinitätschromatographie sowie die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC). Bei allen chromatographischen Verfahren werden die Analyten in flüssiger oder gasförmiger Phase über Wechselwirkungen mit einer stationären Phase getrennt und über optische (UV, Fluoreszenz) oder physikalische (Brechungsindex, Leitfähigkeit) Methoden detektiert.

1.3.1.1 Gelfiltration

Die Gelfiltration, oder auch Gelpermeation, Ausschluss-Chromatographie oder engl. *size exclusion chromatography* (SEC) ist ein chromatographisches Verfahren, bei dem die Analyten über ihre Größe bzw. genauer gesagt ihren hydrodynamischen Radius (Stoke's Radius) aufgetrennt werden. Üblicher Weise werden die Analyten in Lösung gebracht und über ein poröses Austauschmaterial, die stationäre Phase, eluiert. Die stationäre Phase besteht aus sphärischen, porösen Partikeln, meist auf Kieselgel- oder Polymerbasis. Die Poren der Partikel weisen definierte Größen auf. Während des Trennvorgangs dringen die Analytmoleküle in die Poren der festen Phase und werden so zurückgehalten. Da die Poren eine bestimmte Größe aufweisen, werden zu große Fragmente nicht oder nur schlecht retardiert. Je besser das Analytmolekül in die poröse Struktur eindringt, desto stärker wird es zurückgehalten. Die aufgetragenen Substanzen eluieren mit Hilfe des Laufmittels, zeitlich betrachtet, mit absteigendem Molekulargewicht.

Die Methode kann sowohl zu präparativen also auch zu analytischen Zwecken verwendet werden. Im ersteren Fall kann damit eine Reinigung des Proteins erfolgen, indem Puffersalze oder kleinere chemische Verunreinigungen zurückgehalten werden. Im zweiten Fall lassen sich damit Abbauprodukte detektieren, wobei Proteinaggregate vor dem Analyt und Fragmente danach detektiert werden^[62, 63, 64].

1.3.1.2 Ionenaustauschchromatographie

Bei diesem Verfahren erfolgt die Trennung der Analyte über ihre elektrostatische Wechselwirkung mit dem Trennmaterial. Unterschieden wird dabei zwischen Kationen- und Anionenaustauschern. Die Methode eignet sich besonders für die Trennung kleiner polarer Peptide oder Aminosäuren, die über die Carboxyl-, die Aminogruppe oder polare Reste (z.B. Lysin, Histidin, Asparagin- und Glutaminsäure) mit der stationären Phase wechselwirken. Zunehmend finden neue chirale Materialien Einzug, die es ermöglichen L- und D-konfigurierte Aminosäuren zu trennen^[62,65,66,67].

1.3.1.3 Umkehrphasenchromatographie

Im Gegensatz zur Normalphasenchromatographie, werden als stationäre Phasen bei der Umkehrphasenchromatographie (engl.: *reversed phase chromatography*; RPC) unpolare, hydrophobe Trägermaterialien verwendet. Es handelt sich zumeist um an Kieselgel gebundene Octadecylketten, andere (z.T. modifizierte) Alkylreste, oder langkettige Polymerstrukturen

auf Phenyl- oder Etherbasis. Die Interaktion der Analytmoleküle beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen und Van-der-Vaals-Kräften. Die elutrope Kraft wird hauptsächlich durch das verwendete Laufmittel bestimmt. Je höher dabei die Polarität und Oberflächenspannung des Eluenten ist, desto schlechter wird der gebundene Analyt desorbiert. Wasser stellt somit das schlechteste Elutionsmittel dar. In der Proteinanalytik finden zumeist Gradienten auf Wasser- und Acetonitrilbasis Verwendung. Aufgrund des breiten Anwendungsgebietes und einer Vielzahl an verschiedenen Trägermaterialien, ist die RPC mittlerweile eine der gängigsten Chromatographiemethoden. Sie findet in der Proteinanalytik vor allem Anwendung beim sog. *Peptide Mapping*, aber auch zur Analyse und Trennung intakter Proteine, der Quantifizierung, Reinigung oder Charakterisierung^[62, 63].

1.3.1.4 Affinitätschromatographie

Bei dieser Chromatographiemethode werden spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase für die Trennung ausgenutzt. Im Proteinbereich wird dabei auf die Interaktion des Proteins mit einem bestimmten Substrat zurückgegriffen. Während des Trennungsvorgangs werden Protein-Substrat-Komplexe gebildet, die die Retardierung des Moleküls bewirken. So werden spezifisch Antigen-Antikörper Komplexe, Enzym-Coenzym, Enzym-Substrat-Komplexe, oder allgemein Protein-Ligand-Komplexe für die Trennung verwendet. Die Methode erweist sich für spezifische Fragestellungen, aufgrund ihrer hohen Selektivität und Effizienz, als vorteilhaft und kann präparativ für die Aufreinigung von Proteinen verwendet werden^[62,63, 68, 69].

1.3.1.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde entwickelt, um die Trennleistung der beschriebenen chromatographischen Verfahren zu verbessern. Die Steigerung der Trennstufenzahl und somit der Selektivität und Trennungsleistung des chromatographischen Systems, wird über die Verwendung kleinerer Partikel (<10 µm) als stationäre Phase erreicht. Daraus ergibt sich aufgrund des Strömungswiderstandes aber eine stark erhöhte Analysendauer, die nur durch die Beherrschung der nötigen hohen Drücke reduziert werden konnte. Bei diesem Verfahren wird das Laufmittel mit hohem Druck (i.d.R. 100-400 MPa) durch die Trennsäule geleitet und „drückt“ dabei die mit der festen Phase interagierenden Analyte heraus. Der Trennungsprozess selbst hängt von der verwendeten Methode ab und ist oben beschrieben. Ca. 80 % der Anwendungen beruhen auf der Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC)^[62,63, 70].

1.3.2 Optische Spektroskopie

Als optische Spektroskopiemethoden werden in der Proteinanalytik vor allem die UV-Absorptionsspektroskopie, die Fluoreszenzspektroskopie, sowie die IR-/Raman-Spektroskopie verwendet.

1.3.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Diese Analysemethode beruht auf der Absorption bestimmter Wellenlängen des Lichtes. Dabei werden die gelösten Proteinproben auf ihr Absorptionsvermögen hin untersucht. Die Methode wird zumeist zu Quantifizierungszwecken genutzt. So können Proteine durch Absorption von UV-Licht über die aromatischen Reste des Tyrosins und Phenylalanins, nachgewiesen und quantifiziert werden. Ebenso beruhen eine Vielzahl von Proteinkonzentrationsbestimmungsmethoden (wie dem Bradford Assay) auf der Verwendung von Protein-Farbstoff-Komplexen, deren FarbabSORption für die Quantifizierung herangezogen werden kann. Ferner kann die Anzahl freier Thiolgruppen mit Hilfe der UV-Spektroskopie nachgewiesen werden^[71,72].

1.3.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Dieses Verfahren eignet sich insbesondere für die Analyse und Quantifizierung von Aminosäuren. Die Zusammensetzung eines Proteins kann nach einer Totalhydrolyse des Proteins in die einzelnen Aminosäuren qualitativ beschrieben werden. Dabei werden die erhaltenen Aminosäurelösungen mit Fluorophoren gekoppelt, so dass nach einer zumeist chromatographischen Auftrennung der Analyte, die Quantität der nun fluoreszierenden Aminosäurederivate mit einem Fluoreszenzspektrometer aufgeklärt werden kann. Die Methode bietet den Vorteil einer sehr hohen Empfindlichkeit, so dass gegenüber der klassischen UV-Absorption bereits Picomol-Mengen sicher nachgewiesen werden können^[71,72].

1.3.2.3 IR-/Raman-Spektroskopie

Mit Hilfe der IR- und Raman-Spektroskopie können über die Anregung der Schwingungen Informationen über die Sekundärstrukturen eines Proteins erhalten werden. Dabei wird meist die Schwingung der Carbonylgruppe betrachtet, deren Wellenzahl stark von der chemischen Umgebung wie z.B. Wasserstoffbrücken abhängt. Somit ist die Aufklärung der Anteile an α -Helix- und β -Faltblattstrukturelementen in Proteinen möglich. Die Methode kann

insbesondere auch auf gelöste Proteine und Membranproteine angewandt werden, so dass das Protein in seinem nativen Zustand „beobachtet“ werden kann und nicht vorher kristallisiert werden muss^[71,72].

1.3.2.4 Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse ist das Mittel der Wahl zur Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur. Über das Beugungsmuster des Röntgenstrahls am Proteinkristall kann eine Aussage über die grobe äußere Struktur und bei höheren Auflösungen über das Proteinrückgrat und die Stellung der Aminosäurereste getroffen werden. Eine Schwierigkeit dieser Methode besteht oft darin, saubere Proteinkristalle zu erzeugen, da nur diese untersucht werden können und die gewünschten Informationen liefern. Ferner können für die Struktur wichtige Wasserstoffatome, aufgrund ihrer geringen Elektronendichte und der damit verbundenen ungenügenden Röntgenbeugung, nicht aufgeklärt werden. Dazu bedarf es der Neutronenbeugung, die jedoch technisch wesentlich aufwendiger ist^[62,72,73].

1.3.2.5 NMR-Spektroskopie

Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse ist es mit Hilfe der magnetischen Kernresonanz möglich, dreidimensionale Raumbilder von Proteinen in wässrigen Lösungen zu erstellen. Die aufwendigen Kristallisationsprozesse können so umgangen und das Protein in seiner nativen Faltung im wässrigen Milieu beschrieben werden. Ferner eignet sich die Methode zur Aufklärung unterschiedlicher Konformationen der beweglichen Proteinanteile^[62,72].

1.3.3 Bioinformatik

Die Bioinformatik beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Sequenzanalyse und der Strukturvorhersage von Proteinen. So können computergestützt, auf der Basis von Modellen, dreidimensionale Bilder von Proteinen erzeugt werden, um Fragen über die Faltung, die Tertiär- und Quartärstruktur, die Interaktion des Proteins mit Liganden und die räumliche Anordnung des Proteins in vorgegebenen Strukturen zu beantworten. Ferner können die Wirkungsweise und die ablaufenden Prozesse im katalytischen Zentrum von Enzymen simuliert und die Auswirkungen von Modifikationen in der Sequenz auf die Faltung und die Funktionalität des Proteins studiert werden^[62].

1.3.4 Elektrophoretische Techniken

1.3.4.1 Isoelektrische Fokussierung

Bei dieser Technik werden Proteine auf ein Gel, meistens bestehend aus Polyacrylamid, aufgetragen, indem ein pH Gradient etabliert wurde. Dieser kann durch Anlegung einer elektrischen Spannung und der Verwendung mobiler Ladungsträger erzeugt werden. Bei neueren Techniken wird der Gradient durch im Gel „verankerte“ immobilisierte Ampholyte vorgegeben. Das Anlegen einer Spannung an das Gel lässt das Protein entsprechend seiner Anzahl an sauren und basischen Aminosäuren im elektrischen Feld wandern, bis der pH-Wert-Bereich des Gels erreicht ist, der dem isoelektrischen Punkt (IEP) des Proteins entspricht. An diesem Punkt ist die Nettoladung des Proteins gleich Null, so dass das elektrische Feld keine Kraft mehr auf das Protein ausübt und dieses somit stehen bleibt.

Die Methode eignet sich insbesondere zur Aufklärung posttranslationaler Modifikationen am Protein, wie z.B. der Phosphorylierung, die eine negative Nettoladung mehr am Protein erzeugt und somit das Laufverhalten im Gel verändert^[72,74,75].

1.3.4.2 SDS-PAGE

Bei der sog. SDS-PAGE (engl. Abkürzung für *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; Natriumdodecylsulfat Gelelektrophorese) wird ein mit einem Überschuss an SDS modifiziertes Protein auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mit Hilfe elektrischer Spannung aufgetrennt. Die Trennung beruht alleine auf der Größe des Proteins. Das Detergenz SDS führt zu vollständiger Entfaltung der Proteine und lagert sich an diese an. Dabei überdecken eine Vielzahl von negativ geladenen SDS Molekülen das Protein, dessen eigene Nettoladung damit vernachlässigbar wird. Somit gelingt es die Laufstrecke der Proteine in eine lineare Beziehung zur Größe zu setzen. Kleinere Proteine laufen somit schneller und weiter durch die engen „Maschen“ des Gels als größere. Die Methode kann folglich zur Identitätsprüfung und zum Auffinden von Abbauprodukten und Verunreinigungen Verwendung finden^[72,75,76].

1.3.4.3 2D-Gelelektrophorese

Diese Technik ist eine Kombination der IEF und der SDS-PAGE. Im ersten Schritt wird eine IEF durchgeführt und die Proteine anhand ihres IEP getrennt. Das Gel wird im Anschluss äquilibriert. Dabei werden durch den Zusatz von Mercaptanen die Disulfidbrücken des Proteins geöffnet und anschließend durch Alkylierungsmittel vor Reoxidation geschützt. Im

weiteren Verlauf wird das fertige Gel mit der Kante senkrecht zur Laufrichtung an ein SDS-PAGE-Gel gelegt und die Proteine durch Anlegung einer Spannung nach Größe getrennt. Es wird ein zweidimensionales Bild erhalten, aus dem die einzelnen Protein-Spots durch Anfärben quantitativ bestimmt werden können. Durch diese Technik lassen sich Probleme der Proteinüberlappung, die bei den einzelnen Methoden auftreten können, umgehen^[72,75,77,78].

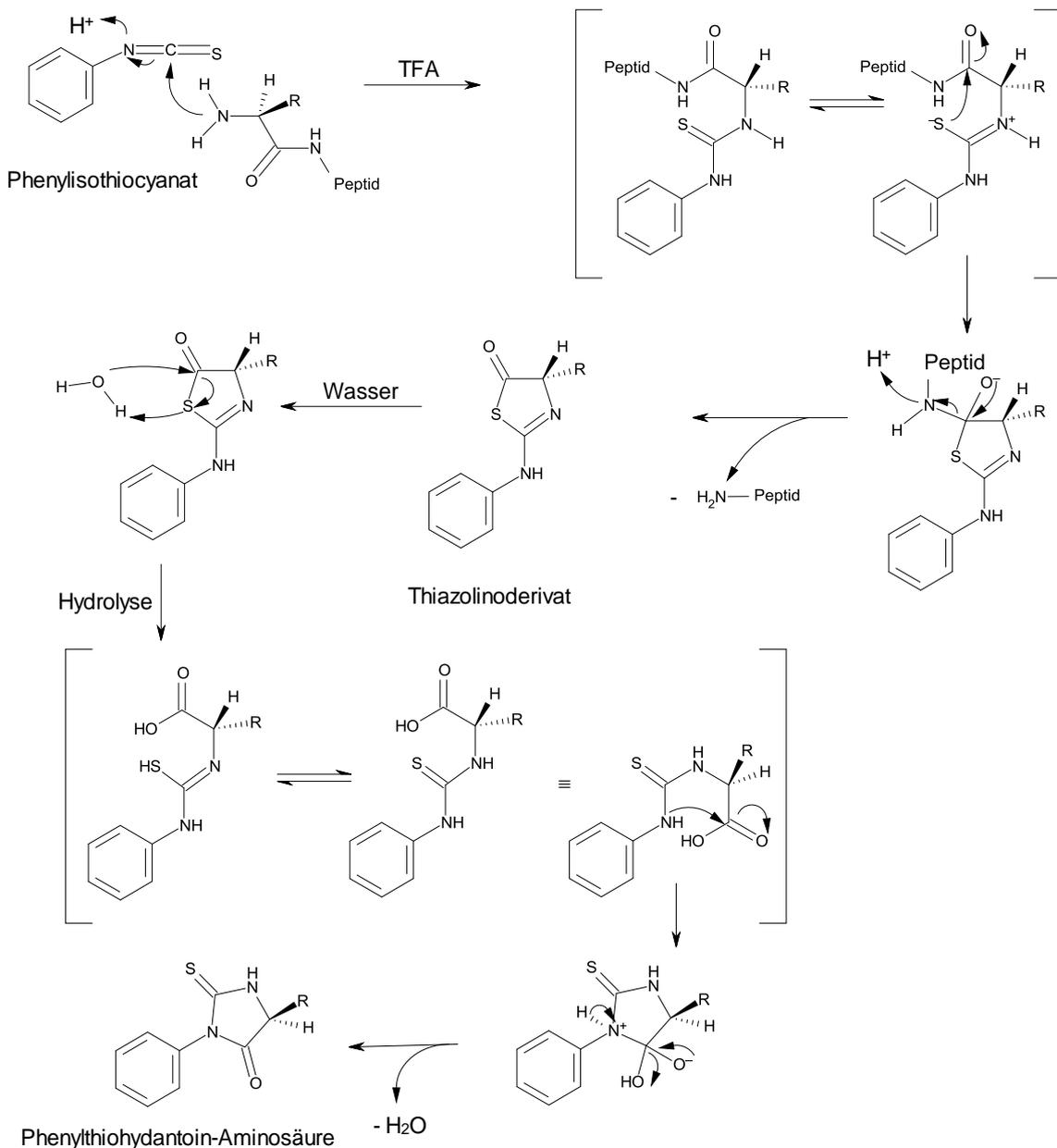
1.3.5 Sequenzanalyse mit Hilfe des Edman-Abbaus

Der Edman-Abbau ist eine von Pehr Edman im Jahre 1949 entwickelte Methode zur Sequenzierung der Primärstruktur von Proteinen. Dabei wird die N-terminale Aminosäure eines Proteins oder Peptids mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und letztlich unter sauren Bedingungen als Phenylthiohydantoin-Aminosäure (PHT-AS) abgespalten, ohne dabei die restlichen Peptidbindungen zu brechen (Schema 1). Nach Entfernung und Analyse der abgespaltenen PHT-AS, kann ein neuer Zyklus gestartet werden und so Schritt für Schritt die Primärstruktur aufgeklärt werden. Die automatisierte Sequenzierung wird im sog. Sequenator durchgeführt, der die Reagenzien im richtigen Verhältnis mischt, die PHT-AS abtrennt, analysiert und die Daten aufzeichnet. Nach max. 30-40 Cyclen ist die Analyse aufgrund von Verunreinigungen nicht mehr genau genug, so dass größere Peptide vorher u.U. in kleinere Peptide geschnitten werden müssen^[72,79].

1.4 Massenspektrometrie in der Proteinanalytik

1.4.1 Geschichte der Massenspektrometrie

Der Grundstein der Massenspektrometrie wurde im Jahre 1913 von Sir Joseph John Thompson (Nobelpreis für Physik 1906) gelegt. In einem Experiment ließ Sir Thompson einen Strahl aus ionisiertem Neon durch ein elektrisches und ein magnetische Feld strömen und konnte auf einer Photoplatte zwei Spots beobachten, die von den Isotopen Neon-20 und Neon-22 herrührten^[80,81]. Basierend auf seiner Arbeit entwickelten Thompsons Schüler F. W. Aston und A. J. Dempster eine generelle massenspektrometrische Methode zur Trennung und Analyse von Isotopen^[82,83,84,85]. In den frühen 40er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die MS Technik erstmals präparativ zur Trennung von Uranisotopen eingesetzt, wodurch eine Möglichkeit zur Urananreicherung zur Verfügung stand^[86].



Schema 1: Proteinsequenzierung nach Edman

Das angereicherte Uran wurde letztlich zum Bau der ersten Nuklearwaffe benutzt. In den 50er Jahren führte eine konsequente Weiterentwicklung der Geräte, insbesondere der Analysatoren, zum erstmaligen Einsatz der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung^[87]. Die neuen Möglichkeiten der Molekülfragmentierung - als Grundvoraussetzung für die Strukturaufklärung - eröffneten dabei den Weg und führten zum Einsatz von Massenspektrometern in der chemischen Analytik organischer Verbindungen. Lange Zeit waren biochemische Makromoleküle für die massenspektrometrische Analyse nicht zugänglich. Die Schwerflüchtigkeit und thermische Instabilität dieser großen Verbindungen

und die Notwendigkeit, den Analyten in die Gasphase zu überführen, stellten zunächst unüberbrückbare Hürden dar. 1966 gelang die erste massenspektrometrische Sequenzierung eines Oligopeptides, welches vorher reduktiv ins Polyamin überführt und somit verdampfbar wurde^[88]. Ein echter Durchbruch gelang aber erst mit einer neuen schonenden Ionisationsquelle, der Elektrospray Ionisation (ESI), die von Dole im Jahre 1968 vorgestellt wurde^[89]. Der potentielle Nutzen für die Analyse von Biomolekülen wurde aber erst zwanzig Jahre später realisiert. 1984 kombinierte John B. Fenn die Elektrospray Ionisation mit einem Massenanalysator und eröffnete somit den Weg zur Untersuchung schwerflüchtiger Verbindungen mit Hilfe der MS^[90]. Seine Arbeit auf diesem Gebiet wurde 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt^[91]. Der Siegeszug der Massenspektrometrie führte zur kontinuierlichen Weiterentwicklung und Verbesserung der Ionenquellen und Analysatoren, so dass heute mit Hilfe der Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) und der Orbitrap Techniken zur Verfügung stehen, deren extrem hohe Auflösungen zur Bestimmung der akkuraten Masse genutzt werden können.

1.4.2 Genereller Aufbau eines Massenspektrometers

Die Funktionsweise eines Massenspektrometers lässt sich grundlegend in drei Hauptkomponenten zerlegen: Die Ionenquelle, den Massenanalysator und den Detektor. Das Grundprinzip der Massenspektrometrie besteht darin, den Analyten zu ionisieren und diese Ionen nach ihrem Masse zu Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) aufzutrennen und schließlich qualitativ und quantitativ zu detektieren.

1.4.2.1 Die Ionenquelle

Die Ionisation der Analytmoleküle in der Quelle kann durch thermische oder elektrische Felder erfolgen, oder mit dem Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen oder Photonen erreicht werden. Dabei steht eine große Auswahl an Ionisationsmöglichkeiten zur Verfügung, die kurz dargestellt werden sollen.

Die gebräuchlichste Ionenquelle ist die Elektronenstoßionisation (EI), bei der die gasförmige Probe durch den Beschuss hochenergetischer Elektronen (70 eV) und das dadurch bedingte „Herausschlagen“ eines, oder seltener zwei, Elektronen ionisiert wird. Diese sog. harte Ionisierungsmethode führt zu instabilen Kationen, die bereits kurze Zeit später fragmentieren und Zerfallskaskaden unterliegen.

Die chemische Ionisation (CI) wendet die EI-Technik zunächst auf ein Gas an, welches ionisiert wird, mit dem Analyten reagiert und Analytionen bildet. Die Technik führt zu etwas geringeren Fragmentierungsgraden.

Festkörper und Flüssigkeiten können durch den Beschuss mit Atomen ionisiert werden. Diese Methode wird Fast Atom Bombardement (FAB) genannt.

Schonender gelingt die Ionisation durch den Einsatz von ESI-Quellen. Bei dieser Methode wird der gelöste Analyt, durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, in ein Spray aus hochgeladenen „Tröpfchen“ überführt, die durch Abdampfen des Solvens letztlich „nackte“ Molekülonen liefern.

Die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) funktioniert ähnlich wie die ESI, mit dem Unterschied, dass die Lösung des Analyten erst verdampft wird und der erzeugte Gasstrom anschließend durch ein elektrisches Feld ionisiert wird.

Eine weitere schonende Ionisationsmethode stellt der Einsatz von Laserlicht bei der sog. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) dar. Hierbei werden Analytionen durch Photonenbeschuss einer Trägermatrix erzeugt. Die Ionenquelle ist im Gegensatz zur ESI oder APCI Quelle nicht an ein chromatographisches System koppelbar^[92,93,94].

1.4.2.2 Der Analysator

Der Analysator dient der Separation der Ionen nach ihrem Masse zu Ladungs-Verhältnis. Dabei stehen verschiedene Techniken zur Verfügung.

Die Sektorfeld-Analysatoren arbeiten durch ein elektrisches und magnetisches Sektorfeldes, das senkrecht zur Flugbahn der Ionen angelegt wird, wodurch diese abgelenkt werden können.

Bei den Quadrupolanalysatoren wird mit der zeitlichen Überlagerung konstanter und hochfrequenter Wechselfelder in einem linearen Quadrupol gearbeitet. Das senkrechte Durchfliegen der vier Metallstäbe des Quadrupols wird dabei nur Ionen ermöglicht, die aufgrund ihres m/z -Verhältnisses, das Wechselfeld passieren können. Darauf beruht die Massenselektion. Die anderen Ionen werden aus dem Einflussbereich des elektromagnetischen Feldes heraus beschleunigt.

Das Flugzeitmassenspektrometer (engl. time of flight; TOF-MS) nutzt die Tatsache, dass die in den Analysator eintretenden Ionen die gleiche Energie besitzen. Aus der Formel für die kinetische Energie ergibt es sich, dass leichtere Ionen eine höhere Geschwindigkeit aufweisen

als schwerere und somit weitere Flugstrecken zurücklegen können. Die Messung der Flugstrecke bzw. -zeit ermöglicht die Massenselektion.

Die Ionenfallen-Massspektrometer arbeiten mit der Speicherung der Ionen in einer sog. Paul-Falle^[95]. Dabei kann die Quadrupol-Ionenfalle, in der ein elektrisches Quadrupolfeld zwischen einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden erzeugt wird, für die Stabilisierung und Speicherung der Ionen genutzt werden. Eine Weiterentwicklung stellt die lineare Ionenfalle dar, bei der statt einem dreidimensionalen ein zweidimensionales elektrisches Feld für die Speicherung der Ionen genutzt wird. Dadurch erhöht sich die Speicherkapazität der Ionenfalle. Die Ionen werden durch ein zusätzliches Randfeld in der Falle gehalten. Die Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer arbeiten mit einem homogenen Magnetfeld, indem die Ionen auf eine stabile Kreisbahn gebracht werden. Durch Einstrahlen eines elektrischen Wechselfeldes kann, bei Übereinstimmung der Feldfrequenz mit dem Cyclotron-Radius des Ions, Resonanz erzeugt werden. Durch Aufnahme von Energie wird der Cyclotron-Radius des Ions vergrößert. Dieses Signal ist messbar. Durch Modulation der Resonanzfrequenz können alle Ionen angeregt werden und ihre Signale nach Fouriertransformation zur Massenselektion genutzt werden. Dabei wird der Analyt nicht verbraucht, so dass extrem hohe Auflösungen möglich werden. Auf ähnlichen Grundlagen basierend arbeitet die Orbitrap, eine Weiterentwicklung der klassischen Ionenfalle. Im Gegensatz zum FT-ICR-MS werden die Kreisbahnen der Ionen hier durch elektrostatische statt magnetischer Felder stabilisiert^[92,93,94].

1.4.2.3 Der Detektor

In den Anfängen der Massenspektrometrie wurden Fotoplatten als Detektoren verwendet. Mittlerweile werden hauptsächlich Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), Faraday-Auffänger und Channeltrons verwendet.

Der SEV verstärkt das eintreffende elektrische Signal um ein vielfaches. Das auftreffende Ion löst dabei Sekundärelektronen aus einem Metall oder Halbleiter. Diese werden durch ein elektrisches Feld auf weitere Dynoden hin beschleunigt, wo sie ihrerseits Sekundärelektronen heraus schlagen. Dadurch kann eine Verstärkung von 3 bis 10 Zehnerpotenzen des ursprünglichen elektrischen Signals erzeugt werden. Beim Faraday-Auffänger oder Faraday-Becher werden Ionen in einem Metallbecher mit konstantem Potential geschossen. Die Abführung des Ionenstroms erfolgt über einen hohen Widerstand, an dem ein Spannungsabfall zu beobachten ist. Dieser kann gemessen und zur Berechnung des

Ionenstroms herangezogen werden. Beim Channeltron werden die durch das Primärteilchen heraus geschlagenen Sekundärelektronen zu einer „Elektronenlawine“ vervielfältigt und über ein gebogenes Glasröhrchen kontinuierlich abgeführt. Dadurch ist es möglich die Primärteilchen zu zählen und so den absoluten Ionenstrom zu bestimmen^[92,93,94].

1.4.3 ESI-IT-MS

Da sämtliche massenspektrometrischen Daten der vorliegenden Arbeit auf dem LCQ der Firma Thermo Finnigan gemessen wurden und es sich bei diesem Gerät um eine lineare Ionenfalle mit angeschlossener ESI-Quelle handelt, sollen im Folgenden die ESI sowie die Ionenfalle nochmals genauer beschrieben werden.

1.4.3.1 Elektrospray Ionisation

Die von John B. Fenn etablierte Elektrospray Ionisation^[96] gehört wie auch die APCI zu den Ionisationsverfahren, die unter Atmosphärendruck arbeiten. Bei dieser Methode wird, wie in Abb. 1 illustriert, ein gelöster Analyt über eine Austrittskapillare, an deren Spitze eine elektrische Spannung von mehreren kV angelegt ist, eingeleitet. Die Spannung erzeugt ein elektrisches Feld zwischen der Austrittskapillare und der Gegenelektrode, das die Analytlösung durchdringt und zur Bildung von geladenen Tröpfchen in Form eines Taylor-Kegels führt. Die Tröpfchen werden anschließend u.a. durch die Verwendung eines Spraygases (meist N₂) vernebelt. Die hochgeladenen Tropfen des Sprays werden auf ihrem Weg zum Analysator, über einen Druck- und Potentialgradienten, durch eine beheizte Transferkapillare geleitet, welche für die Verdampfung des Solvens sorgt. Die Verringerung der Solvenströpfchen bei gleich bleibender Ladungsmenge führt nach Überschreiten des Rayleigh Limits zu Coulomb-Explosionen der Tröpfchen. Dabei entstehen mehrere kleinere Tröpfchen, deren Oberfläche wieder groß genug ist, um die Anzahl an Ladungen unter dem Rayleigh Limit zu halten. Am Ende dieses Prozesses werden „nackte“, desolvatisierte Analytionen erhalten und dem Analysator zugeführt^[92,93,94].

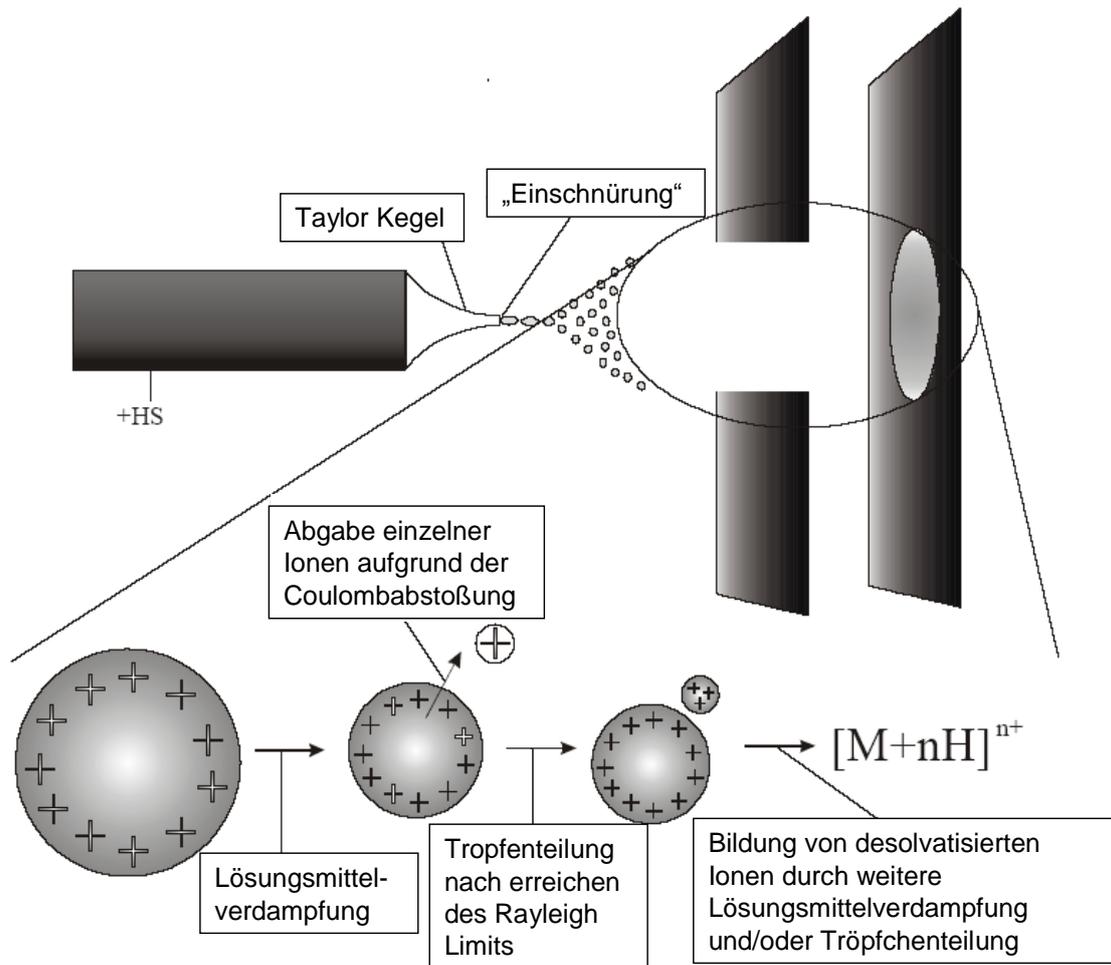


Abb. 1: Schematische Darstellung der Ionenerzeugung mit ESI

1.4.3.2 Die Ionenfallen-Analysatoren

Für die von W. Paul im Jahre 1959 erarbeiteten Grundlagen im Bereich der Quadrupol- und Ionenfallen-Analysatoren und die kontinuierliche Weiterentwicklung der Ionenfalle, wurde Paul im Jahre 1989 mit dem Nobelpreis für Physik geehrt^[95].

Eine schematische Darstellung einer Ionenfalle ist in Abb. 2 dargestellt. Die Ionen erreichen die Falle über einen Transferoktopol. Die Falle besteht aus drei Stahlelektroden: der oberen und unteren Endkappe sowie der Ringelektrode. Über diese wird ein Quadrupolfeld erzeugt, indem die Ionen auf einer stabilen Flugbahn gehalten werden und so über längere Zeit gespeichert werden können. Hierzu wird über die Ringelektrode eine elektrische Gleichspannung erzeugt, über das ein Wechselfeld moduliert werden kann, welches sich im Bereich der Radiofrequenzen befindet. Die mit hoher kinetischer Energie eintretenden Ionen werden in der Falle durch ein sog. Badegas (meist He) gebremst und werden so im Zentrum

des Quadrupolfeldes fokussiert. Durch geeignete Interferenz der modulierbaren Wechselspannung mit den Ionen, können nun Ionen mit definiertem m/z -Verhältnis, über die perforierten parabolischen Endkappen, heraus beschleunigt werden. Hierüber erfolgt die Massenselektion^[97]. Der Vorteil der Ionenfalle ist die diskontinuierliche Massendetektion. Sie ermöglicht es die gefangenen Ionen, vor dem Verlassen der Falle, durch Radiofrequenzen so anzuregen, dass ein Zerfall der Ionen beobachtet wird, der zur Fragmentierung der Mutterionen genutzt werden kann. Auch die entstehenden Tochterionen können in der Falle gehalten und selektiert oder weiter fragmentiert werden, woraus die Möglichkeit der MS/MS und MSⁿ Experimente hervorging. Diese sind für die Strukturanalyse unerlässlich^[92,93,94].

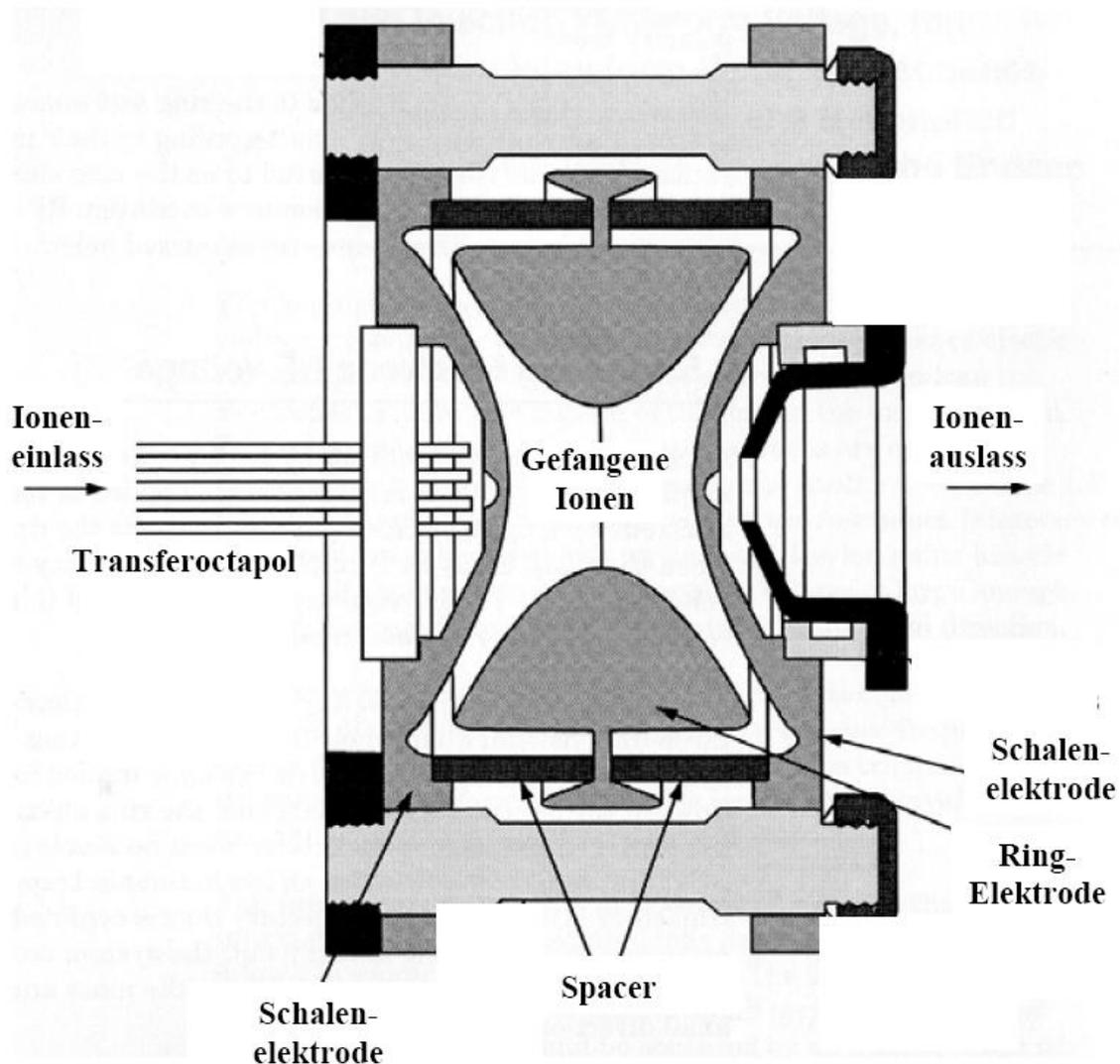


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Ionenfalle

2 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll im ersten Teil erforscht werden, wie Aminosäuren in Proteinen gezielt oxidativ geschädigt werden können. Die Arbeit fokussiert sich dabei auf die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, sowie dessen oxidierte Form, das Cystin. Als Hauptaugenmerk gilt, welche Aminosäuren von der Schädigung betroffen sind, welche Veränderung eintritt und vor allem wie sich diese chromatographisch und massenspektrometrisch beschreiben lässt. Es sollen auch Unterschiede herausgearbeitet werden, die aus der Verwendung intakter Proteine oder Peptidgemische hervorgehen und Möglichkeiten gefunden werden, gezielt einzelne Aminosäuren im Peptid zu modifizieren und zu untersuchen. Dabei wird sowohl qualitativen wie auch quantitativen Aspekten Rechnung getragen. Es soll untersucht werden, ob die eingetretenen Schäden reversibel sind und u.U. für Aussagen der Gesamtschädigung des Proteins herangezogen werden können.

Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Etablierung neuer analytischer Methoden zur Proteinstrukturaufklärung, anhand der im ersten Teil gewonnenen Erkenntnisse. Es sollen Verfahren entwickelt, optimiert und etabliert werden, mit deren Hilfe gezielt durch oxidative Schädigung ein Erkenntnisgewinn über die Peptidsequenz und insbesondere die Disulfidbrückenverknüpfung erhältlich ist. Hierzu sollen die Möglichkeiten der selektiven Oxidation eingesetzt werden, um Aussagen über im Peptid eingebaute Aminosäuren zu treffen. Mit Hilfe dieser Informationen, geeigneten Programmen und analytischem Sachverstand sollen Wege gefunden werden, unbekannte Peptide leichter und schneller aufzuklären. Ferner wird eine neue Methode auf Basis oxidativer Schädigung gesucht, mit der sich Disulfidbrücken massenspektrometrisch identifizieren lassen und Verknüpfungen aufgeklärt werden. Die Methoden sollen, soweit möglich oder nötig, durch den Einsatz verschiedener Oxidationsmittel und Katalysatoren verbessert werden. Letztlich sollen analytische Verfahren, basierend auf Chromatographie und Massenspektrometrie, zur

Verfügung stehen, mit denen je nach Anwendungsgebiet schnell, einfach und wirtschaftlich Routineanalysen im Bereich der Proteomforschung durchführbar sind.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten p.a. Qualität und wurden von folgenden Herstellern bezogen: Biorad, Fluka, Merck, Riedel-de Haën, Roth und Sigma-Aldrich, Nach SOP LA-004-7 der Firma A&M STABTEST waren alle Chemikalien, wenn nicht vom Hersteller anders angegeben, nach Öffnung ein Jahr haltbar und wurden danach ersetzt. Der Terminus „Wasser“ bezeichnet das mit Hilfe einer Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q Advantage A10, Millipore, Schwalbach) entionisierte und gereinigte Wasser, welches den Kriterien der Ph.Eur. 6.0 vol. 2 in Bezug auf Leitfähigkeit ($\leq 4,3 \mu\text{S}/\text{cm}$ bei 20°C) und TOC-Gehalt ($\leq 0,5 \text{ ppm}$) entspricht. Laufmittel und Laufmittelzusätze für LC-MS Messungen waren von ultrareiner Qualität und wurden von Fisher (Acetonitril), Sigma (Pentanol, Triethylamin), Fluka (TFA) und Merck (Ammoniak) bezogen. Angesetzte Eluenten waren eine Woche haltbar. Angefertigte Pufferlösungen hatten eine Haltbarkeit von einer Woche bei RT bzw. einem Monat bei $2-8^\circ\text{C}$ und wurden danach ersetzt.

3.1.2 Proteine, Enzyme und Peptide

Alle verwendeten Peptide und Proteine sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Bezeichnung	Hersteller
Apamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Endoproteinase V8 aus staphylococcus aureus (GluC)	Fluka, Taufkirchen
Glutathion oxidierte Form (GSSG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
intravenöse Immunglobulin G Präparation (IgG)	Bayer, Leverkusen
Katalase	Amersham Bioscience, Freiburg
Lysylendoproteinase (LysC)	Wako, Neuss
Somatostatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin (modifiziert)	Roche, Mannheim

Tab. 2: Bezugsquellen der verwendeten Peptide und Proteine

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Das verwendete Verbrauchsmaterial ist in Tab. 3 zusammengestellt.

Material	Hersteller
Bradford Proteinassay	Biorad, München
Küvetten (Polystyrol)	Biorad, München
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen für die Ultrafiltration (Amicon 30)	Millipore, Eschborn
HPLC-Vials	CZT, Kriftel
Vial-Deckel	CZT, Kriftel

Tab. 3: Verwendetes Verbrauchsmaterial

3.1.4 Geräte

Alle für die massenspektrometrische Untersuchung verwendeten Geräte sind in Tab. 4 zusammengestellt. Sonstige Gerätschaften sind in Tab. 5 aufgelistet.

Gerät, Bezeichnung	Hersteller
Massenspektrometer, <i>LCQ (ESI-IT-MS)</i>	Thermo Finnigan, Bremen
HPLC-Degasser, <i>Degasys DG-1210</i>	Uniflows, Tokyo
HPLC-Pumpe, <i>HP Series 1100, G1312A</i>	Agilent, Böblingen
HPLC-Probengeber, <i>HP Series 1100, G1313A</i>	Agilent, Böblingen
HPLC-Säulenofen, <i>CTO-10AS</i>	Shimadzu, Duisburg

Tab. 4: Geräte für die LC-MS Analytik

Gerät, Bezeichnung/Typ	Hersteller
Analysenwaage, <i>AX 205 Delta Range</i>	Mettler Toledo, Giessen
Heizblock, <i>Digital Heatblock</i>	VWR, Darmstadt
Laborwaage, <i>BKK 422-6 DSM</i>	Mettler Toledo, Giessen
pH-Elektrode, <i>InLab Semi-Micro pH</i>	Mettler Toledo, Giessen
pH-Meter, <i>Seven Multi</i>	Mettler Toledo, Giessen
Pipetten, <i>Reference</i>	Eppendorf, Wesseling
Reinstwasseranlage, <i>Milli-Q Advantage A10</i>	Millipore, Schwalbach
Spektralphotometer, <i>UV-1602</i>	Shimadzu, Duisburg
Ultraschallbad, <i>Sonorex Super RK 510</i>	Bandelin, Berlin
Vakuumpumpe	KNF Lab, Freiburg
Wasserbad, <i>EH2</i>	Janke&Kunkel, Staufen
Zentrifuge, <i>Multifuge 3</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge, <i>Biofuge fresco</i>	Haraeus, Hanau

Tab. 5: Sonstige verwendete Gerätschaften

3.1.5 Verwendete Software

Für die Aufnahme, Verarbeitung, Darstellung und Interpretation von Daten wurden neben den Microsoft Office Anwendungen die in Tab. 6 aufgelisteten Programme verwendet.

Programm	Version	Beschreibung	Hersteller
ClassVP	6.14	Programm zur PC-gestützten Steuerung von HPLC-Anlagen	Shimadzu, Duisburg
GPMAW	7.10sr1	Programm zur Simulation von Peptidsequenzen und massenspektrometrischen Fragmentierungen	Lighthouse Data, Odense
LC Quan	2.5.6	Programm zur Quantifizierung von Analyten aus massenspektrometrischen Ionenchromatogrammen	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
QualBrowser	1.3	Programm zur Darstellung massenspektrometrischer Daten	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
UV-Probe	2.31	Programm zur Steuerung des UV/Vis-Spektrometers und zur Auswertung der Spektren	Shimadzu, Duisburg
Xcalibur	2.0.7	Programm zur PC-gestützten Steuerung von Massenspektrometern	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Tab. 6: Übersicht über die verwendete Software

3.2 Präparative Methoden

3.2.1 Präparation von Proteinproben und enzymatischer Verdau

3.2.1.1 Reduktion und S-Carboxymethylierung von IgG

Eine entsprechende Menge humanes polyklonales IgG wurde in 0,5 mL Reduktionspuffer gelöst, so dass eine Proteinkonzentration von 2 mg/mL erhalten wurde. Nach Zugabe eines 3-fachen molaren Überschusses an 1,4-Dithiothreitol (DTT-Lösung), bezogen auf die Anzahl an Cysteinresten pro Mol Protein, wurde 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden 4 äq. Iodessigsäure (IAA-Lösung), bezogen auf die DTT Menge, zum Alkylieren der Thiolgruppen zugesetzt und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Überführung in mit Verdauopuffer vorgespülte Amicon-Röhrchen, wurden die Proben zweimal mit Verdauopuffer durch Ultrazentrifugation (20 min; 4000 U/min; *Multifuge 3*, Thermo Fisher Scientific) umgepuffert. Die aufkonzentrierten Proben (100-250 µL) wurden in Reagiergefäße überführt und mit Verdauopuffer auf 1 mL aufgefüllt, so dass eine finale Proteinkonzentration von 1 mg/mL erreicht wurde.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Reduktionspuffer	7,5 M Harnstoff, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 (eingestellt mit HCl)
Verdauopuffer	10 mM Ammoniumacetat, pH 5 (eingestellt mit Essigsäure)
DTT-Lösung	0,5 M (77 mg in 1mL H ₂ O)
IAA-Lösung	0,5 M (93 mg in 1mL H ₂ O)

Tab. 7: Verwendete Puffer und Lösungen für die reduktive Alkylierung von IgG

3.2.1.2 Proteolytischer Verdau von reaktiv alkyliertem IgG mit V8 Protease

Der vorbereiteten Probe wurden 5 µL einer 10 mg/mL V8-Protease (GluC) Stocklösung zugesetzt. Nach einer Verdauzeit von 5 h bei 37 °C im Wasserbad wurde die enzymatische Hydrolyse durch Zusatz von 30 µL einer 10 %igen Ameisensäurelösung (pH < 3) gestoppt.

3.2.1.3 Proteolytischer Verdau von Somatostatin mit Lysylendoproteinase (LysC)

1 mg Somatostatin wurde in 1 mL Wasser rekonstituiert, zu je 100 μ L aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Ein Aliquot wurde mit Wasser auf 1 mL aufgefüllt (Proteinkonzentration: 100 μ g/mL) und mit 1 μ L einer 3 mg/mL LysC-Lösung versetzt. Die Hydrolyse lief 4 h bei 37 °C und wurde per LC-MS auf Vollständigkeit hin überprüft. Die Hydrolyseaktivität der Protease wurde durch Zusatz von 10 μ L einer 10 %igen Ameisensäurelösung gestoppt.

3.2.1.4 Proteolytischer Verdau von Apamin mit Trypsin

500 μ g Apamin wurden in 500 μ L Wasser rekonstituiert, zu je 100 μ L aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Ein Aliquot wurde mit 380 μ L Wasser, 10 μ L Tris-HCl pH 8,5 und 10 μ L einer 0,5 mg/mL Trypsin-Lösung (finale Proteinkonzentration: 200 μ g/mL; pH 7-8) versetzt und 16 h bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit 10 μ L HCOOH (10 %ig) beendet.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
GluC-Lösung	1 mg Protein in 100 μ L Wasser
LysC-Lösung	300 μ g Protein in 100 μ L Wasser
Trypsin-Lösung	25 μ g Protein in 50 μ L 1 %iger Essigsäure
Tris-HCl-Puffer pH 8,5	500 mM Tris, pH eingestellt mit HCl
Ameisensäurelösung	10 vol% HCOOH in Wasser

Tab. 8: Verwendete Puffer und Lösungen für den proteolytischen Verdau diverser Proteine und Peptide

3.2.2 Oxidationsversuche

Bei allen Oxidationsversuchen wurden die Konzentrationen der Stocklösungen der zugesetzten Reagenzien so gewählt, dass die resultierende Volumenänderung insgesamt ≤ 5 % war.

3.2.2.1 Oxidation von reaktiv alkyliertem GluC-Verdau des IgG Materials

Einem fertigen, durch Ansäuern gestoppten, IgG GluC-Verdau wurden je nach Versuch 100 äq., 500 äq. oder 2000 äq. H_2O_2 , bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Proteinmenge, zugesetzt. Die Oxidation wurde nach 3 h bei 37 °C durch den Zusatz von 10 μL einer 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Katalase-Lösung, die für die rasche Zersetzung des verwendeten H_2O_2 sorgt, beendet.

3.2.2.2 Oxidation von intaktem IgG

Eine 1 mg/mL IgG Lösung in 10 mM Ammoniumacetatpuffer pH 5 wurde mit 30 μL 10 %iger Ameisensäure versetzt und je nach Versuch mit 100, 500 oder 2000 äq. H_2O_2 oxidiert. Das Oxidationsmittel wurde nach 3 h durch Umpuffern mit Reduktionspuffer (s. Tab. 7) entfernt und die Probe für den sich anschließenden Verdau vorbereitet (s. Kap. 3.2.1.1).

3.2.2.3 Oxidation von Somatostatin

Die mit LsyC geschnittenen Somatostatinproben wurden mit 2000 äq. H_2O_2 versetzt und bei RT oxidiert. Die Oxidationszeit hing vom durchgeführten Versuch ab und betrug für das Monitoring des Reaktionsfortschritts 150 min. Die Analyse der Oxidationsprodukte wurde nach Oxidationszeiten > 100 min, nachdem genug Produkt enthalten war, durchgeführt.

3.2.2.4 Oxidation von Apamin

250 μL (entsprechend 50 μg Protein) der mit Trypsin verdauten Apaminproben wurden mit 8000 äq. H_2O_2 versetzt und bei RT 6 h oxidiert. Das Fortschreiten der Oxidation wurde massenspektrometrisch verfolgt.

3.2.2.5 Oxidation von Glutathion (GSSG) für das Reaktionsmonitoring

im Sauren (pH 3):

94,3 μL Ameisensäure cc. wurden mit Wasser auf 200 mL aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden ca. 15 mL Natriumformiat ($c = 10 \text{ mM}$) gegeben, um pH 3 einzustellen. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Messgerät kontrolliert (SevenMulti, Mettler Toledo). Dann wurde auf ein Endvolumen von 250 mL mit Wasser aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug 10 mmol/L. Ca. 1 mg GSSG wurden in der entsprechenden Menge Natriumformiat-Puffer gelöst, so dass ein Gehalt von 1 mg/mL erhalten wurde. Zu 1 mL dieser Lösung wurden 16,7 μL H_2O_2

(30 %ig), entsprechend 100 äq., gegeben. Die Mischung wurde gevortext und in ein Vial überführt. Die Oxidation verlief bei RT für die Kinetik-Studie 1000 min, für die Fragmentierungsexperimente 300 min.

im Basischen (pH 11):

172,2 µL Methylamin (40 % w/w) wurden in 150 mL Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl (ca. 10 Tropfen) auf pH 11 eingestellt. Das Volumen wurde auf 200 mL aufgefüllt, so dass eine 10 mM Lösung entstand.

Ca. 1 mg GSSG wurde in der entsprechenden Menge Methylamin-Puffer gelöst, so dass ein Gehalt von 1 mg/mL erhalten wurde. Zu 1 mL dieser Lösung wurden 16,7 µL H₂O₂ (30 %ig), entsprechend 100 äq., gegeben. Die Mischung wurde gevortext und in ein Vial überführt. Die Oxidation verlief 1000 min.

3.2.2.6 Oxidation von Glutathion (GSSG) zur Methodenoptimierung und für kinetische Untersuchungen

Für die Versuche zur Methodenoptimierung bzw. der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurden je 1 mg/mL GSSG-Lösungen verwendet.

Alle Versuchansätze wurden, wenn nicht anders angegeben, vor der Analytik direkt im HPLC Vial 1:10 mit Wasser auf eine Endkonzentration von 100 µg/mL verdünnt. Dazu wurden 100 µL des Reaktionsansatzes zum Zeitpunkt $t = 0$ min in ein Vial, das 900 µL Wasser enthielt, überführt und dieses verschlossen und gevortext.

Oxidation mit Säure- oder Pufferzusatz

Die wässrige GSSG-Lösung wurde zunächst mit der zu untersuchenden Säure, bzw. dem entsprechenden Ammoniumsalz-Puffer versetzt. Nach Überprüfung des pH-Wertes mit Universalindikatorpapier wurden 100 äq. H₂O₂ zugesetzt. Die Oxidationszeit war vom Versuch abhängig und betrug bis zu 1000 min. Die genauen Versuchsanordnungen sind in Tab. 16 (Kap. 4.2.4.1) beschrieben.

Oxidation unter basischen Bedingungen

Eine entsprechende Menge GSSG wurde in einer 1 M Tris-HCl Lösung pH 9 bzw. in 1 M NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer pH 9 gelöst, so dass eine Konzentration von 1 mg/mL erreicht wurde. 1 mL dieser Lösung wurde mit 100 äq. H₂O₂ versetzt und bis zu 1000 min bei RT oxidiert.

Oxidation mit Peressigsäure, Perpropionsäure und mCPBA

Der wässrigen GSSG-Lösung (1 mg/mL) wurden direkt die zu untersuchenden Persäuren zugesetzt. Dabei wurden von der Peressig- und der Perpropionsäure 1 äq. und vom mCPBA 0,7 äq. verwendet. Peressig- und Perpropionsäure wurden vorher durch Mischung äquivalenter Mengen H_2O_2 und der entsprechenden org. Säure im Heizblock bei 60°C über Nacht synthetisiert.

Oxidation mit MoO_2Cl_2

Der wässrigen GSSG-Lösung (1 mg/mL) wurden zunächst 10 μL einer 0,24 mol/l wässrigen MoO_2Cl_2 -Lösung (entsprechend 1,5 äq. MoO_2Cl_2) zugegeben. Nach kurzem vortexen wurden 2 äq. H_2O_2 zugesetzt.

Oxidation mit Hexafluorisopropanol-Zusatz

Der wässrigen GSSG-Lösung (1 mg/mL) wurden 100 äq. H_2O_2 zugesetzt. 100 μL dieser Lösung wurden in ein Vial, welches 800 μL Wasser und 100 μL HFIP enthielt, gegeben und gevortext.

3.2.3 *Derivatisierung von Methioninsulfoxid*

3.2.3.1 Derivatisierung von Methioninsulfoxid durch Mikrowellenstrahlung

Eine entsprechende Menge Methioninsulfoxid wurde eingewogen und in Wasser gelöst, so dass eine Konzentration von 100 mmol/l erhalten wurde.

Für die druckfest verschlossenen Ansätze wurden je 300 μl der Lösung in ein 20 ml Glasgefäß pipettiert, welches mit Hilfe einer Vialzange mit einem Verschlussaufsatz fest verschlossen wurde. Nach beendeter Bestrahlung ($t = 1, 2, 5$ und 10 min) in der Mikrowelle (MW 311, Delonghi, $p = 800$ W) wurde das Gefäß zum Abkühlen stehen gelassen, geöffnet und die Lösung entnommen.

Für die offenen Ansätze wurden 300 μl der Lösung in ein 10 ml Glasgefäß überführt und offen in der Mikrowelle bestrahlt. Je nach Bestrahlungszeit ($t = 1, 2, 5$ und 10 min) wurde die Lösung bis zur Trockne eingengt. Die zur Trockne eingengten Ansätze wurden erneut in 300 μl Wasser aufgenommen.

3.2.3.2 Derivatisierung von Methioninsulfoxid durch Oxidation

Herstellung der Kaliumsuperoxid-Lösung in DMSO

DMSO wurde vor der Verwendung mit Calciumchlorid getrocknet und über Molekularsieb (3Å) aufbewahrt. 18-Krone-6 wurde in einer entsprechenden Menge gelöst, so dass man eine 15 mM Lösung erhielt.

Ca. 1 mg KO_2 wurde auf einem Reagiergefäß-Deckel (Eppendorf) eingewogen, welches sofort auf ein mit 1 mL der 15 mM 18-Krone-6 Lösung befülltes 2 mL Reagiergefäß aufgesetzt wurde. Das verschlossene Reagiergefäß wurde geschüttelt, um Durchmischung zu erlangen. Daraufhin wurde mit 15 mM 18-Krone-6 in DMSO aufgefüllt, so dass eine 10 mM Lösung erhalten wurde. Diese wurde zum Lösen des KO_2 10 min im Ultraschall behandelt. Die Lösung wurde für jeden Versuch frisch angesetzt. So hergestellte Lösungen sind bei RT ca. 30 min stabil, d.h. die Konzentrationsabnahme beträgt weniger als 10 %^[98].

Oxidation von Methionin bzw. Methioninsulfoxid mit KO_2

Zu 500 µl einer 10 mM Lösung in Wasser oder DMSO des entsprechenden Substrats, versetzt mit jeweils 10 µl Katalase [1 mg/mL Wasser], wurden über einen Injektor (Infusionssystem des Massenspektrometers LCQ, Thermo Finnigan) 500 µl der frisch angesetzten KO_2 -Lösung bei einem Fluss von 5 µl/min gegeben. Die Probe wurde von Zeit zu Zeit manuell durchmischt.

Oxidation von Methionin bzw. Methioninsulfoxid mit Hypoxanthin/Xanthinoxidase (HX/XO)

10 mg HX wurden in 10 mL Wasser durch 10 minütige Ultraschall-Behandlung gelöst. Zu 900 µl dieser Lösung wurden 100 µl der 100 mM Methionin bzw. Methioninsulfoxid Lösung gegeben. Dazu wurden 10 µl Katalase [1 mg/mL] und anschließend 10 µl XO in Wasser [0,1 U/µl] pipettiert.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 *Manganometrische Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration*

Da die Konzentration der kommerziell erhältlichen Wasserstoffperoxid-Stammlösung mit der Zeit abnimmt, musste die aktuelle Konzentration in regelmäßigen Abständen ermittelt werden. Dazu wurde eine Titration mit frisch angesetzter Kaliumpermanganatlösung, wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt^[99].

3.3.2 *UV/Vis-Spektroskopische Untersuchungen*

3.3.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Methode von Bradford

Bei dieser Methode werden Proteinkonzentrationen spektralphotometrisch bestimmt. Nach Anfärben der Proteinlösung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, absorbiert der Protein-Farbstoff-Komplex bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zur Berechnung der Probenkonzentration wurde gegen eine Standardreihe mit BSA gemessen. Der Ansatz der Standard-Kalibrierlösungen wird ausgehend vom Gehaltsstandard (GS) mit einer Konzentration von 1,5 mg/mL durch Verdünnung hergestellt und ist in Tab. 9 zusammengefasst. Je 800 µL der hergestellten Verdünnungen wurden mit 200 µL Bradford-Reagenz (Biorad, München) angefärbt, kurz gevortext und in 1 mL Halbmikroküvetten aus Polystyrol (Biorad, München) überführt.

Nach einer Doppelbestimmung der Extinktion der Verdünnungen K5-K40 im Spektralphotometer (*UV-1602*, Shimadzu) wurde eine Regressionskurve ermittelt, deren Gleichung zur Berechnung der Proteinkonzentration der Probe verwendet wurde. Die Extinktion der zu untersuchenden Probe wurde aus drei Doppelbestimmungen eines 5000-fach verdünnten Ansatzes ermittelt.

3.3.2.2 Bestimmung der Absorptionsmaxima von Methionin und Methioninsulfoxid

Zur Bestimmung der Absorptionsspektren von Methionin und Methioninsulfoxid wurden 500 µM Lösungen angesetzt und in einer Halbmikroküvette aus Quarzglas, bei einer Scangeschwindigkeit von 1 nm/s und einer Spaltbreite von 1 nm, gegen Wasser als Referenz gemessen.

Lösung	Ansatz	Konzentration
K100	200 µL GS + 1800 µL H ₂ O	150 µg/mL
K40	50 µL GS + 1825 µL H ₂ O	40 µg/mL
K30	50 µL GS + 2450 µL H ₂ O	30 µg/mL
K20	50 µL GS + 3700 µL H ₂ O	20 µg/mL
K15	200 µL K100 + 1800 µL H ₂ O	15 µg/mL
K10	200 µL K100 + 2800 µL H ₂ O	10 µg/mL
K7,5	100 µL K100 + 1900 µL H ₂ O	7,5 µg/mL
K5	200 µL K100 + 2900 µL H ₂ O	5 µg/mL

Tab. 9: Verdünnungsreihe der BSA-Standardlösung für die Erstellung der Kalibrierreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.3 LC-MS und LC-MS/MS Messungen

Die instrumentelle Analytik der Protein- und Peptidproben wurde mit Hilfe eines LC-MS-Systems durchgeführt. Dafür wurde eine HPLC-Anlage, bestehend aus Degaser (Degasys DG-1210, Uniflows), Probengeber (HP Series 1100, G1313A, Agilent), binärer Pumpe (HP Series 1100, G1312A, Agilent) und Säulenofen (CTO-10AS, Shimadzu), gekoppelt an ein MS (LCQ, Thermo Finnigan) als Detektor, verwendet. Die jeweiligen Parametereinstellungen sind im Folgenden bei den einzelnen Versuchen beschrieben.

Alle Geräte wurden mind. halbjährlich überprüft, gewartet und qualifiziert. Das Massenspektrometer wurde vierteljährlich anhand des Handbuchs mit Referenzmassen neu kalibriert. Für jede neue Messmethode wurde ein eigenes Tunefile erstellt, welches mit Hilfe geeigneter Referenzsubstanzen für den untersuchten Massenbereich größtmögliche Peakintensität lieferte.

3.3.3.1 Messung von Methionin und seinen Derivaten

Die chromatographische Trennung sehr polarer Analyte wie Aminosäuren gelang auf einer starken Kationenaustauschersäule, durch Protonierung der Carboxyl- und Aminogruppe und einer verbesserten Desorption durch den Zusatz von Base im Eluenten B.

HPLC-Bedingungen:

LMA: 1000 mL Wasser + 1 mL TFA

LMB: 1000 mL ACN + 1 mL NH₃

Flussrate: 1 mL/min mit post-column-split 1:5

Säule: TSK Gel SP-SPW (Na⁺-Exchange), Tosoh Bioscience GmbH;
Dimensionen: 75 mm x 7,5 mm, Korngröße: 10 µm

Säulentemperatur: 40°C

Injektionsvolumen: 10-100 µL

Gradient:

t [min]	Anteil LMB [%]
0	10
20	90
22	90
22,1	10
30	10

Einstellungen des Massenspektrometers:

Parameter	Wert
Polarisation	Positiv
Datensatz	Centroid
Sprayspannung	4,55 kV
Sheathgas (N ₂)	80 dl/min
Badegas (N ₂)	10 dl/min
Kapillartemperatur	350°C
Kapillarspannung	0,0 V
Max. Injektionszeit MS	150 ms
Mikroscans/Makroscan MS	2
Max. Injektionszeit MS ²	500 ms
Mikroscans/Makroscan MS ²	5
Ausschlussdauer	30 s
Normalisierte Kollisionsenergie	28 %

3.3.3.2 Messung von GSSG und dessen Oxidationsprodukten

Die chromatographische Trennung von Glutathion und seinen Oxidationsprodukten wurde auf einer 250 mm x 2.0 mm Polaris® 3 C18-Ether Säule von Varian realisiert, welche sich besonders für die Trennung posttranslational veränderter Proteine und Peptide eignet. Der Hauptvorteil dieser Säule ist die vorhandene Wechselwirkung freier Silanolgruppen mit der polaren Ethergruppe, wodurch der Einfluss auf kationische Analyten gemindert wird. Dadurch kann eine hohe Selektivität, Peakhomogenität und Symmetrie erzielt und das Auftreten von Peaktailing verhindert werden. Ferner ist dadurch der Einsatz stark wässriger Eluenten (bis zu 100 % Wasser) und großen pH-Wert Bereichen (1,5-10) möglich, ohne die Lebenszeit der Säule zu verkürzen.

3.3 Analytische Methoden

HPLC-Bedingungen:

LMA: 1000 mL Milli-Q-Wasser + 1 mL TFA
LMB: 1000 mL ACN + 1 mL TFA
Flussrate: 0,2 mL/min
Säule: Polaris Ether 3 C18, Varian GmbH, Dimensionen: 250 x 2,1 mm,
Korngröße: 3 µm
Säulentemperatur: 30°C
Injektionsvolumen: 10 µL

Gradient:

t [min]	Anteil LMB [%]
0	0
15	60
15,1	0
30	0

Einstellungen des Massenspektrometers:

Parameter	Wert
Polarisation	positiv
Datensatz	centroid
Sprayspannung	4,5 kV
Sheathgas (N ₂)	80 dl/min
Badegas (N ₂)	10 dl/min
Kapillartemperatur	220°C
Kapillarspannung	25,0 V
Max. Injektionszeit MS	300 ms
Mikroscans/Makroscan MS	3
Max. Injektionszeit MS ²	500 ms
Mikroscans/Makroscan MS ²	5
Ausschlussdauer	30 s
Normalisierte Kollisionsenergie	33 %

3.3.3.3 Messung von Somatostatin und dessen Oxidationsprodukten

Die Messung von Somatostatin erfolgte auf der für Peptidanalytik gut geeigneten Polaris® 3 C18-Ether Säule, wodurch die Trennung des Disulfidmonooxids vom nativen Somatostatin möglich war.

HPLC-Bedingungen:

LMA: 1000 mL Milli-Q-Wasser + 1 mL TFA

LMB: 1000 mL ACN + 1 mL TFA

Flussrate: 0,2 mL/min

Säule: Polaris Ether 3 C18, Varian GmbH, Dimensionen: 250 x 2,1 mm,
Korngröße: 3 µm

Säulentemperatur: 50°C

Injektionsvolumen: 10 µL

Gradient:

t [min]	Anteil LMB [%]
0	10
20	90
22	90
22,1	10
30	10

3.3 Analytische Methoden

Einstellungen des Massenspektrometers:

Parameter	Wert
Polarisation	positiv
Datensatz	centroid
Sprayspannung	4,55 kV
Sheathgas (N ₂)	80 dl/min
Badegas (N ₂)	10 dl/min
Kapillartemperatur	350°C
Kapillarspannung	0,0 V
Max. Injektionszeit MS	150 ms
Mikroscans/Makroscan MS	2
Max. Injektionszeit MS ²	500 ms
Mikroscans/Makroscan MS ²	5
Ausschlussdauer	30 s
Normalisierte Kollisionsenergie	28 %

3.3.3.4 Messung von Apamin und dessen Oxidationsprodukten

Die Oxidationsprodukte des Apamin ließen sich, unabhängig von den getesteten Säulen und einem flachen Gradienten, chromatographisch nicht vom nativen Peptid abtrennen. Es wurde letztlich die Polaris® 3 C18-Ether Säule, aufgrund ihrer guten Eigenschaften, verwendet.

HPLC-Bedingungen

LMA: 1000 mL Milli-Q-Wasser + 1 mL TFA

LMB: 550 mL Wasser + 400 mL ACN + 50 mL PeOH + 1 mL TFA

Flussrate: 0,2 mL/min

Säule: Polaris Ether 3 C18, Varian GmbH, Dimensionen: 250 x 2,1 mm,
Korngröße: 3 µm

Säulentemperatur: 40°C

Injektionsvolumen: 30 µL

Gradient:

t [min]	Anteil LMB [%]
0	0
25	20
45	25
45,1	80
47	80
47.1	0
60	0

Einstellungen des Massenspektrometers:

Parameter	Wert
Polarisation	Positiv
Datensatz	Centroid
Sprayspannung	4,55 kV
Sheathgas (N ₂)	80 dl/min
Badegas (N ₂)	10 dl/min
Kapillartemperatur	350°C
Kapillarspannung	0,0 V
Max. Injektionszeit MS	150 ms
Mikroscans/Makroscan MS	2
Max. Injektionszeit MS ²	500 ms
Mikroscans/Makroscan MS ²	5
Ausschlussdauer	30 s
Normalisierte Kollisionsenergie	33 %

3.3.3.5 Messung von reaktiv alkyliertem GluC-Verdau des IgG

Die Messungen enzymatisch verdauter Proteinproben wurden mit der Polaris® 3 C18-Ether Säule durchgeführt, da sie eigens für die Analytik solcher Proben entwickelt wurde und gute Performance zeigte. So konnten sowohl die einzelnen Peptide wie auch ihre posttranslational modifizierten Derivate gut getrennt und detektiert werden.

HPLC-Bedingungen

LMA: 1000 mL Wasser + 1 mL TFA
LMB: 550 mL Wasser + 400 mL ACN + 50 mL PeOH + 1 mL TFA
Flussrate: 0,2 mL/min
Säule: Polaris Ether 3 C18, Varian GmbH, Dimensionen: 250 x 2,1 mm,
Korngröße: 3 µm
Säulentemperatur: 50°C
Injektionsvolumen: 100 µL

Gradient:

t [min]	Anteil LMB [%]
0	10
235	80
236	10
250	10

Einstellungen des Massenspektrometers:

Parameter	Wert
Polarisation	Positiv
Datensatz	Centroid
Sprayspannung	4,50 kV
Sheathgas (N ₂)	80 dl/min
Badegas (N ₂)	10 dl/min
Kapillartemperatur	220°C
Kapillarspannung	7,0 V
Max. Injektionszeit MS	150 ms
Mikroscans/Makroscan MS	2
Max. Injektionszeit MS ²	500 ms
Mikroscans/Makroscan MS ²	5
Ausschlussdauer	30 s
Normalisierte Kollisionsenergie	33 %

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Teil 1 – Nachweis geschädigter Aminosäuren in Peptiden und Proteinen

4.1.1 Wahl des Probenmaterials

Die in der Einleitung genannten Alterungsprozesse sollen unter Verwendung eines geeigneten Proteins untersucht werden. Das Protein soll dabei mehrere Anforderungen erfüllen: Die Gesamtheit der vielfältigen Alterungsprozesse muss gut simuliert und untersucht werden können und die erhaltenen Ergebnisse sollten möglichst auf andere Proteine übertragbar sein. Ferner sollte es sich bei dem Protein um einen Wirkstoff mit biopharmazeutischem Interesse handeln, der unter wirtschaftlichen Aspekten in ausreichenden Mengen erhältlich ist.

Aus diesem Grund wurde als Modellsystem ein Gemisch von humanem polyklonalem Immunglobulin G gewählt. Immunglobuline sind Antikörper, welche im Bereich der pharmazeutischen Industrie einen sehr großen Anteil bei den zugelassenen und sich in der Zulassung befindenden biopharmazeutischen Wirkstoffen bilden^[51]. Daher ist die Erforschung ihrer Stabilität bzw. ihrer alterungsbedingten Veränderungen von großem kommerziellen Interesse. Der homologe Aufbau aller Antikörper stellt ein hohes Maß an Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse über den Alterungsprozess von Antikörpern sicher. Bestehend aus ca. 1350 Aminosäuren, mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ca. 145000 g/mol, können alle typischen Alterungsprozesse vielfältig untersucht werden^[100].

Immunglobuline besitzen eine Y-förmige Quartärstruktur bestehend aus je zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die durch intermolekulare Disulfid-Brücken miteinander verknüpft sind (Abb. 3). Die beiden N-terminalen Domänen (V_H und V_L) zeichnen sich durch hohe Sequenzvariabilität aus und bilden zusammen den antigenbindenden Bereich, während die restlichen, konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten die Effektorfunktion vermitteln, aus der C_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} und der zwischen der C_{H1} - und C_{H2} -Domäne lokalisierten *hinge*-Region bestehen und kaum Sequenzvariabilitäten zeigen^[100].

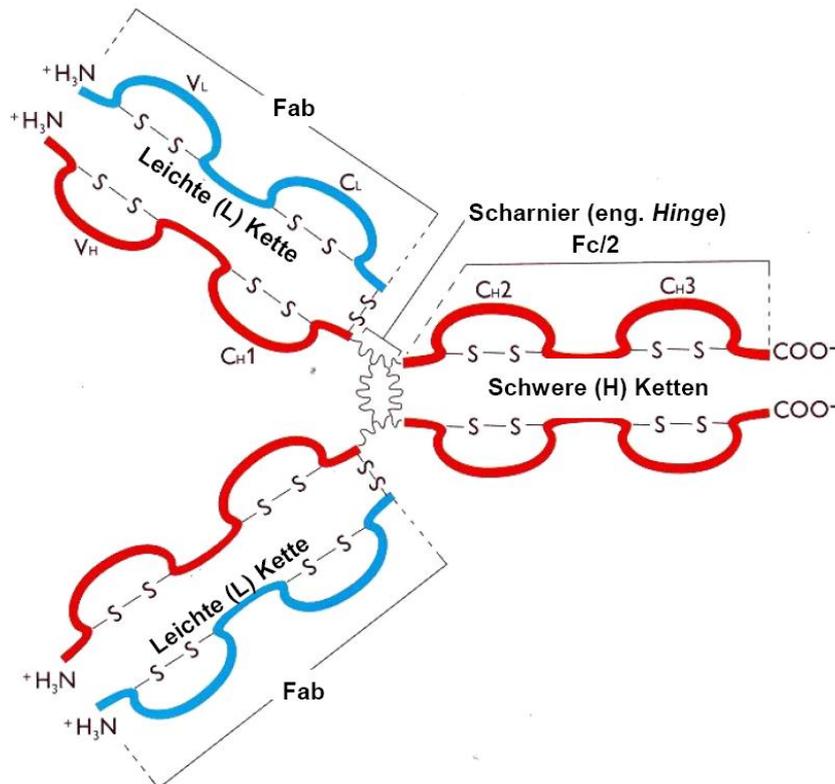


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Immunglobulins

4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der verwendeten IgG-Lösung

Die Proteinkonzentration des verwendeten polyklonalen IgG-Materials wurde vor Verwendung mit Hilfe des Bradford Assays bestimmt. Das Verfahren ermöglicht eine photometrische Konzentrationsbestimmung über die Bildung eines blauen Protein-Farbstoffkomplexes mit Comassie Blau^[101]. Die Erstellung einer Kalibrierreihe mit Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine; BSA) führte zu einer Regressionskurve zweiten Grades (Abb. 4), aus der mit Hilfe der Extinktion der untersuchten Probe deren Gehalt berechnet werden konnte.

Es wurden je drei Doppelbestimmungen einer 5000-fach verdünnten IgG-Probe gemessen. Die ermittelten Extinktionen, die daraus berechneten Konzentrationen und der Mittelwert sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

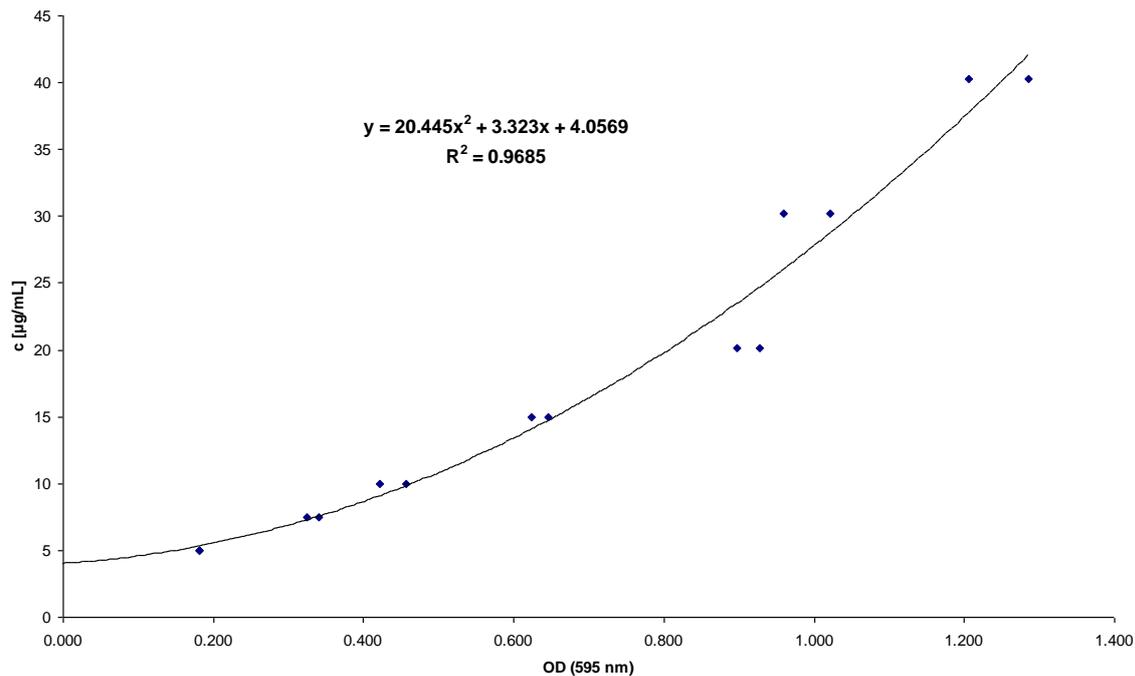


Abb. 4: Kalibrierkurve für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Messung	Abs. (595 nm)	Verdünnung	c [mg/mL]
1-1	0,766	1:5000	93,0
1-2	0,764	1:5000	92,6
2-1	0,798	1:5000	98,6
2-2	0,800	1:5000	99,0
3-1	0,788	1:5000	96,9
3-2	0,788	1:5000	96,9
MW	0,784	1:5000	96,2±2,7

Tab. 10: Zusammenfassung der Messwerte der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

4.1.3 Erstellung eines Referenzchromatogramms

Um eingetretene Veränderungen untersuchen zu können wurde ein *Peptide Mass Fingerprint Map* des IgG Materials erstellt. Dabei wird das Protein zur besseren Entfaltung in Harnstoff gelöst, welcher aufgrund seiner chaotropen Eigenschaften die Wasserstoffbrücken löst und so die Tertiärstruktur des Proteins aufweicht. Das anschließend zugesetzte DTT öffnet die Disulfidbrücken des Proteins und führt zu vollständiger Entfaltung. Um eine Reoxidation der

Cysteinreste zu verhindern, werden diese mit IAA unter Bildung eines Thioethers geschützt. Das so modifizierte Protein wird dann mit Hilfe von Proteasen verdaut, so dass Peptide geeigneter Größe erhalten werden. Vor dem Verdau muss umgepuffert werden, da die hohe Harnstoffkonzentration die Aktivität der Protease negativ beeinflussen würde. Als Protease wurde die Glutamy-Endoproteinase GluC gewählt, welche selektiv C-terminal nach Glutaminsäure schneidet. Die so erhaltenen Peptide haben ein geeignetes Molekulargewicht für die anschließende Detektion mittels LC-MS.

Die Aminosäuresequenzen des konstanten Teils der schweren und der leichten Ketten der vier Subklassen von humanem IgG wurden Internetdatenbanken entnommen (www.expasy.org). Mit dem Programm GPMW (Lighthouse Data, Odense/Dänemark) konnte der Verdau dieser Sequenzen mit der eingesetzten Glutamy-Endoproteinase Glu-C simuliert werden. Die erhaltenen Signale des Chromatogramms wurden den zu erwartenden Referenz-Peptiden des IgG Verdau zugeordnet. Die Strukturen konnten durch MS² Spektren belegt werden. Das Basisionenchromatogramm ist in Abb. 5 dargestellt und alle eindeutig identifizierten Peptide sind in Tab. 11 zusammengefasst.

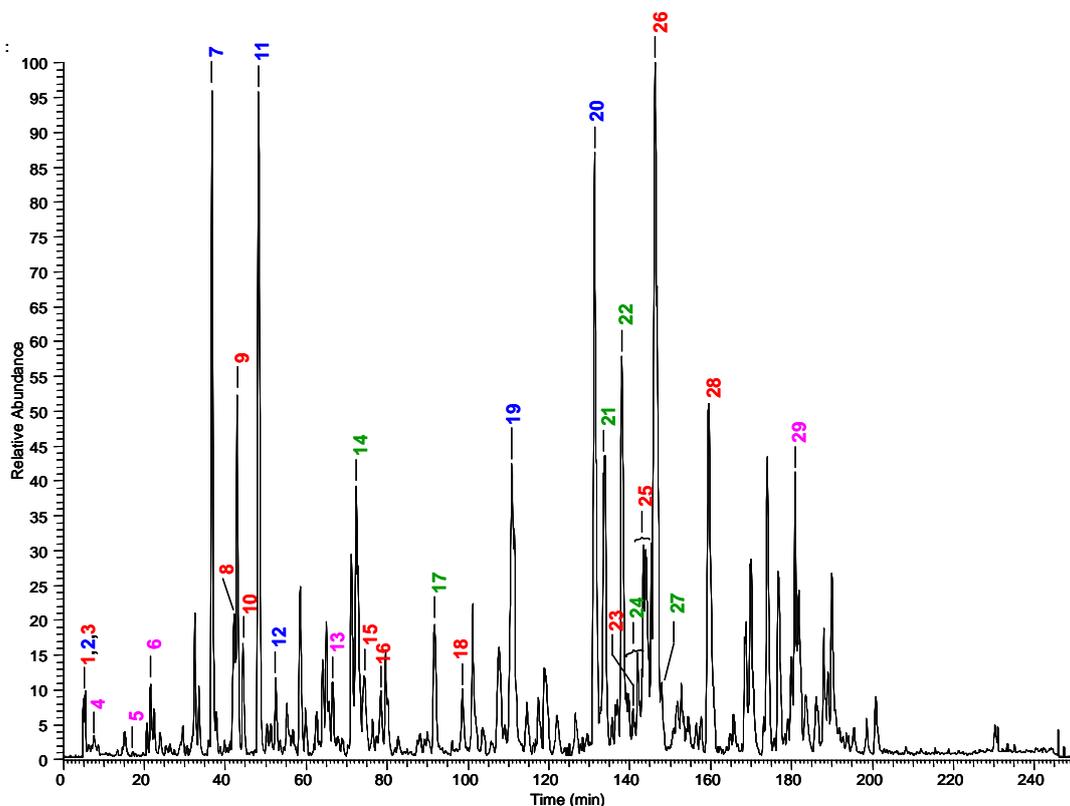


Abb. 5: Chromatogramm des nativen Peptide Mass Fingerprint Maps von IgG (verdaut mit GluC)

4.1 Teil 1 – Nachweis geschädigter Aminosäuren in Peptiden und Proteinen

Peak -Nr.	RT [min]	Zuordnung*	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	Sequenz
1	5,1	IgG1: E167-177	1309,5	655,2	437,2	VHNAKTKPREE
2	5,5	Igκ: E80-87	1035,2	518,1	345,7	KHKVYACE
3	6,0	IgG1: E266-271	631,6	316,3	211,2	SNGQPE
4	7,7	Igλ: E97-105 ¹	993,1	497,1	331,7	KTVAPTECS
5	17,2	Igλ: E92-105 ²	1466,6	733,8	489,5	GSTVEKTVAPTECS
6	21,6	Igλ: E77-91	1934,1	967,6	645,4	QWKSHRSYSCQVTHE
7	36,7	Igκ: E88-106 ¹	2105,3	1053,2	702,5	VTHQGLSSPVTKSFNR GEC
8	42,2	IgG1: E142-155 ¹	1585,7	793,4	529,3	VTCVVVDVSHEDPE
9	42,9	IgG1: E314-329	1882,1	941,6	628,1	ALHNHYTQKSLSLSPG
10	44,4	IgG1: E202-216	1719,1	860,0	573,7	YKCKVSNKALPAPIE
11	48,3	Igκ: E36-53	2003,2	1002,1	668,4	AKVQWKVDNALQSGNS QE
12	55,1	Igκ: E36-57 ¹	2419,6	1210,3	807,2	AKVQWKVDNALQSGNS QESVTE
13	66,6	Igλ: E54-76	2489,7	1245,4	830,6	TTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPE
14	72,5	IgG2: E198-236 ¹	4457,2	2229,1	1486,4	YKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPP SREE
15	75,4	IgG1: E202-240 ¹	4427,1	2214,1	1476,4	YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP PSRDE
16	78,4	IgG1: E156-177 ¹	2647,0	1324,0	883,0	VKFNWYVDGVEVHNAK TKPREE
17	91,8	IgG2: E152-162	1356,5	678,7	452,8	VQFNWYVDGVE

18	98,6	IgG1: E156-166	1356,5	678,8	452,8	VKFNWYVDGVE
19*	110,9	Igκ: E4-15*	1975,4	988,2	659,1	XXXPTVAAPSVFIFPPSD E*
20	131,4	Igκ: E16-35	2297,6	1149,3	766,6	QLKSGTASVVCLLNIFY PRE
21	133,8	IgG2: E100-137 ¹	4339,2	2170,1	1447,1	RKCCVECPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE
22	138,2	IgG2: E237-259	2602,1	1301,5	868,0	MTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVE
23	139,4	IgG1: E241-263	2584,0	1292,5	862,0	LTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVE
24	140,3- 143,3	IgG2: E174-197	2805,2	1403,1	935,7	QFNSTFRVSVLTVVHQ DWLNGKE (glykosyliert)
25	142,3- 146,1	IgG1: E178-201	2851,2	1426,1	951,1	QYNSTYRVSVLTVLHQ DWLNGKE (glykosyliert)
26	146,2	IgG1: E117-141	2742,3	1371,7	914,8	LLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPE
27	147,9	IgG2: E268-309	4917,5	2459,3	1639,8	NNYKTTTPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHE
28	159,5	IgG1: E117-137	2257,3	1129,2	753,1	LLGGPSVFLFPPKPKDT LMIS
29	180,9	Igλ: E18-43	3808,4	1904,7	1270,1	LQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKA GVE
*Die ersten drei Aminosäuren stammen aus dem hypervariablen Bereich und konnten anhand des Spektrums nicht aufgeklärt werden						

Tab. 11: Zuordnung aller identifizierten Peptide aus dem IgG-Verdau mit GluC

Da das C_H-Gensegment, lokalisiert auf Chromosom 14 Band q32, das alle für die verschiedenen Isotypen der Immunglobuline kodierenden Gene enthält, allel ist^[100], werden von jedem Ig-Isotyp, also auch vom verwendeten Isotyp G, Allotypen gefunden, die sich in ihrer Primärstruktur an einigen wenigen Stellen unterscheiden. Nicht identifizierte Peaks können daher vom konstanten Teil anderer Allotypen stammen, die nicht berücksichtigt worden sind, oder aus dem hypervariablen Bereich des IgG hervorgehen.

4.1.4 Oxidation des IgG-Materials und Untersuchung der eingetretenen Schäden auf Peptid- und Proteinebene

Das Anliegen der durchgeführten Oxidationsversuche lag in der Bestimmung, unter welchen Bedingungen welche Schäden zu erwarten sind und wie diese nachgewiesen werden können. Das Probenmaterial wurde mit Hilfe von H_2O_2 oxidiert, wobei vergleichend auf Peptid- und Proteinebene gearbeitet wurde, um Unterschiede in der Oxidierbarkeit bestimmter Aminosäuren herauszustellen.

4.1.4.1 Oxidativer Stress durch H_2O_2 am Peptid

Um zu untersuchen, welche Aminosäuren durch die H_2O_2 Exposition der aus dem GluC-Verdau des IgG erhaltenen Peptide geschädigt werden und in welchem Maße dies geschieht, wurde der Verdau mit Hilfe von H_2O_2 oxidiert.

Zu diesem Zweck wurde die Probe mit 100 äq., 500 äq. und 2000 äq. H_2O_2 , bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Proteinmenge, versetzt. Die Oxidation wurde bei 37°C in 10 mM NH_4Ac -Puffer (pH 5) unmittelbar nach der Verdauphase durchgeführt. Nach 3h wurde die Reaktion durch den Zusatz von Katalase gestoppt. Katalase ist ein Enzym welches Wasserstoffperoxid mit einer sehr hohen Wechselrate zu Wasser reduziert.

Die Chromatogramme der Oxidationsversuche mit 100-fachem, 500-fachem und 2000-fachem molaren H_2O_2 -Überschuss unterscheiden sich kaum. Die Schädigung wirkt sich hauptsächlich auf die schwefelhaltige Aminosäure Methionin aus und führt zur Bildung von Methioninsulfoxid. Mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration steigt auch der Grad der oxidativen Schädigung, wobei bei 2000 äq. H_2O_2 die Peptide nur noch in oxidiertem Zustand vorgefunden werden. Die Peaks der oxidierten Peptide eluieren alle um 2-8 min früher im Vergleich zum Referenzsignal (Abb. 6).

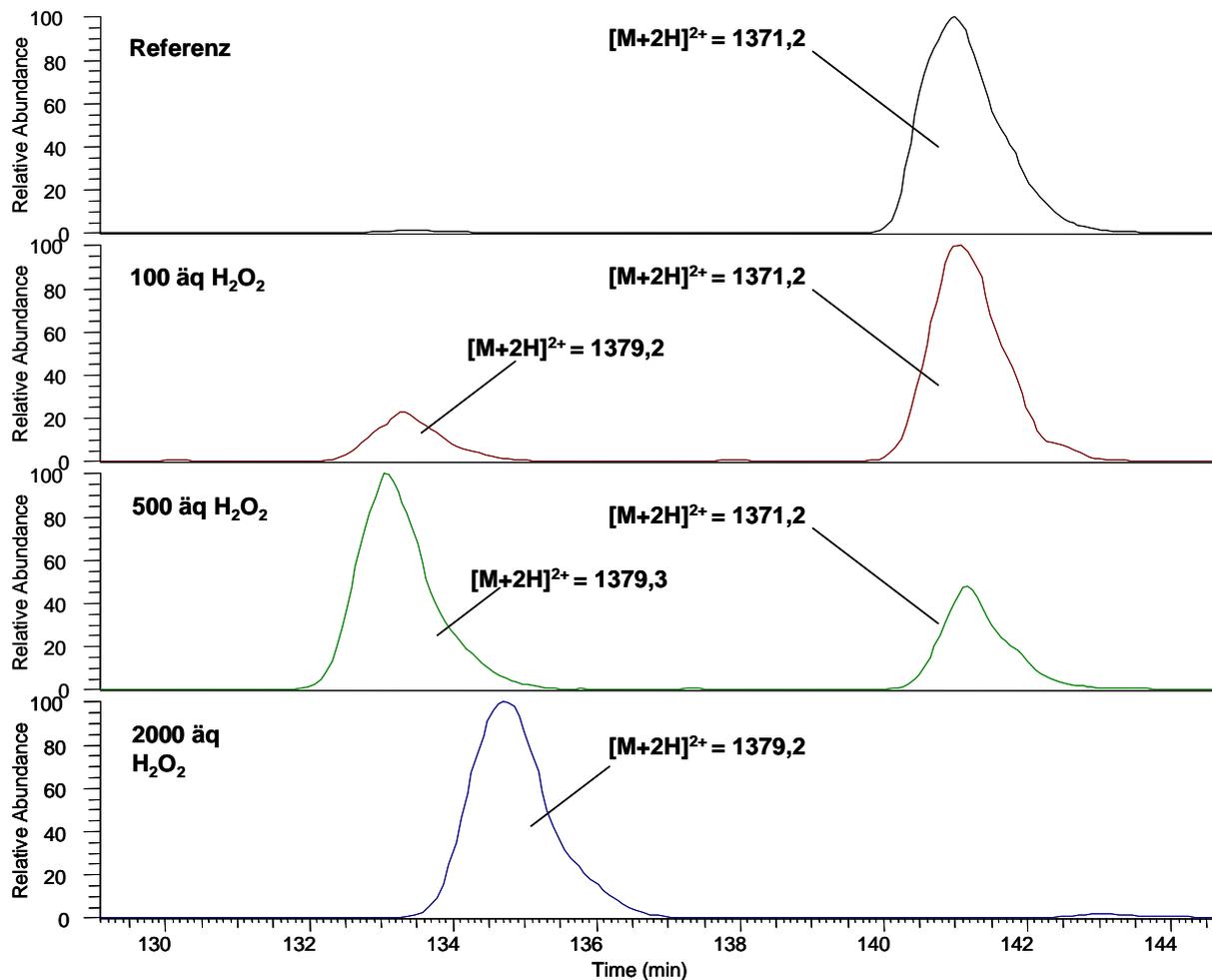
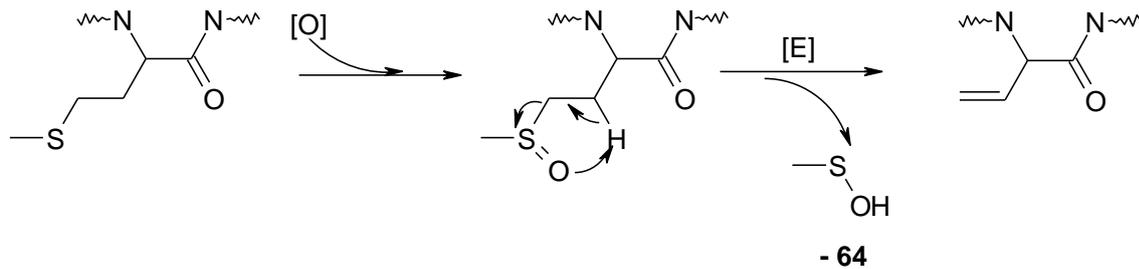


Abb. 6: Ausschnitt aus den Ionenspuren des doppelt geladenen Peptids E117-141 von IgG1 bei verschiedenen Bedingungen: Referenz, Oxidationsversuch mit 100 äq., 500 äq. und 2000 äq. H_2O_2 . Das Fortschreiten der Oxidation kann am Beispiel des IgG1 Peptids (LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP) deutlich beobachtet werden. Das Peptid enthält einen Methioninrest.

Beim durchgeführten Oxidationsversuch wird bei allen methioninhaltigen Peptiden eine Massenzunahme um +16 Da beobachtet, die auf die Oxidation des Schwefelatoms zum Sulfoxid zurückzuführen ist. Dies konnte durch die Interpretation der MS/MS-Spektren eindeutig belegt werden und ist am Beispiel des IgG2 Peptids E237-259 in Abb. 7 dargestellt. Die Spektren der oxidierten Spezies zeigen alle eine charakteristische Abspaltung von -64 Da.

Das Signal des um 64 Da leichteren Vorläuferions stellt den Basispeak dar, der die anderen Signale überragt (Abb. 7, unten). Die um 16 Da schwereren b- und y-Ionenserien zeigen eine, je nach Peptid, mehr oder weniger intensive Schattenserie, die im Vergleich zur Referenz -48 Da ($48 \text{ Da} = +16 \text{ Da} - 64 \text{ Da}$) leichter ist. Dies kann durch die Abspaltung von Methylsulfensäure ($\text{CH}_3\text{-SOH}$; 64 Da) erklärt werden, die nach Froelich et. al. nach folgendem Mechanismus abläuft^[102]:



Schema 2: Fragmentierungsmechanismus von oxidiertem Methionin in der Ionenfalle nach Froelich et. al.

Die Oxidation des Thioethers überführt diesen in eine leichte Abgangsgruppe, so dass während der Fragmentierung des Vorläuferions beim MS/MS-Experiment bevorzugt eine Eliminierung über eine konzertierte Bindungsumlagerung, ähnlich der McLafferty-Umlagerung, bei der das γ -Wasserstoffatom involviert ist, stattfindet. Dies führt, unter Erhaltung des ursprünglichen Ladungszustandes des Peptids, zur Abspaltung der Sulfensäure mit einer Masse von 64 Da.

Bei 2000-fachem H_2O_2 -Überschuss bei pH 5 konnte bei Peptid Igek: E88-106 (VTHQGLSSPVTKSFNRGEC) auch die Oxidation des Cysteins beobachtet werden, wobei nur ca. 3 % der Peptidmenge umgesetzt wurde, was mittels Integration der Peakflächen ermittelt wurde. Da im Referenzchromatogramm jedoch keinerlei Schädigung des Cysteins vorgefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Beobachtung um kein Artefakt handelt, auch wenn andere cysteinhaltige Peptide nicht betroffen waren.

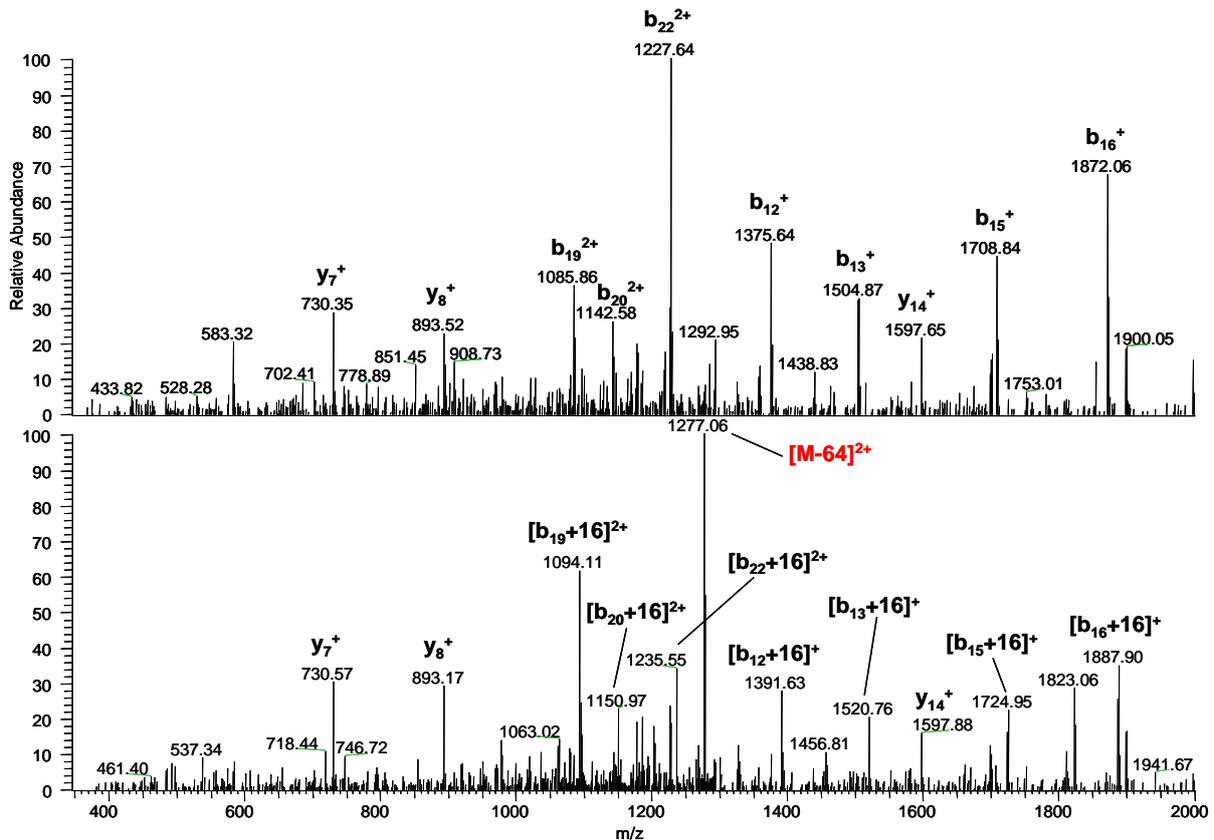
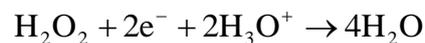


Abb. 7: MS/MS Spektrum eines methioninhaltigen Peptids und der zugehörigen oxidierten Spezies,
 Oben: Referenzspektrum des Peptids MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE (IgG2: E237-259). Fragmentiert wurde das $[M+2H]^{2+}$ -Ion mit dem m/z-Verhältnis 1301,7.
 Unten: MS/MS-Spektrum des gleichen Peptids mit oxidiertem Methionin (m/z = 1309,5). Zu erkennen ist die um +16 Da verschobene B-Ionenserie, sowie das um 64 Da leichtere Vorläuferion (Basispeak; m/z 1277,1).

Um weitere Aminosäuren oxidativ zu schädigen, wurde oben beschriebener Versuch bei pH 3 nochmals durchgeführt. H_2O_2 fungiert im Sauren als Oxidationsmittel nach folgender Gleichung:



Die Nernst-Gleichung für dieses System zeigt, dass die Oxidationskraft des H_2O_2 mit steigender Wasserstoffionenkonzentration in Folge der Erhöhung des Redoxpotentials steigt.

$$E = E^\circ + \frac{0,059V}{2} \cdot \lg[H_2O_2] \cdot [H_3O^+]^2$$

Bei pH 3 kann die höhere Oxidationskraft des H_2O_2 beim Grad der Methioninoxidation beobachtet werden. Bereits bei einem Überschuss von 500 äq. werden, wie in Abb. 8 beispielhaft an Peptid E117-141 aus IgG1 illustriert, alle methioninhaltigen Peptide quantitativ zu ihren Methioninsulfoxid-Derivaten oxidiert.

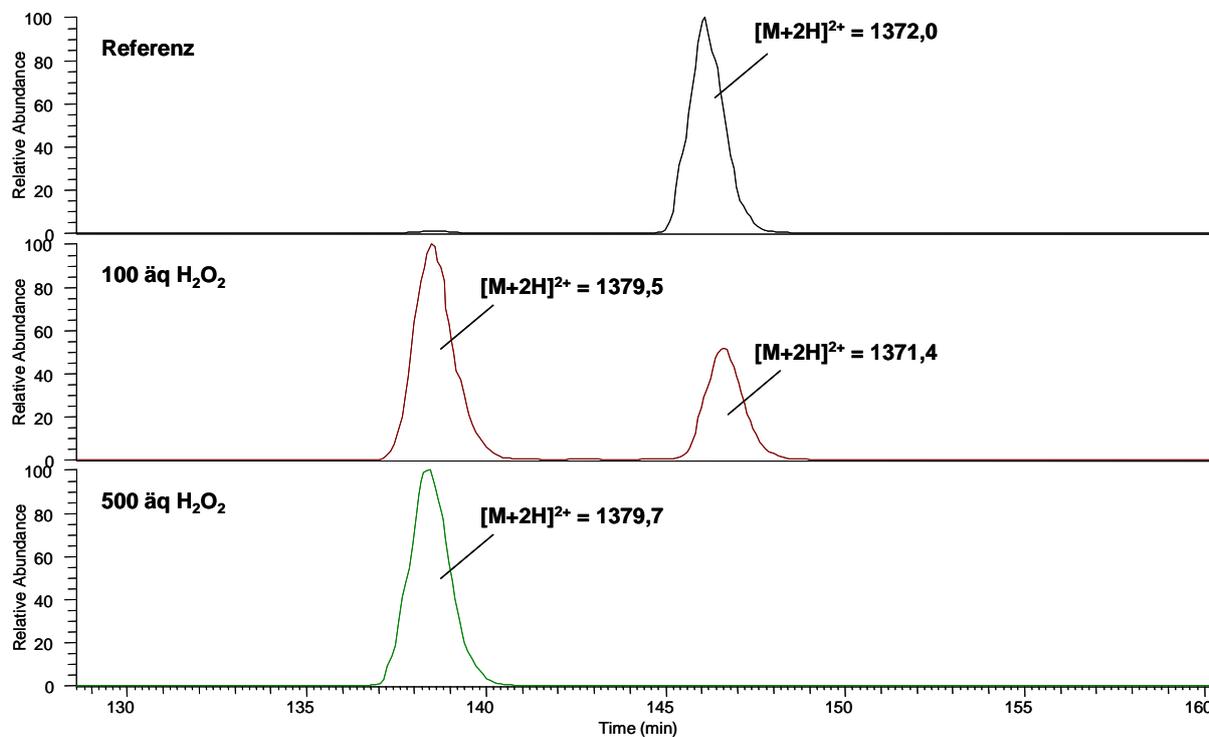
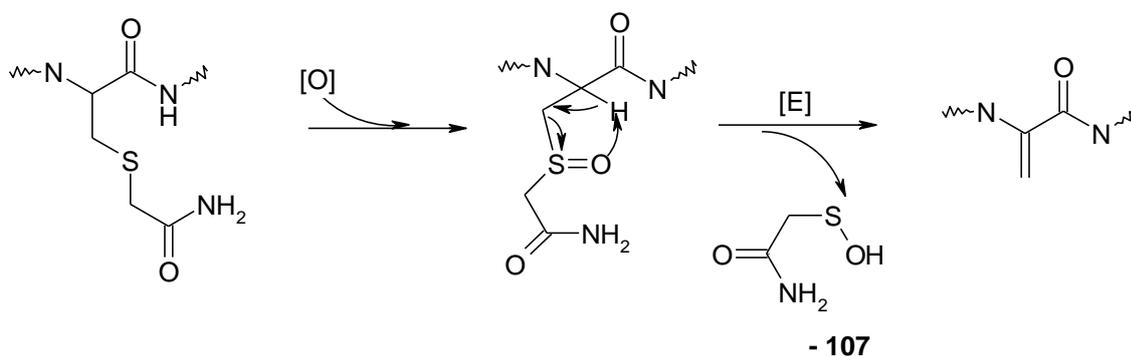


Abb. 8: Ausschnitt aus den Ionenspuren des doppelt geladenen Peptids E117-141 von IgG1 bei verschiedenen Bedingungen: Referenz, Oxidationsversuch mit 100-fachem und 500-fachem H_2O_2 Molüberschuss. Die Oxidation ist bei 500-fachem Überschuss quantitativ.

Der Oxidationsversuch mit 2000-fachem Überschuss H_2O_2 bei pH 3 zeigt im Vergleich zur Referenz deutliche Veränderungen im Chromatogramm. Bei diesem Versuch sind neben der Gesamtheit der Methionine auch alle Cysteinreste oxidiert. Da die Cysteine während der reduktiven Alkylierung mit IAA aminocarboxymethyliert wurden, werden auch hier Thioether oxidiert und somit wieder gute Abgangsgruppen erzeugt. Der Acetamid-Substituent des Cystein-Schwefels scheint im Gegensatz zum Methyl-Substituenten im Methionin die Nucleophilie des Schwefels bezüglich des Angriffs auf das H_2O_2 -Sauerstoffatom herabzusetzen, so dass die Oxidation erst bei erhöhtem Oxidationspotential des H_2O_2 stattfinden kann.

Bei den MS/MS-Experimenten wurde wieder die Abspaltung einer Sulfensäure ($\text{NH}_2\text{CO-CH}_2\text{-SOH}$; 107 Da) beobachtet, wobei das um 107 Da leichtere Vorläuferion auch hier den Basispeak stellt. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, ist in einigen Fällen die Schutzgruppe des Cysteins deamidiert, so dass statt einer Abspaltung von 107 Da ein Massenverlust von 108 Da ($\text{HOOC-CH}_2\text{-SOH}$) beobachtet wird. Dies könnte durch den eingestellten niedrigen pH-Wert bedingt sein. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktion nach demselben Mechanismus abläuft wie beim Methionin^[102]:



Schema 3: Fragmentierungsmechanismus von S-carboxymethyliertem, oxidiertem Cystein

Bei allen betrachteten MS/MS-Spektren wird dieses Fragmentierungsverhalten beobachtet. Wie Abb. 9 zeigt, ist die Fragmentierung des oxidierten Cysteinrestes gegenüber der des Methioninrestes bevorzugt und ergibt somit stets den Basispeak. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das β -Wasserstoffatom des Cysteins, aufgrund des negativen induktiven Effektes des benachbarten Stickstoffs und der Möglichkeit zur Ladungsdelokalisation über den Carbonylsauerstoff, acider ist und die Eliminierung somit leichter abläuft.

Neben der Oxidation der schwefelhaltigen Aminosäuren, wird beim Einsatz von 2000 äq. H_2O_2 bei pH 3 auch die Oxidation des Tryptophans beobachtet. Mögliche Oxidationsprodukte sind nach Finley et. al. Hydroxytryptophan (5 Isomere; $\Delta m = +16$ Da, **1**), Kynurenin ($\Delta m = +4$ Da, **2**), N-Formylkynurenin ($\Delta m = +32$ Da, **3**) und 3-Hydroxykynurenin ($\Delta m = +20$ Da, **4**), die in Abb. 10 dargestellt sind^[21].

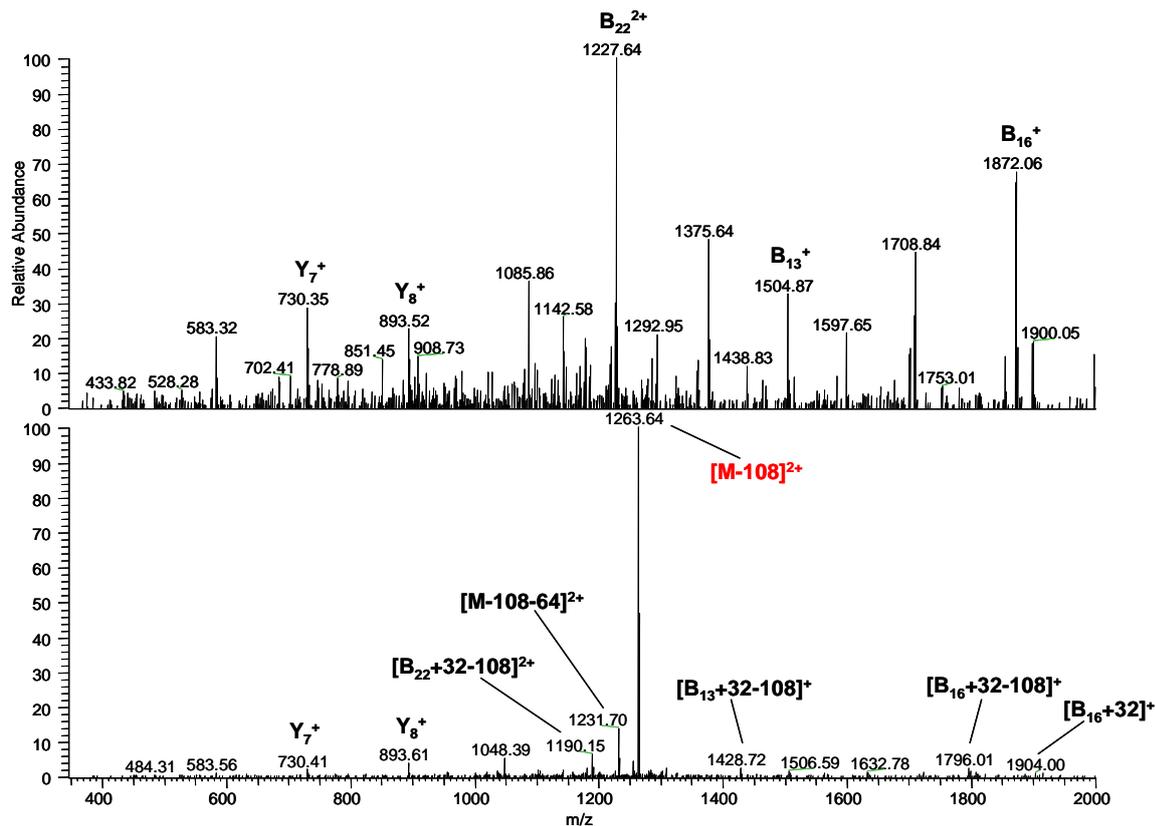


Abb. 9: MS/MS Spektrum eines methionin- und cysteinhaltigen Peptids und der zugehörigen zweifach oxidierten Spezies. Oben: Referenzspektrum des Peptids MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE (IgG2: E237-259). Fragmentiert wurde das $[M+2H]^{2+}$ -Ion mit dem m/z -Verhältnis 1301,7. Unten: MS/MS-Spektrum des gleichen Peptids mit oxidiertem Methionin und oxidiertem Cystein (m/z 1318,5). Zu erkennen ist das um 108 Da leichtere Vorläuferion (Basispeak; m/z 1263,6), sowie die Abspaltung beider Sulfensäuren ($m/z = 1231,7$). Die B-Ionenserie ist im Vergleich zur Referenz um -76 Da ($+2\text{''O''} - \text{HOOC-CH}_2\text{-SOH} = +32 - 108 = -76$) verschoben; Die Abspaltung von 108 Da erklärt sich durch Deamidierung.

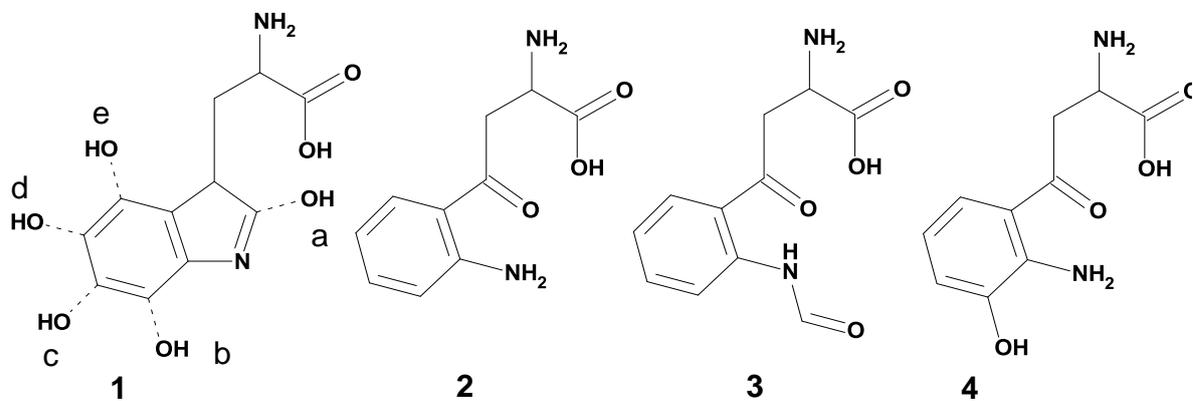


Abb. 10: Strukturen von Hydroxytryptophan (1a-e), Kynurenin (2), N-Formylkynurenin (3) und 3-Hydroxykynurenin (4)

Von den möglichen Produkten wurden die fünf Isomere des Hydroxytryptophan gefunden, welche chromatographisch getrennt werden konnten. Das in Abb. 11 dargestellte Basischromatogramm zeigt oben den Referenzpeak des Peptids AKVQWKVDNALQSGNSQE (Igκ: 36-53; $[M+2H]^{2+} = 1002$) und darunter die beobachteten Oxidationsprodukte, deren Molekulargewicht in Bezug auf die Referenz um 16 Da erhöht ist. ($[M+2H]^{2+} = 1010$). Die Zuordnung der einzelnen Signale zu den jeweiligen Isomeren kann nicht experimentell bestimmt werden, da Referenzsubstanzen nicht käuflich erhältlich sind, um die Retentionszeiten der Isomere abzugleichen.

Weitere oxidative Veränderungen konnten weder beim Tryptophan noch bei anderen Aminosäuren gefunden werden und scheinen nicht aufzutreten. Das Chromatogramm und die MS- bzw. MS/MS-Spektren zeigen außer den genannten Veränderungen bei methionin-, cystein- und tryptophanhaltigen Peptiden keine Abweichungen zur Referenz.

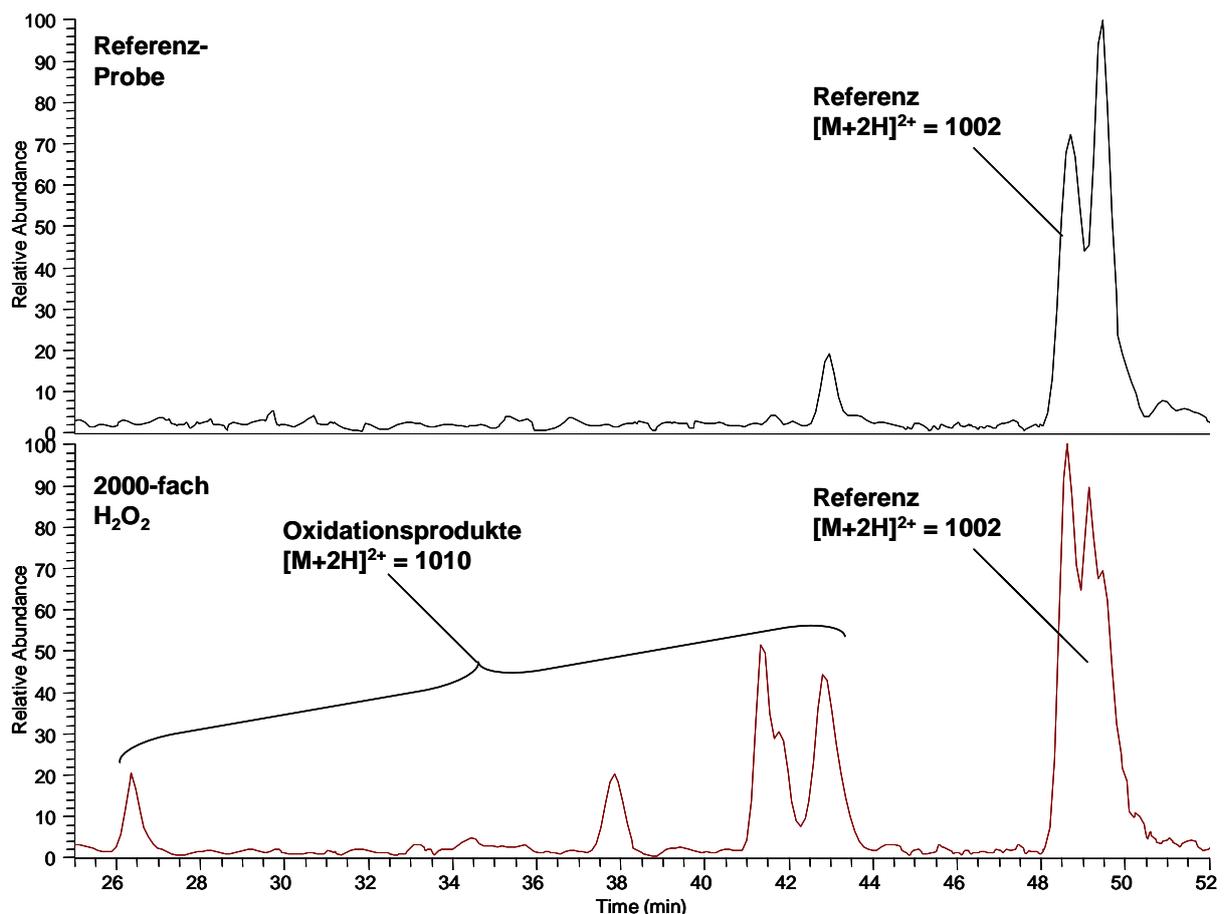


Abb. 11: Ausschnitt aus dem Basischromatogramm des Peptids Igκ: E36-53. Oben: Referenzchromatogramm der unbehandelten Probe; Unten: Chromatogramm der mit 2000 äq. H_2O_2 gestressten Probe; Gesucht wurde nach den doppelt geladenen Ionen mit einem m/z -Verhältnis von 1002 (Igκ: E36-53) und der oxidierten Spezies mit einem m/z -Verhältnis von 1010.

4.1.4.2 Oxidativer Stress durch H_2O_2 am intakten Protein

Nachdem oxidative Veränderungen einzelner Peptide untersucht wurden, sollte als nächstes das intakte Protein auf dieselbe Weise gestresst werden, um Gemeinsamkeiten und mögliche Unterschiede zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde eine geeignete Menge humanes IgG Material in 10 mM NH_4Ac -Puffer (pH 5) gelöst und mit H_2O_2 versetzt (100 äq., 500 äq. und 2000 äq.). Die Reaktion lief 3h bei 37°C und wurde nicht mit Katalase gestoppt. Diese wäre nicht mehr zu entfernen gewesen und wäre beim folgenden Verdau des IgG ebenfalls verdaut worden, so dass störende Signale im Chromatogramm erhalten worden wären. Stattdessen wurde das gestresste Protein in 7,5 M Harnstofflösung umgepuffert, wodurch das Oxidationsmittel entfernt werden konnte. Wie bereits beschrieben, wurde reduktiv alkyliert, erneut in NH_4Ac -Puffer pH 5 umgepuffert und anschließend mit GluC verdaut.

Die Auswertung der Chromatogramme zeigt, dass trotz gleicher H_2O_2 -Konzentrationen, bezogen auf die Versuche am Peptid, die oxidativen Veränderungen am intakten Protein geringer ausgeprägt waren. So zeigt sich selbst bei 2000-fachem molaren Überschuss keine Oxidation des Cysteins, auch nicht bei Peptid Igk: E88-106. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die Cysteinreste nicht wie bei den verdauten Proben als Thioether vorliegen, sondern in Form von SS-Brücken. Andererseits fiel auf, dass selbst bei der höchsten eingesetzten H_2O_2 -Konzentration die methioninhaltigen Peptide nicht vollständig oxidiert wurden. Während die Oxidation der methioninhaltigen Peptide des Verdau bereits bei 500 äq. H_2O_2 mit Werten von bis zu 96 % fast vollständig war, fand man bei der Oxidation des intakten Proteins mit anschließendem Verdau bei gleich bleibender H_2O_2 -Konzentration etwa 6-32 % S-Oxide bei den gleichen Peptiden vor. Als Gründe dafür kommen sterische Abschirmung der schwefelhaltigen Reste durch die Faltung des Proteins in Frage und z.T. eine partielle Reduktion der oxidierten Schwefelatome bei der reduktiven Alkylierung.

Als Beleg für die Abschirmung der Methioninreste dient der Vergleich der oxidativen Schädigung der einzelnen Peptide beim Stressen des intakten Proteins (Abb. 12) und der Peptide nach proteolytischem Verdau (Abb. 13). Von vier untersuchten methioninhaltigen Peptiden werden beim Stressen des intakten Proteins jeweils drei in ähnlichem Ausmaß geschädigt (bis zu 50 %), während Peptid IgG2: E237-259 nur bis zu 13 % in oxidiertem Zustand vorgefunden wird. Im Gegensatz dazu beträgt die Maximalschädigung beim Stressen

des Verdaus bis zu 100 %, wobei Peptid IgG2: E237-259 bereits bei 100-fachem H_2O_2 -Überschuss zu 88 % im oxidierten Zustand vorliegt. Das spricht dafür, dass die freien Peptide für reaktive Sauerstoffspezies leichter zugänglich sind.

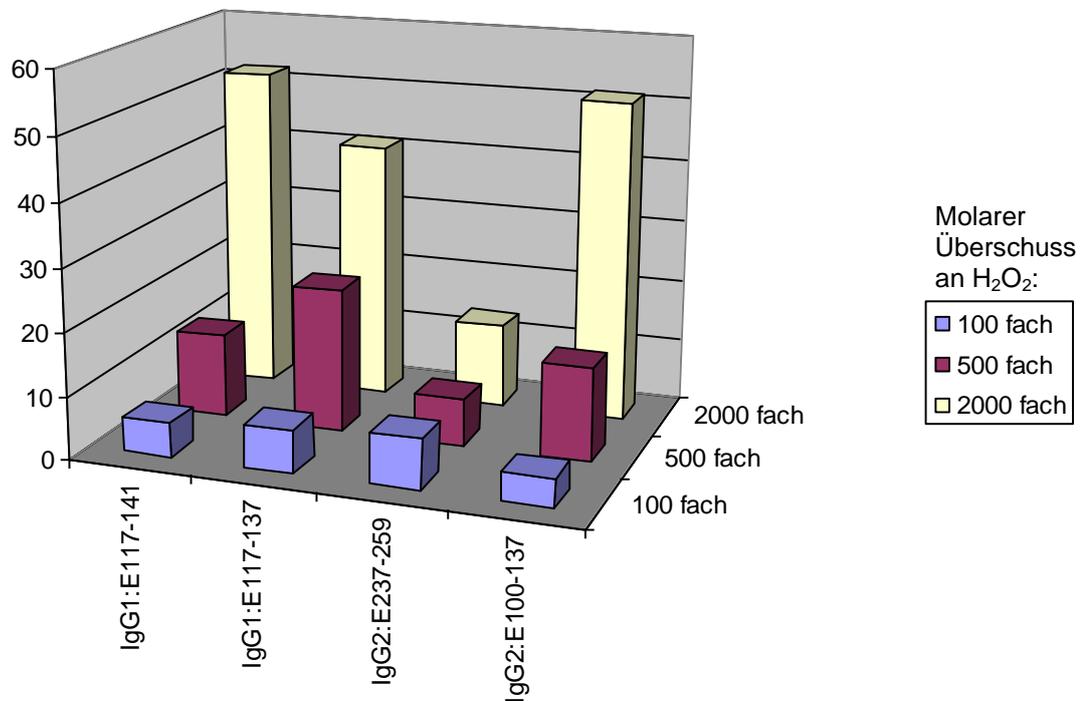


Abb. 12: Oxidativer Stress am intakten Protein: Verhältnis der methioninsulfoxidhaltigen Spezies zur jeweiligen Gesamtpeptidmenge bei vier untersuchten Peptiden aus humanem Immunglobulin G1 und G2, bei drei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen.

Der zweite Grund der geringeren Schädigung des intakten Proteins ist eine partielle Reduktion der oxidativ veränderten Peptide durch die Aufarbeitung. Dies hätte zur Folge, dass bei pharmazeutisch-analytischen Untersuchungen eines Proteins mit dem *Peptide Mass Fingerprint Mapping* ein hoher Datenverlust durch die Bedingungen der reduktiven Alkylierung erfolgen würde, da der Grad der oxidativen Schädigung nicht vollständig erfasst werden könnte.

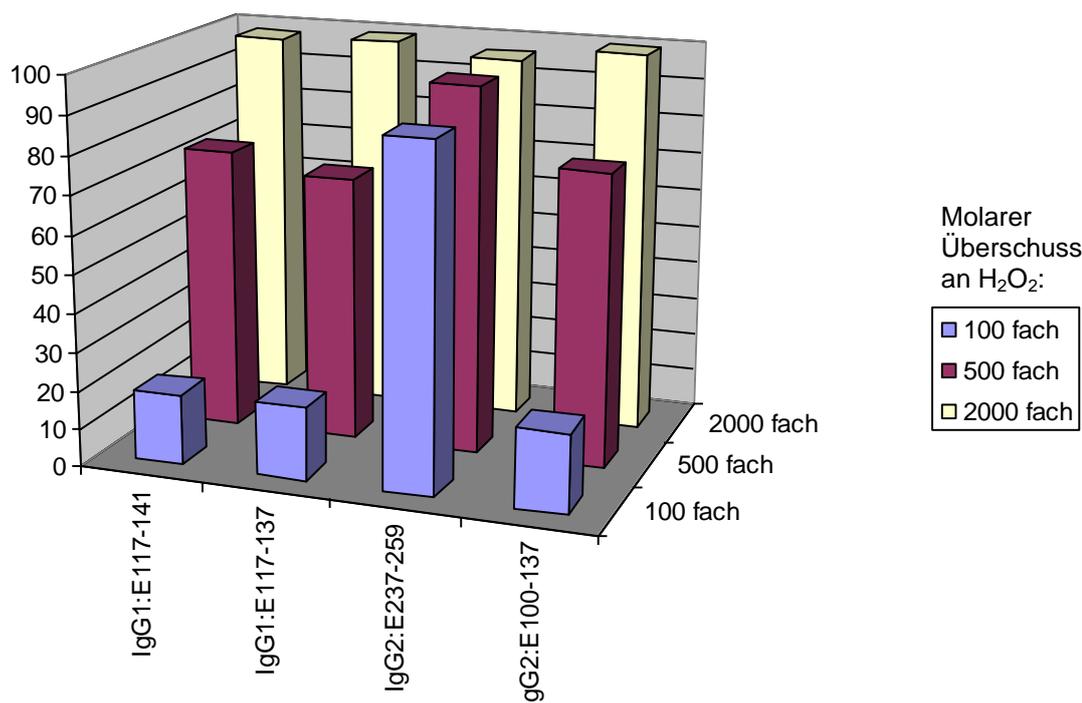


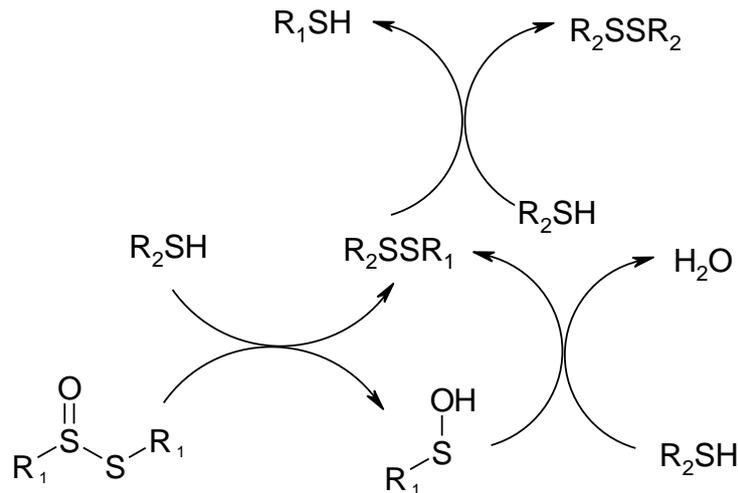
Abb. 13: Oxidativer Stress auf Peptidebene: Verhältnis der methioninsulfoxidhaltigen Spezies zur jeweiligen Gesamtpeptid-menge bei vier untersuchten Peptiden aus humanem Immunglobulin G1 und G2 bei drei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen.

Im Falle des Cysteins ist bekannt, dass gebildetes Cystein-Sulfenat (Cys-SO⁻) mit allen zur Reduktion der Disulfidbrücken verwendeten gängigen Thiolen (Dithiothreitol (DTT), Glutathion (GSH), Thioredoxin (Thx)) wieder regeneriert wird. Das Redoxpotential der Cystein-Sulfensäure liegt nach Nagahara et. al. höher als das des Gluthations (Tab. 12), so dass eine Reduktion zum Cystein durch Zusatz dieser Agentien zu erwarten ist. Im Gegensatz dazu sind die höher oxidierten Analoga, das Cystein-Sulfinat (Cys-SO₂⁻) und das Cystein-Sulfonat (Cys-SO₃⁻) redoxstabil^[103].

Redoxpaar	Standardredoxpotential E° [mV]	Literatur
DTT(red)/DTT(ox)	-323	[104] Hanson (2004)
Thioredoxin:Thx(red)/Thx(ox)	-280	[105] Jones (2004)
Glutathion: GSH/GSSG	-250	[105] Jones (2004)
Cystein/Cystin	-145	[105] Jones (2004)

Tab. 12: Redoxpotentiale ausgewählter Thiole

Es liegen Erkenntnisse vor, dass Cystin (zwei disulfidverbrückte Cysteine) ebenfalls oxidierbar ist, wobei das entstehende Disulfidmonooxid und -dioxid leicht durch Thiole reduziert werden kann^[30]. Damit kann erklärt werden warum beim oxidativen Stress des intakten Proteins kein oxidiertes Cystein gefunden wurde, selbst wenn dieses zuvor vorgelegen haben sollte. Die Reduktion des Cystinmonooxids mit Thiolen verläuft nach Giles et. al. nach folgendem Mechanismus:



Schema 4: Schematische Darstellung der Reduktion von oxidiertem Cystin mit Thiolen

Beim Methionin ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Lage sind, es zum Methioninsulfoxid zu oxidieren^[106,107,108]. Durch Einwirkung stärkerer Oxidationsmittel wird sogar die Weiteroxidation zum Methioninsulfon (Met-SO₂) beobachtet^[108]. Bei den oben beschriebenen Versuchsreihen konnte durch die Oxidation mit H₂O₂ kein Methioninsulfon nachgewiesen werden. Eine Regeneration des Methionins wird durch das Enzym Methioninsulfoxidreduktase bewerkstelligt, wobei dieses als Cofaktor ein Thiol wie z.B. Thioredoxin benötigt^[109]. Eine Reduktion durch Thiole ohne Enzymbeteiligung ist bisher in der Literatur nicht bekannt.

Um die Reduktion methioninsulfoxidhaltiger Peptide durch DTT zweifelsfrei auszuschließen oder nachzuweisen, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der ein bereits gestresster Verdau nochmals den Bedingungen der reduktiven Alkylierung unterzogen wurde. Dazu wurde 1 mL einer GluC verdauten IgG Probe in vier Aliquote geteilt, wobei eines als Referenz diente und die anderen drei Teile mit H₂O₂ (100 äq., 500 äq. oder 2000 äq.) oxidativ geschädigt wurden. Nach stoppen der Oxidation mit Katalase wurde das dritte und vierte Aliquot mit 12 äq. bzw. 120 äq. DTT versetzt.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 14 (100 äq. H₂O₂), 15 (500 äq.) und 16 (2000 äq.) zusammengefasst. Deutlich zu erkennen ist, dass Met-237 aus Peptid IgG2: E237-259 redoxlabil ist. Zum einen wurde diese Aminosäure durch H₂O₂ schneller oxidiert, schien zum anderen aber auch durch DTT in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration reduzierbar zu sein. Es liegt folglich ein erster Befund vor, bei dem Methionin auch ohne enzymatische Einwirkung durch Thiole reduzierbar ist.

Die weiteren drei methioninhaltigen Peptide konnten zwar oxidiert werden, ließen sich aber weder unter den „normalen“ Bedingungen der reduktiven Alkylierung regenerieren, noch durch die 10-fach höhere Menge an Reduktionsmittel. Im Gegenzug fiel auf, dass diese drei Peptide durch den Zusatz von DTT und IAA weiter oxidiert werden konnten und zwar in Abhängigkeit von den zugesetzten Mengen. Dieses unterschiedliche Verhalten kann u.U. auf die Aminosäuresequenzen der Peptide zurückgeführt werden.

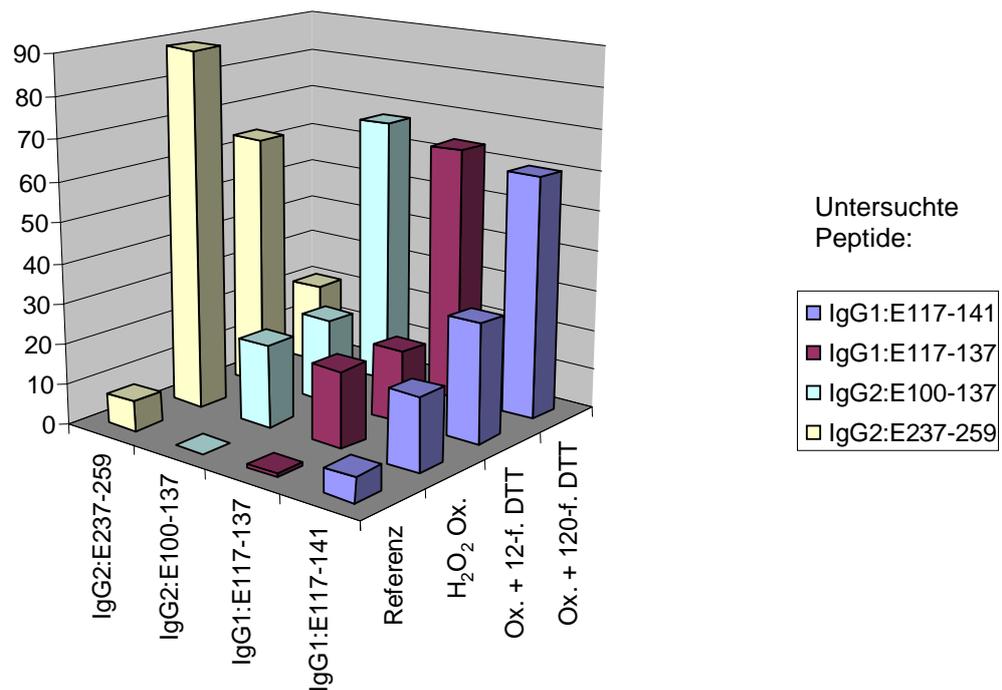


Abb. 14: Verhältnis der oxidierten Peptidmenge zur Gesamtmenge des Peptids in Prozent bei 100-facher H₂O₂-Konzentration. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an oxidiertem Peptid vier methioninhaltiger Peptide aus humanem Immunglobulin G1 und G2 bei verschiedenen Bedingungen: Referenz, Oxidation mit 100-fachem Überschuss an H₂O₂, Oxidation mit anschließender reduktiver Alkylierung und Oxidation mit 10-fach erhöhter Zugabe von Reagenzien zur reduktiven Alkylierung. Mittelwerte aus n=3 Messungen.

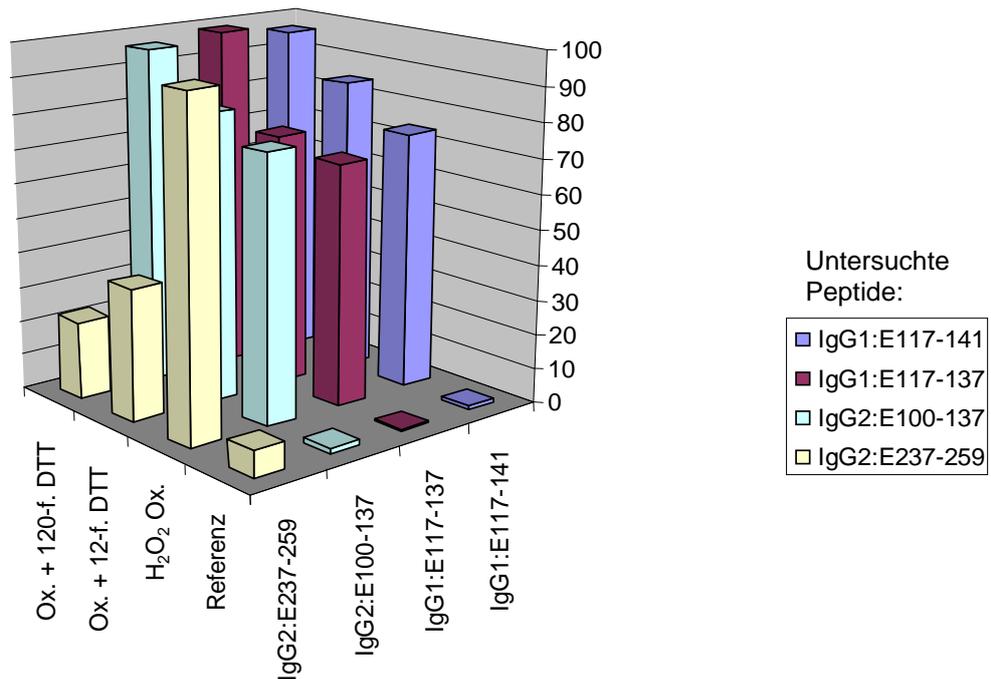


Abb. 15: Verhältnis der oxidierten Peptidmenge zur Gesamtmenge des Peptids in Prozent bei 500-facher H_2O_2 -Konzentration. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an oxidiertem Peptid vier methioninhaltiger Peptide aus humanem Immunglobulin G1 und G2 bei verschiedenen Bedingungen: Referenz, Oxidation mit 500-fachem Überschuss an H_2O_2 , Oxidation mit anschließender reduktiver Alkylierung und Oxidation mit 10-fach erhöhter Zugabe von Reagenzien zur reduktiven Alkylierung. Mittelwerte aus n=3 Messungen.

Die besondere Stellung des Met-237 könnte aus der Aminosäuresequenz des Peptides hervorgehen oder dadurch bedingt sein, dass es sich um ein Peptid mit N-terminalem Methionin handelt. Um dem nachzugehen, wurde ein Testpeptid (MRFA) auf sein Redoxverhalten hin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Methionin dieses Peptids nach Oxidation zum Sulfoxid nicht wieder durch DTT reduzierbar ist, so dass die N-Ständigkeit des Methionins als Grund für die Reduzierbarkeit ausscheidet (Abb. 17). Die wesentlich geringere Menge an oxidiertem Met-237 im intakten Protein, kann nach vorliegenden Erkenntnissen nicht alleine auf die Faltung des Proteins zurückzuführen sein, sondern muss mit der Reduktionsempfindlichkeit des gebildeten Methioninsulfoxids begründet werden.

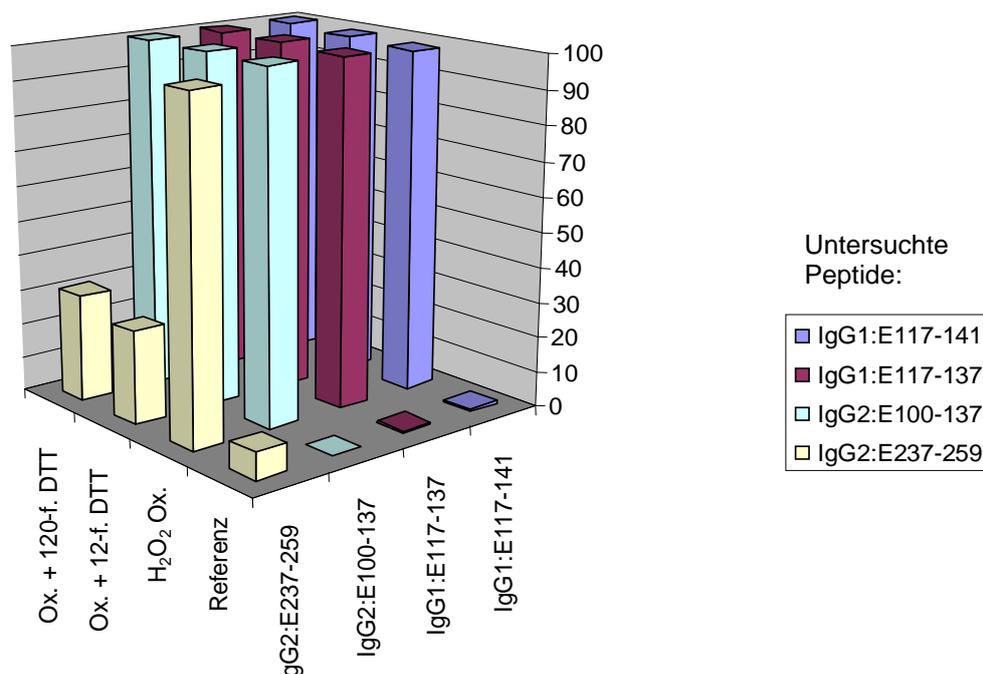


Abb. 16: Verhältnis der oxidierten Peptidmenge zur Gesamtmenge des Peptids in Prozent bei 2000-facher H₂O₂-Konzentration. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an oxidiertem Peptid vier methioninhaltiger Peptide aus humanem Immunglobulin G1 und G2 bei verschiedenen Bedingungen: Referenz, Oxidation mit 2000-fachem Überschuss an H₂O₂, Oxidation mit anschließender reduktiver Alkylierung und Oxidation mit 10-fach erhöhter Zugabe von Reagenzien zur reduktiven Alkylierung. Mittelwerte aus n=3 Messungen.

Als Grund hierfür kann eine redoxgesteuerte Effektorfunktion der betroffenen Aminosäure (Met-237) im intakten Protein in Frage kommen, wie sie bereits bei anderen Proteinen für Cystein^[110,111,112] und für Methionin^[108] diskutiert wird. Die Gründe für das unterschiedliche Redoxverhalten der untersuchten Peptide liegen aller Voraussicht nach in den unterschiedlichen Aminosäuresequenzen. Bekannt ist, dass die Stabilisierung von Cystein-Sulfensäure vom sterischen Anspruch des verwendeten Thiols abhängt. Der wichtigste Faktor zur Stabilisierung von Cystein-Sulfensäure ist jedoch die Abwesenheit proximaler Thiole in der Sequenz. Ferner wirken intramolekulare Wasserstoffbrücken, Ionisierung der Säure zur Stabilisierung des korrespondierenden Sulfenats, sowie eine sterisch anspruchsvolle, unpolare Mikroumgebung mit limitiertem Solventzugang stabilisierend^[113]. Da über die Stabilität des Methioninsulfoxids bisher keine Ergebnisse vorliegen, kann nur vermutet werden, dass die für Cystein-Sulfensäure beschriebenen stabilisierenden Faktoren auf das Methionin übertragbar sind. Somit könnte die Einbettung des Methionins der drei reduktionsunempfindlichen Peptide zwischen die unpolaren Aminosäuren Leucin und Isoleucin, sowie die Nähe der

Aminosäuren Serin, Threonin und Asparaginsäure, die in der Lage sind Wasserstoffbrücken auszubilden, zur Stabilisierung des Sulfoxids beitragen. Auch das verwendete Testpeptid weist eine unmittelbare Nähe zur Aminosäure Arginin auf, deren polarer Rest zu einer Stabilisierung des gebildeten Methioninsulfoxids führen könnte. Die exakten Gründe für das abweichende Redoxverhalten der Aminosäure Met-237 können letztlich nicht eindeutig geklärt werden.

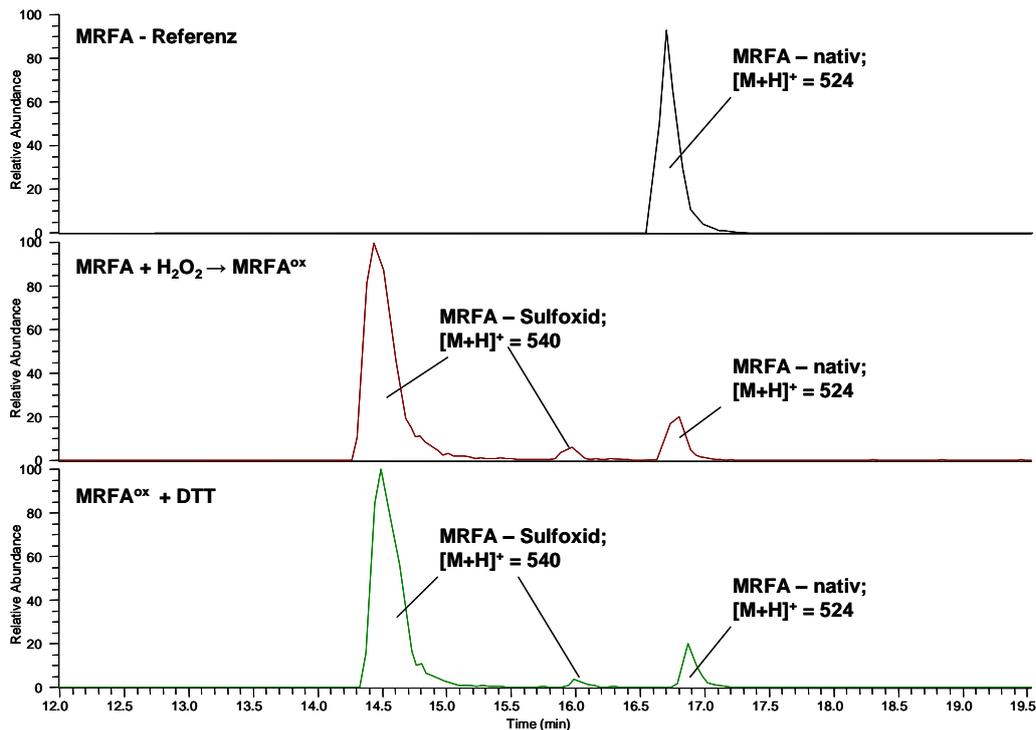


Abb. 17: Basisionenchromatogramm des Peptids MRFA; oben: Referenzchromatogramm des unbehandelten Peptids; mitte: Chromatogramm der oxidierten Spezies; unten: Chromatogramm der oxidierten Spezies nach Behandlung mit dem Reduktionsmittel DTT

4.1.5 Fixierung der Schädigung des Methionins

Der Befund, dass IgG2 die Aminosäure Met-237 enthält, welche redoxlabil ist, so dass eine eventuell eingetretene Schädigung während der reduktiven Aufarbeitung verloren gehen kann, stellt für die Quantifizierung oxidativer Schäden am Protein ein erhebliches Problem dar. Daher wurde versucht, die Oxidation des Met-237 zu „konservieren“, damit die Information über den Grad der eingetretenen Oxidation zum Sulfoxid, nach reduktiver Alkylierung des Proteins, erhalten bleibt.

Dazu wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurde versucht, eine Umlagerung des Methioninsulfoxids zu ermöglichen, die durch Eliminierung der Methylsulfensäure als Produkt Vinylglycin liefert, welches eindeutig nachweisbar und redoxstabil ist.

Zum anderen sollte das Methioninsulfoxid selektiv zum Sulfon oxidiert werden, welches ebenfalls redoxstabil ist. Dabei muss die Oxidation so ablaufen, dass unbelastetes Methionin selbst nicht mitgeschädigt wird.

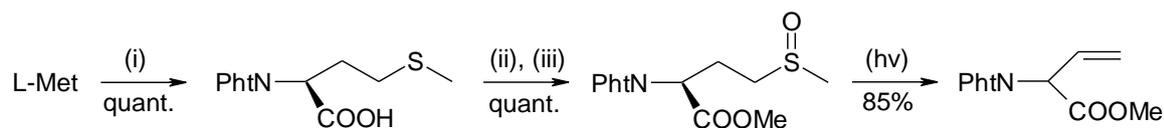
4.1.5.1 Umsetzung des Methionins zu Vinylglycin

Photochemische Derivatisierung

Aus den Ergebnissen der Fragmentierungsexperimente von Peptiden, die Methioninsulfoxid enthalten, ist ersichtlich, dass Methionin bei der Stoßaktivierung in der Ionenfalle zu Vinylglycin und Methylsulfensäure ($M_r = 64$ g/mol) zerfällt, wobei ein sehr intensiver Peak erhalten wird. Dieser ist 64 Da leichter als das fragmentierte Mutterion. Dieser Prozess würde, wenn er vorab durchgeführt werden könnte, dazu beitragen, oxidativ geschädigtes Methionin vor der Reduktion durch das während der Aufarbeitung zugegebene Thiol, zu bewahren. Das dabei entstehende Vinylglycin wäre redoxstabil.

Die Eliminierung der Sulfensäure wird thermisch bei 150-200°C in organischen Lösungsmitteln oder durch Kugelrohrdestillation durchgeführt^[114,115,116]. Da diese Bedingungen für das Arbeiten mit Proteinen ungeeignet sind, wurde versucht die Fragmentierung unter milden Bedingungen in wässrigen Lösungen zu erreichen.

Ein Weg hierfür könnte die Fotofragmentierung sein, insofern eine selektive Abspaltung der Sulfensäure durch Bestrahlung zu erzielen ist. Dies ist unter Verwendung von Phthaloylmethionin bereits gelungen^[117]. Hierbei wird L-Methionin in das Phthaloyl-Derivat überführt, welches mit H_2O_2 quantitativ zum Sulfoxid oxidiert und dessen Carboxylgruppe methyliert wird. Die anschließende Bestrahlung des Produktes bei einer Wellenlänge von 300 nm über 24h liefert Vinylglycin in hohen Ausbeuten (s. Schema 5).



(i) Phthalsäureanhydrid, Mikrowellenstrahlung; (ii) H_2O_2 , Aceton; (iii) MeOH, HCl

Schema 5: Photochemische Umwandlung von L-Met zum Vinylglycin-Derivat nach Griesbeck et. al.

Unter der Voraussetzung, dass Methionin die N-terminale Aminosäure im Peptid ist, konnte anhand des Dipeptids PhtN-Met-Gly gezeigt werden, dass die Derivatisierung von methioninhaltigen Peptiden auf diesem Wege möglich ist. Die Methode ist jedoch in Folge des benötigten Derivatisierungsschrittes mit dem Chromophor bei intakten Proteinen nicht anwendbar.

Ferner zeigen Untersuchungen am Methionin-Methylester (Met-OMe) und dem N-acetylierten Derivat (NAc-Met-OMe) bei Bestrahlung mit 254 nm eine Anregung der Estergruppe. Darauf folgen ein Elektronentransfer und die Eliminierung von Thioformaldehyd, so dass als Produkt hauptsächlich α -Aminobuttersäuremethylester, bzw. das Acetyl-Derivat entsteht. Die Bildung von Vinylglycin erfolgt als Nebenreaktion durch Eliminierung des Methylmercaptan-Radikals und anschließendem Protonentransfer^[118].

Untersuchungen von Nikogosyan und Görner zeigen ferner, dass die indirekte Photolyse von Peptiden in Wasser, über die Bildung von Wasserradikalen, hauptsächlich zur Spaltung der Peptidbindung führt^[119]. Des Weiteren wurden photoinduzierte α -Spaltungen bei Peptiden in saurem Milieu berichtet, die hauptsächlich zum Verlust von CO_2 führen, und die durch Elektronentransfer induzierte Spaltung der Peptidbindung in neutralem wässrigen Medium^[120].

Die Vielfalt an Fragmentierungsmöglichkeiten durch Photolyse lässt die photochemische Derivatisierung von Methioninsulfoxid im intakten Protein daher nur sinnvoll erscheinen, wenn die Sulfoxidgruppe eine spezifische Absorptionsbande zeigt, so dass diese selektiv angeregt werden kann. Abb. 18 zeigt die UV-Spektren der 0,5 mM Lösungen von Methionin und Methioninsulfoxid in Wasser. Dabei weist Methionin eine breite Absorptionsbande zwischen 190 und 240 nm auf, während das Sulfoxid zwei Absorptionsmaxima bei 210 nm und 192 nm zeigt.

Die Absorption des Methionins im Bereich von 190 nm ist auf die Aminogruppe zurückzuführen. Werte bei 205 nm zeigen die Absorption der Carboxylgruppe an. Die Absorption des Sulfoxids bei 210 nm entspricht dem Literaturwert. Freie Thiolgruppen absorbieren bei 195 nm^[121,122,123].

Zwischen 400 nm und 240 nm ist keine Absorption beobachtbar. Die Absorption der Sulfoxidgruppe bei 210 nm fällt in den Bereich des π - π^* Übergangs der Peptidbindung (~205 nm) und kann somit nicht selektiv angeregt werden, ohne die Peptidbindung mit anzuregen und oben beschriebene Peptidfragmentierung zu verursachen. Damit scheint die photochemische Derivatisierung von Methionin im intakten Protein nicht ohne Nebenreaktionen durchführbar.

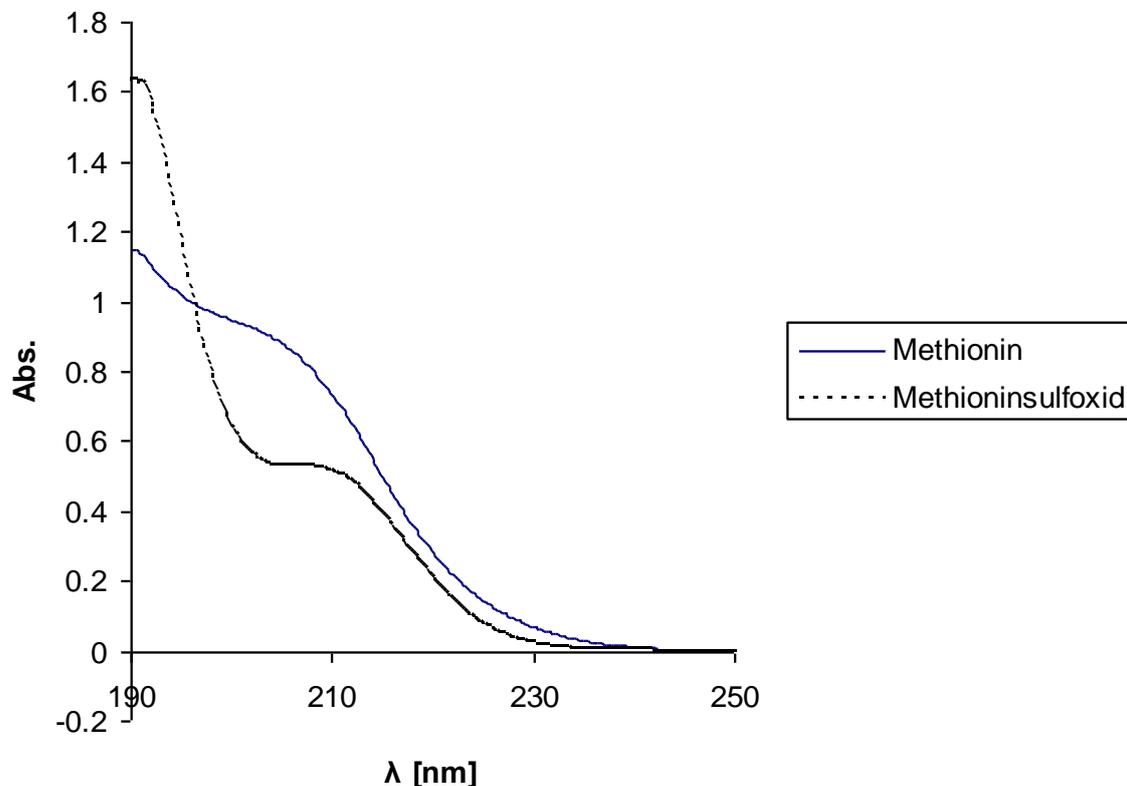


Abb. 18: UV-Spektren von 500 μ M Methionin und Methioninsulfoxid in wässriger Lösung (d = 1 cm; Quarzküvetten)

Thermische Derivatisierung

Eine weitere Methode zur Derivatisierung von Methioninsulfoxid könnte die thermische Fragmentierung durch Mikrowellenstrahlung sein. Dazu wurden Versuchsreihen durchgeführt, bei denen 100 mM Methionin-sulfoxidlösungen jeweils bei 800 W in einer handelsüblichen Mikrowelle zwischen 1 und 10 min bestrahlt wurden. Das Reaktionsgefäß

wurde dabei zum einen offen gelassen und zum anderen druckdicht verschlossen. In keinem der Fälle trat eine Umsetzung ein. Abb. 19 zeigt exemplarisch eines der Chromatogramme (800W, 10 min, offenes Gefäß), welches nur den Methioninsulfoxid-Peak zeigt.

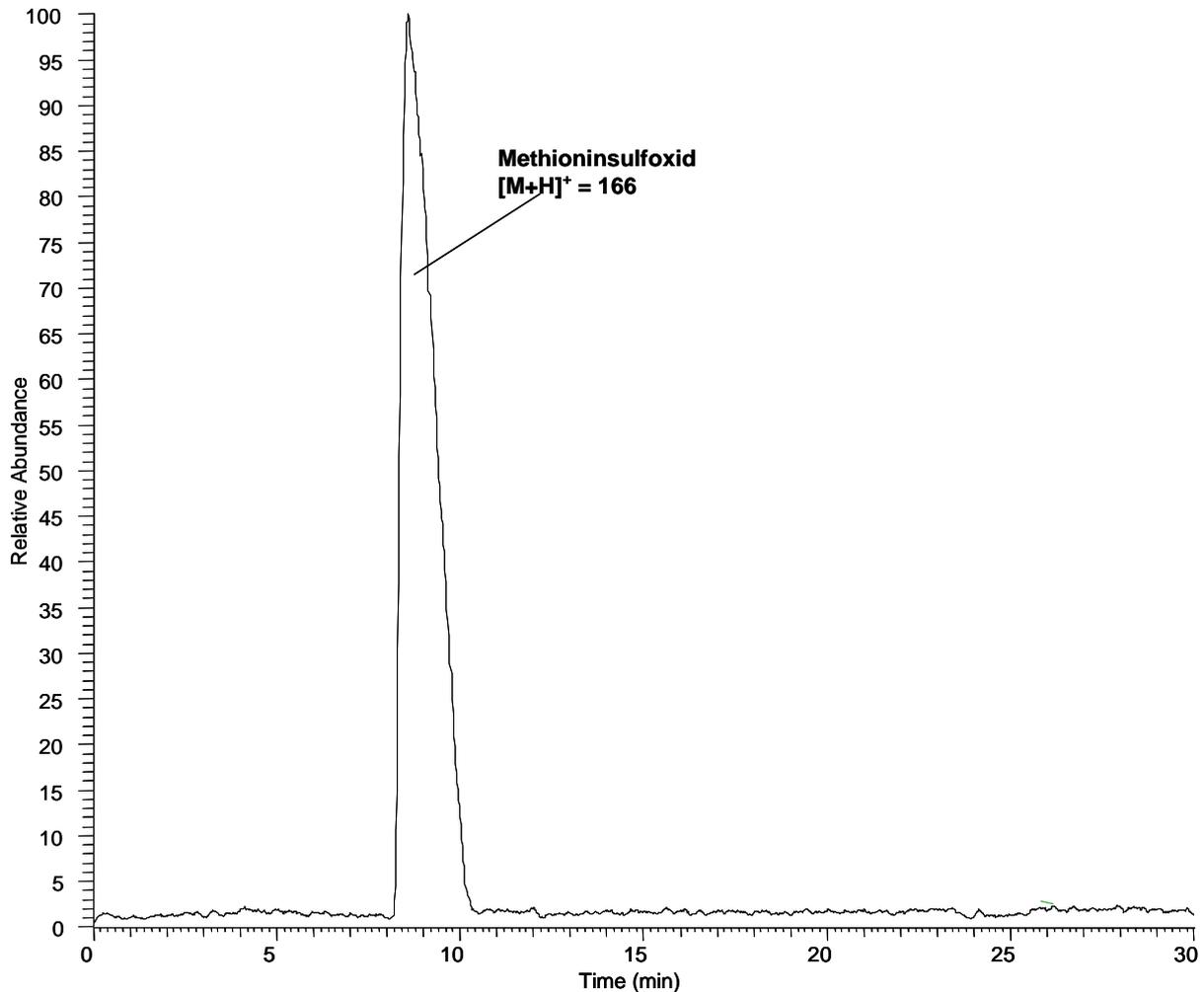
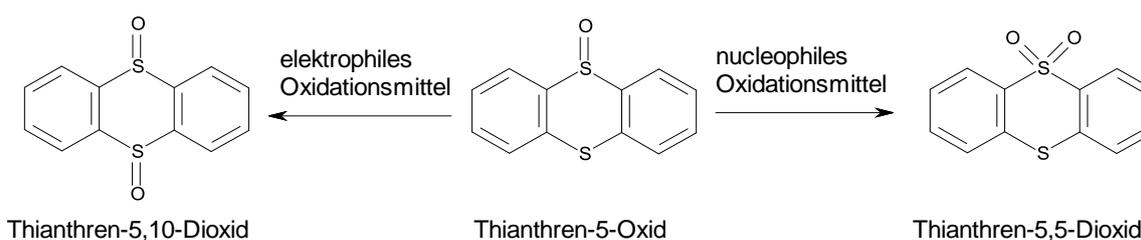


Abb. 19: Basisionenchromatogramm der mikrowellenbestrahlten Methioninsulfoxidprobe; $t = 10$ min; $c = 100$ mM; $V = 100$ μ l, offenes Gefäß, $p = 800$ W; Ionenspuren von Methioninsulfoxid ($m/z = 166$) und Vinylglycin ($m/z = 102$)

4.1.5.2 Selektive Oxidation von Methioninsulfoxid zum Sulfon

Es ist bekannt, dass Sulfide und Sulfoxide unterschiedliches Redoxverhalten zeigen. So werden Sulfide bevorzugt von elektrophilen und Sulfoxide von nucleophilen Oxidationsmitteln angegriffen. Arbeiten von Adam et al. nutzen diese Tatsache zur systematischen Einteilung von Oxidationsmitteln in elektrophile und nucleophile Verbindungen^[124]. Dafür verwenden sie Thianthren-5-oxid, welches je nach Art des Oxidationsmittels in das Bissulfoxid oder in das Sulfon überführt wird (s. Schema 6).



Schema 6: Oxidation von Thianthren-5-Oxid mit nucleophilen und elektrophilen Oxidationsmitteln.

Mit dieser Methode wurden verschiedene Sauerstoff-Transfer Reagenzien auf ihren elektronischen Charakter hin überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 unter sauren Bedingungen, wie für die Oxidation von Methionin verwendet, zu den elektrophilen Oxidationsmitteln zählt. Dies erklärt, warum eine Weiteroxidation des Methioninsulfoxids nie beobachtet wurde. Um diese nun zu gewährleisten, bietet sich nach Ergebnissen von Adam et al. das Superoxidanion bzw. Kaliumsuperoxid an. Ihren Ergebnissen zufolge greift Superoxid selektiv an der Sulfoxid-Seite an und konvertiert das Thianthren-5-Oxid zu 100 % zum Sulfon^[124]. Demnach müsste es möglich sein, Methioninsulfoxid mit KO_2 zum Sulfon zu oxidieren, ohne dabei ungeschädigtes Methionin anzugreifen. Die Reaktion kann allerdings nicht, wie von Adam durchgeführt, in Benzol stattfinden, da Proteine in diesem Solvens nicht löslich sind. Aus diesem Grund wurde versucht das Experiment in Wasser durchzuführen. Superoxidanionen unterliegen in wässrigen Lösungen einer raschen Dismutation, wobei Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff entstehen^[125]:



In aprotischen Lösungsmitteln kann das Anion stabilisiert werden. Um KO_2 als Superoxid-Quelle nutzen zu können, wurde es daher in einer wasserfreien DMSO-Lösung in Anlehnung an das Verfahren von Trevithick et al. solvatisiert^[126]. Dabei lässt sich die spontane Dismutation um ein Vielfaches ($k = 1,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) verlangsamen^[127]. Zusätzliche Stabilisierung erhält man durch die Bildung nichtsolvatierter Molekülkomplexe mit 18-Krone-6.

500 μl einer so hergestellten 10 mM KO_2 -Lösung wurden mit Hilfe eines Injektorsystems mit einem konstanten Fluss von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ zu 500 μl einer wässrigen 10 mM Methionin- bzw. Methioninsulfoxidlösung gegeben. Zum Schutz vor Oxidation durch das entstehende H_2O_2 , wurde der Reaktionsmischung Katalase zugesetzt, welche das Wasserstoffperoxid rasch zu

Wasser und Sauerstoff disproportioniert. Anschließend wurden 100 µl der Mischung in das LC-MS-System injiziert, die Produkte chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch analysiert.

Die chromatographische Trennung von Methionin und der Oxidationsderivate gestaltete sich, aufgrund des zwitterionischen Charakters von Aminosäuren, schwierig. Es wurde auf eine starke Kationenaustauschersäule zurückgegriffen. Die Trennung gelang durch starkes Ansäuern des Eluenten A ($\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{TFA}$), so dass die Carboxylgruppe protoniert vorlag und die Wechselwirkung mit der stationären Phase über die protonierte Aminogruppe stattfand. Zur besseren Desorption der Analyte wurde dem Laufmittel B Ammoniak ($\text{ACN} + 0,1\% \text{NH}_3$) zugesetzt, so dass bei steigendem Gradienten die Konzentration an Ammoniumionen stetig stieg und diese mit dem Analyten um die Bindungsplätze konkurrierten. Die Verwendung von Triethylamin führte zwar zu besser aufgelösten Peaks, verursachte jedoch auch ein intensives Massensignal bei $m/z = 102$, das ein starkes Untergrundrauschen verursachte. Ein Beispielchromatogramm einer Lösung von je 10 mM Methionin, Methioninsulfoxid und Methioninsulfon zeigt Abb. 20.

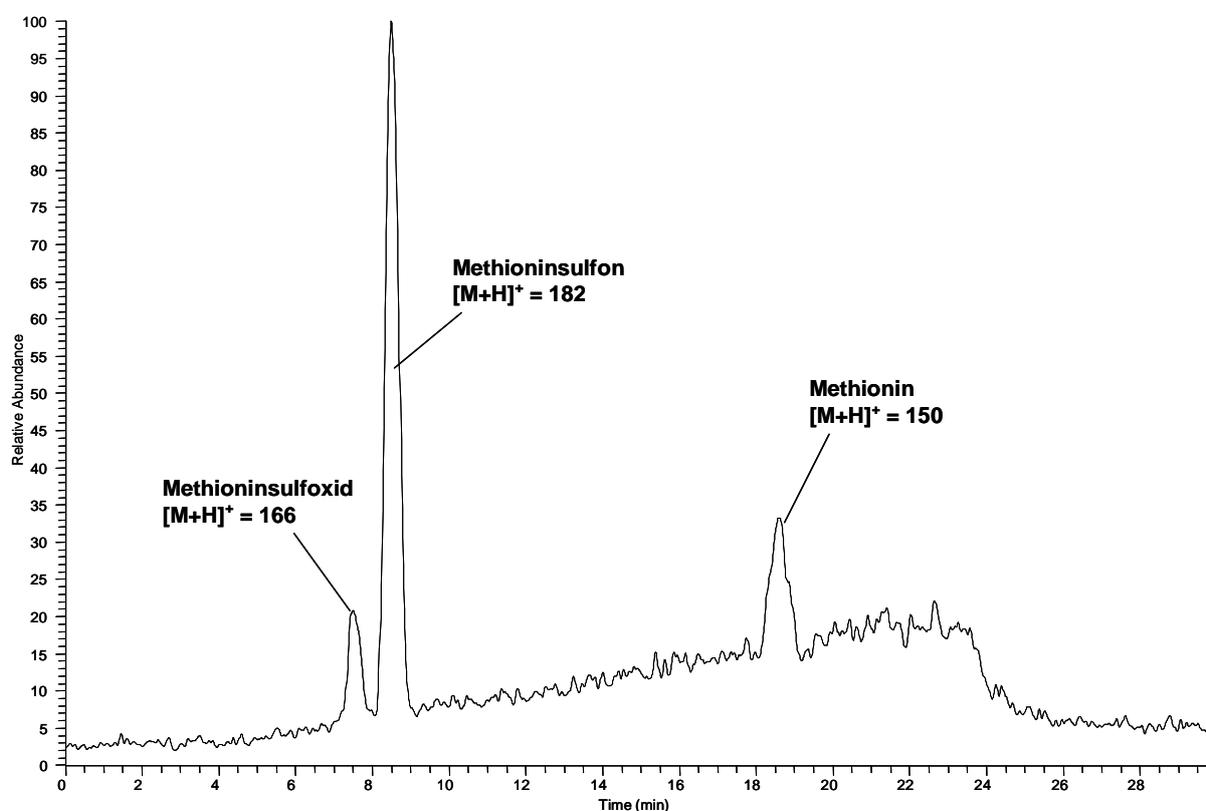


Abb. 20: Basisionenchromatogramm von Methionin, Methioninsulfoxid und Methioninsulfon (je 10 mM; Injektionsvolumen 100 µl)

Die Umsetzung von Methionin mit KO_2 führte, wie Abb. 21 zu entnehmen ist, zu keiner Reaktion und zwar weder direkt nach der Zugabe, noch nach einer Reaktionszeit von 18 h. Dies entspricht den Erwartungen. Die Anwesenheit des DMSO führte zudem zu einer Retentionszeitverschiebung.

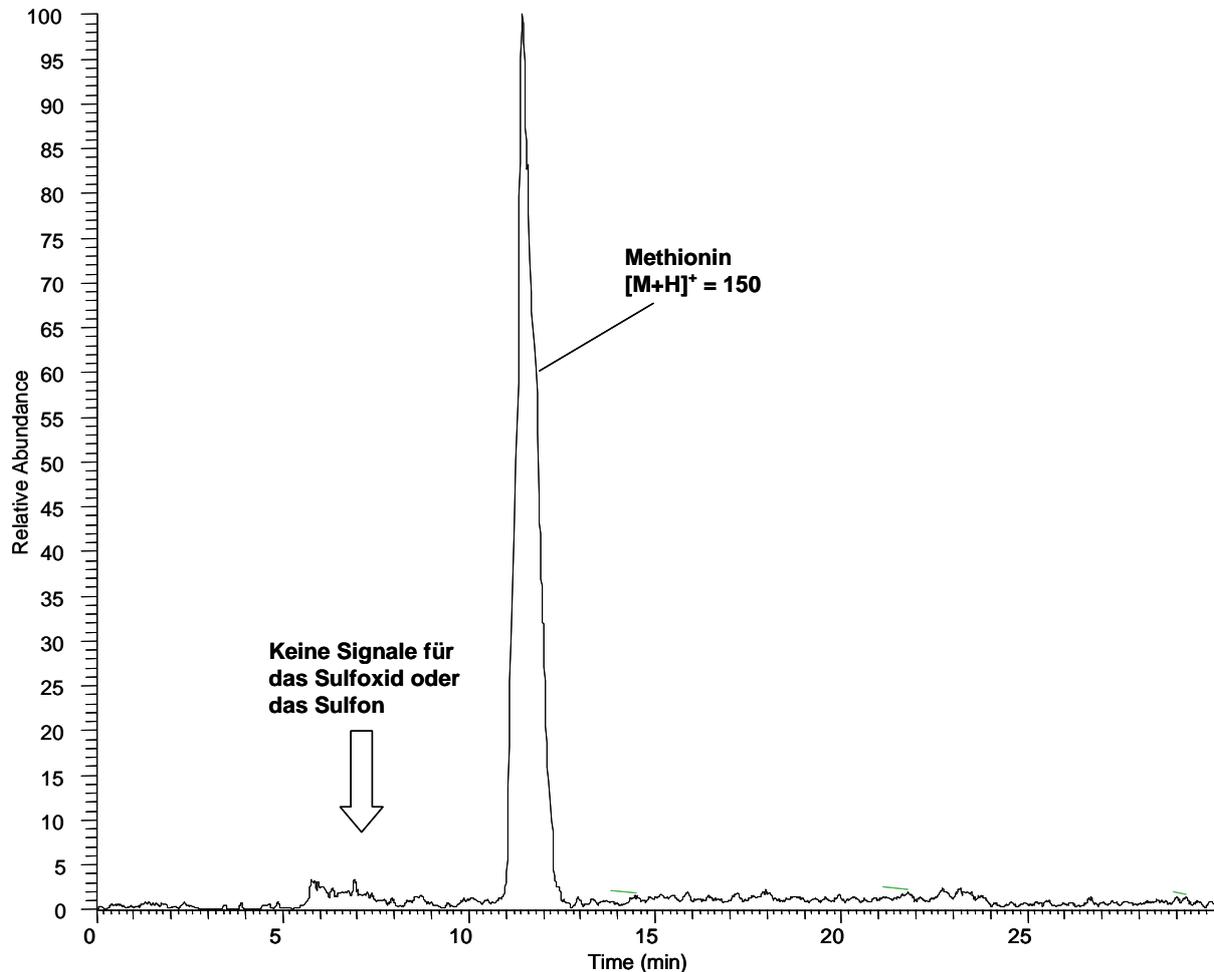


Abb. 21: Basisionenchromatogramm des Oxidationsversuches von Methionin mit KO_2 . Gesucht wurde nach den Ionen der Massen 150, 166 und 182.

Die Oxidation des Sulfoxids mit KO_2 zeigte überraschend auch keine Reaktion (Abb. 22). Dies könnte auf die geringe Stabilität des Superoxidanions in wässrigen Lösungen zurückzuführen sein. Daher wurde der Oxidationsversuch mit Methioninsulfoxid in DMSO anstelle von Wasser wiederholt, da DMSO als einziges organisches Lösungsmittel für das Arbeiten mit Proteinen in Betracht kommt. Jedoch auch in reinem DMSO lässt sich selbst nach 3 Tagen keine Oxidation feststellen. Dies könnte daran liegen, dass das DMSO, selbst ein Sulfoxid, bevorzugt oxidiert wird.

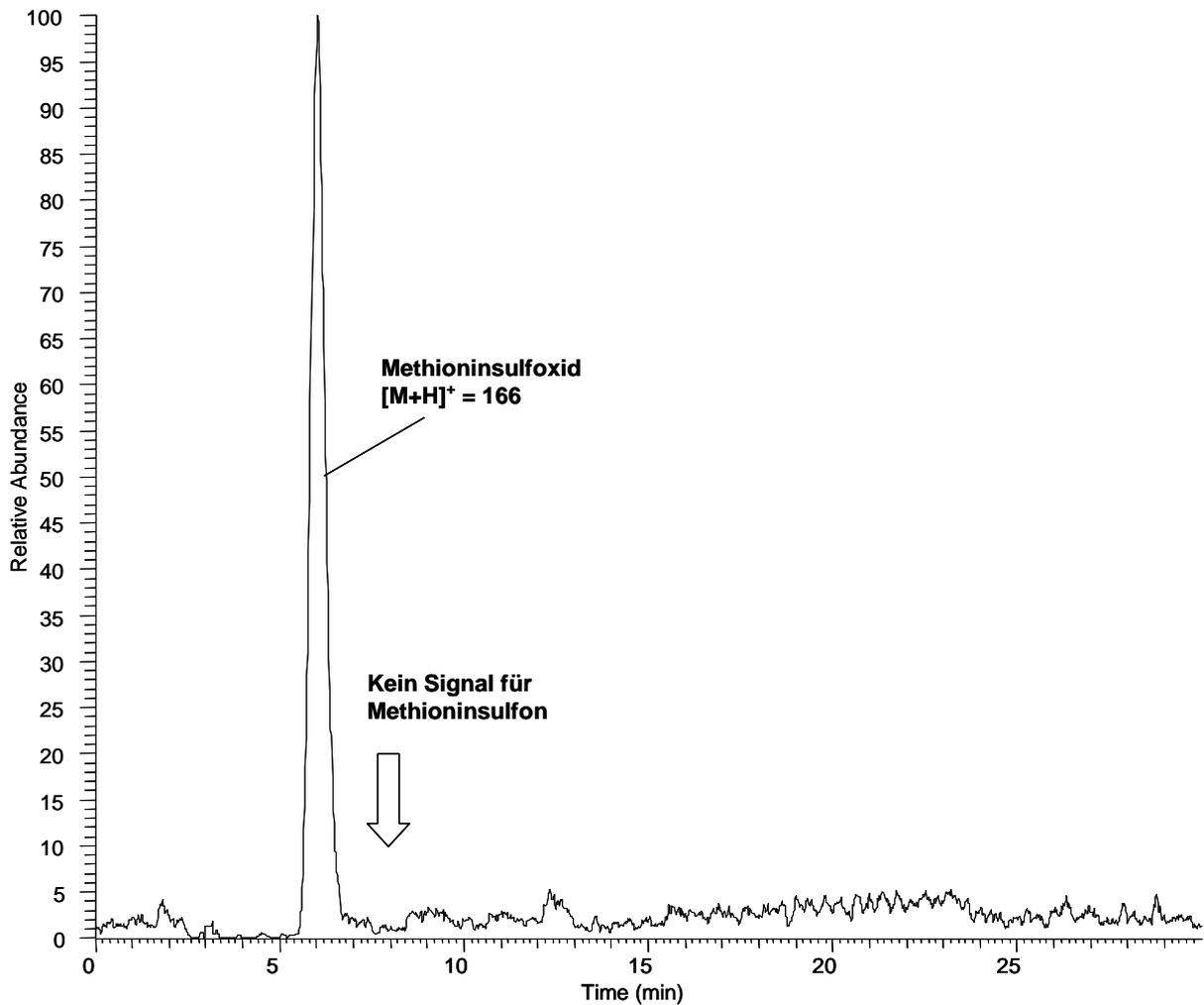
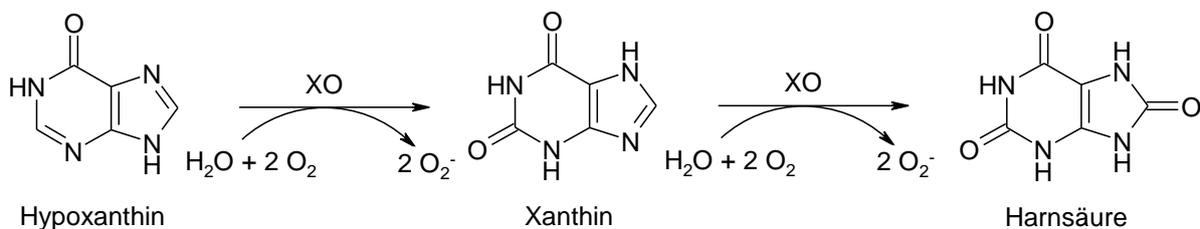


Abb. 22: Basitionenchromatogramm des Oxidationsversuches von Met(O) mit KO_2 . Gesucht wurde nach den Ionen der Massen 150, 166 und 182.

Schließlich wurde die Oxidation durch enzymatische Generierung von Superoxidanionen versucht. Xanthinoxidase (XO) ist ein Enzym, welches Hypoxanthin (HX) als Substrat zu Harnsäure (UA) umsetzt und dabei Superoxid generiert (Schema 7).



Schema 7: Umsetzung von Hypoxanthin zu Harnsäure durch Xanthinoxidase

Diese Reaktion sollte genutzt werden, um Superoxid zu produzieren. Dabei ist es möglich, über einen bestimmten Zeitraum eine kontinuierliche Superoxidproduktion zu gewährleisten, so dass der instabile Reaktand stets in der Lösung vorhanden ist. Limitiert ist die Konzentration an Superoxid nur durch die begrenzte Löslichkeit von HX in Wasser.

Für die Oxidation wurden jeweils 100 µl einer 100 mM Methionin- bzw. Methioninsulfoxid-Lösung zu 900 µl einer 7,3 mM HX-Lösung gegeben. Nach vollständigem Ablauf der Reaktion bestand ein Verhältnis von Superoxid zu Ausgangsmaterial von 2,6:1. Zum Schutz vor Oxidation durch entstehendes H₂O₂ wurde den Reaktionsmischungen Katalase zugesetzt. Selbst mit dieser Methode ließen sich weder Methionin (Abb. 23) noch das Sulfoxid (Abb. 24) oxidieren. Das Ende der Reaktion konnte am Verschwinden des HX-Peaks und am Auskristallisieren der in Wasser unlöslichen Harnsäure nachvollzogen werden.

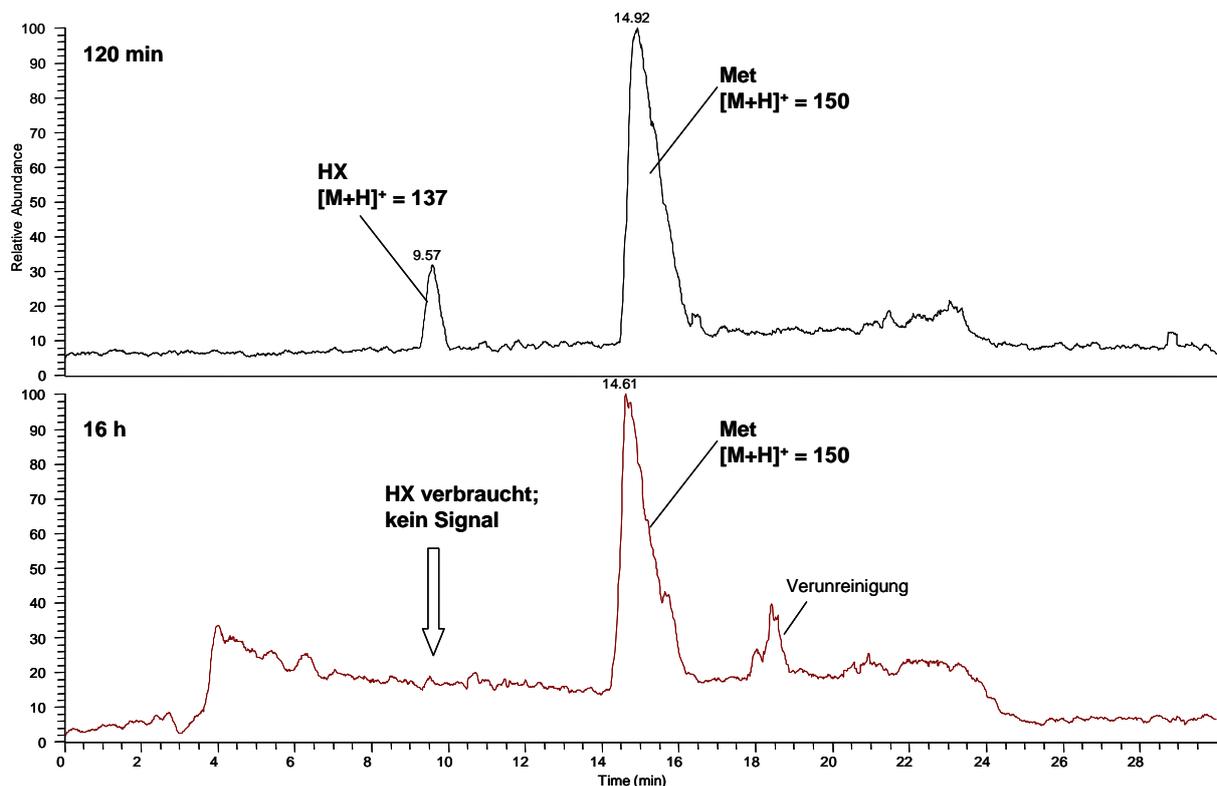


Abb. 23: Basisionenchromatogramm der Oxidation von Methionin mit HX/XO nach 120 min (oben) und 16 h (unten).

Als Grund für die nicht ablaufende Oxidation ist wohl die rasche Dismutation von Superoxid-Radikalen in wässrigen Medien zu diskutieren. Auch könnte die zugesetzte Katalase über das Eisen-Ion im aktiven Zentrum die entstehenden Superoxid-Radikale abfangen und

unschädlich machen. Da aber die Bildung von Wasserstoffperoxid nicht zu vermeiden ist, ist zum Schutz des ungeschädigten Materials ein Zusatz des protektiven Enzyms erforderlich.

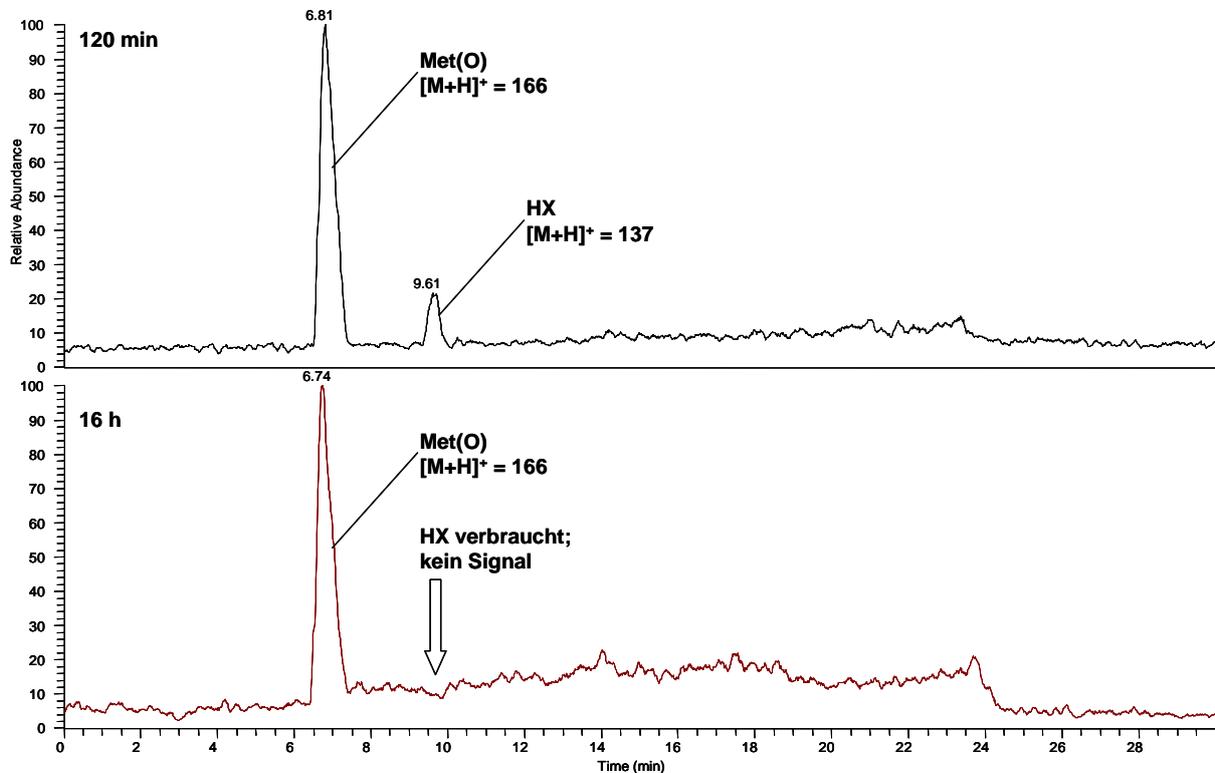


Abb. 24: Basisionenchromatogramm der Oxidation von Methioninsulfoxid mit HX/XO nach 120 min (oben) und 16 h (unten)

Damit sind alle Ansätze zur Konservierung des eingetretenen Schadens des redoxlabilen Methionins Met-237 gescheitert. Die Erprobung weiterer Oxidationsmittel erscheint nicht vielversprechend, da sie entweder schwer zugänglich, oder nicht in Wasser löslich oder nicht selektiv genug sind.

Da im Sinne einer routinemäßigen Analyse eine positive Kosten-Nutzen-Bilanz gewahrt werden muss, ist die Entwicklung aufwendiger Methoden nicht angebracht, da der Aufwand den Erkenntnisgewinn nicht rechtfertigen würde. Es muss also in Kauf genommen werden, dass durch die Aufarbeitung des Proteins zum Zwecke der Analyse ein partieller Datenverlust eintritt. Somit kann als Maß für den Schädigungsgrad des Proteins nicht der Gesamtschaden herangezogen werden. Viel mehr muss eine Beschränkung auf die Betrachtung ausgewählter Peptide vorgenommen werden. Für die Quantifizierung des oxidativen Schadens am Methionin Met-237 müssen neue Ansätze gefunden werden. Hierzu könnte ein tryptischer Verdau ohne vorhergehende reduktive Alkylierung einen Weg darstellen.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren als analytische Sonde

4.2.1 *Nachweis von Methionin und Cystein*

Die in Teil 1 durchgeführten Oxidationsversuche zeigen, dass eintretende oxidative Schäden hauptsächlich die schwefelhaltigen Aminosäuren betreffen. Das Fragmentierungsverhalten der betroffenen modifizierten Aminosäure kann folglich als Sonde für das Vorhandensein von Methionin und Cystein verwendet und in der Proteomforschung im Sinne der Sequenzaufklärung genutzt werden.

Selbst bei bekannter Aminosäuresequenz eines Proteins und bei Verwendung selektiver Proteasen treten immer wieder Fehlschnitte auf, die Peptide erzeugen, welche nicht theoretisch vorhergesagt werden können. Zur Aufklärung solcher Peptide im Chromatogramm, ist jede verfügbare Information wünschenswert. Bei unbekannter Sequenz des Peptids, kann anhand des bestimmten Molekulargewichts, eine Liste der in Betracht kommenden Peptide erstellt werden. Je größer das Peptid ist, desto mehr Variabilitäten ergeben sich für das Peptidsegment. Ferner führen Messungenauigkeiten des Gerätes dazu, dass das ermittelte Molekulargewicht mit einer Fehlertoleranz behaftet ist und präzise Aussagen erschwert werden. Die Verwendung von Massenspektrometern mit hoher Präzision kann zur Bestimmung der akuraten Masse beitragen. Im Falle einer de novo Sequenzierung, ist die Anzahl der in Betracht kommenden Proteine aus denen das Peptidsegment stammt sehr groß. Die Bestimmung des Peptids kann oft mit speziellen Such-Algorithmen in Internetdatenbanken erfolgen, bedarf aber gut aufgelöster MS²-Spektren, die nicht immer gegeben sind. Folglich ist es oft schwierig genaue Zuordnungen zu treffen. Ein Test auf das Vorhandensein von Methionin und/oder Cystein schränkt die Anzahl der Möglichkeiten deutlich ein, so dass die Suche nach dem betreffenden Peptid erheblich vereinfacht wird.

Die Anwendung dieser Aufklärungsmethode soll im Folgenden am Peptid IgG1: E142-155¹ mit der Sequenz VTCVVVDVSHEDPE, welches bei der Retentionszeit von 42 min eluiert, veranschaulicht werden.

Von dem in Abb. 25 dargestellten, noch unbekanntem Signal musste zunächst der Ladungszustand bestimmt werden, welcher aus der Betrachtung des MS¹ Spektrums hervorgeht. Wie Abb. 26 zeigt, enthielt der Peak neben einigen Verunreinigungen hauptsächlich die Signale mit den m/z-Werten 794,6 und 1585,1, woraus bereits geschlussfolgert werden konnte, dass die Signale beide von einem Peptid stammen, das in zwei verschiedenen Ladungszuständen detektiert wurde. Dabei konnte es sich um die einfach und doppelt geladenen Ionen oder aber um die doppelt und vierfach geladenen Ionen handeln. Im ersten Falle müsste ein dreifach geladenes Ion das m/z-Verhältnis 529,0 aufweisen, welches aber nicht detektiert wurde und somit nicht zur eindeutigen Bestimmung des Ladungszustandes herangezogen werden konnte. Für die Aufklärung wurde zusätzlich nach dem Natrium-Adduktion des Ions mit dem m/z-Verhältnis 1585,1 gesucht. In unmittelbarer Nähe wurde ein Signal mit dem m/z-Verhältnis 1606,9 beobachtet, das rund 22 Th schwerer ist, als das zu untersuchende Signal. Dies ließ auf ein Natrium-Addukt schließen. Natrium lässt sich nie vollständig aus der Probe oder dem Eluenten entfernen, so dass zumeist die eher als störend empfundenen Natrium-Addukt-Signale zu beobachten sind. Im Falle der Bestimmung des Ladungszustandes kann dieses Phänomen ausgenutzt werden. Die Massenverschiebung um 22 Th sprach eindeutig dafür, dass es sich um das einfach geladene Ion handelt. Beim doppelt geladenen betrüge die Verschiebung nämlich nur 11 Th. Somit kann festgehalten werden, dass das Signal mit dem m/z-Wert 1585,1 vom [M+H]⁺-Ion herrührt und das Signal 1606,9 dem [M+Na]⁺-Ion zuzuordnen ist. Das Signal bei 794,6 entspricht folglich dem [M+2H]²⁺-Ion.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

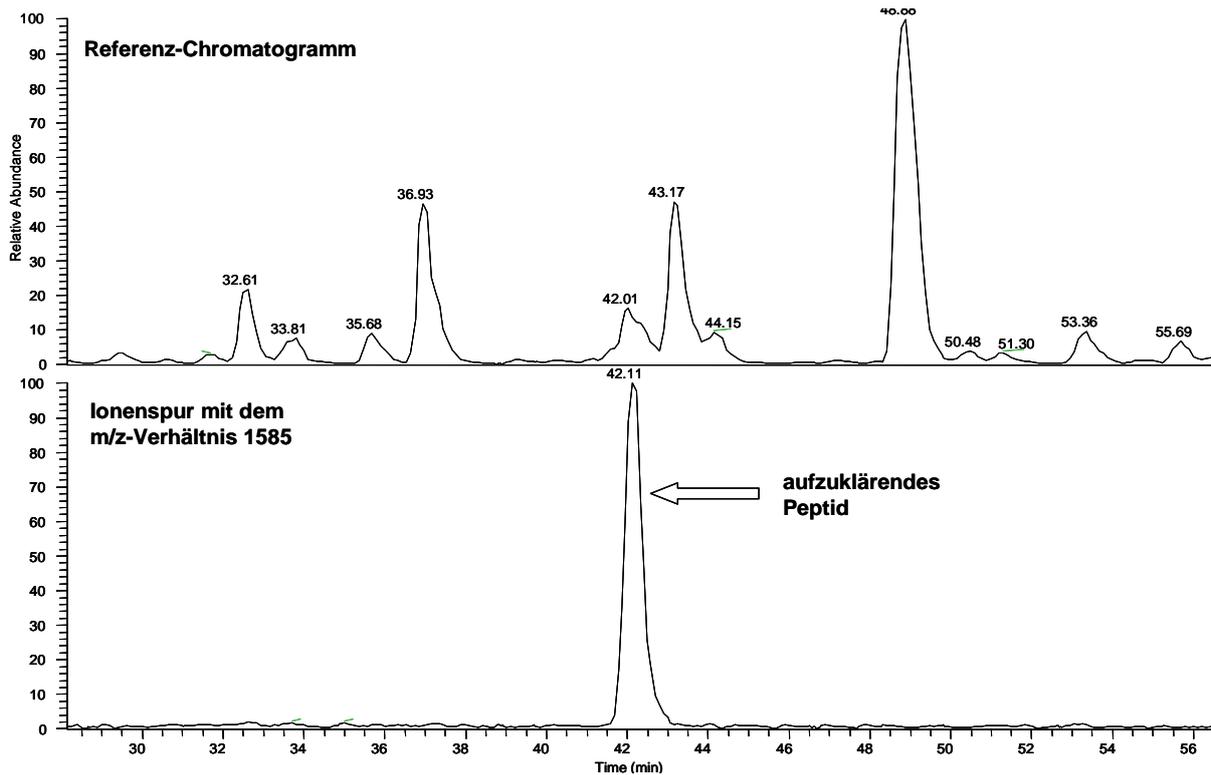


Abb. 25: Basisionenchromatogramm des IgG-Verdau (oben) und Ionenspur des gesuchten Peptides mit dem m/z-Verhältnis 1585,1 (unten)

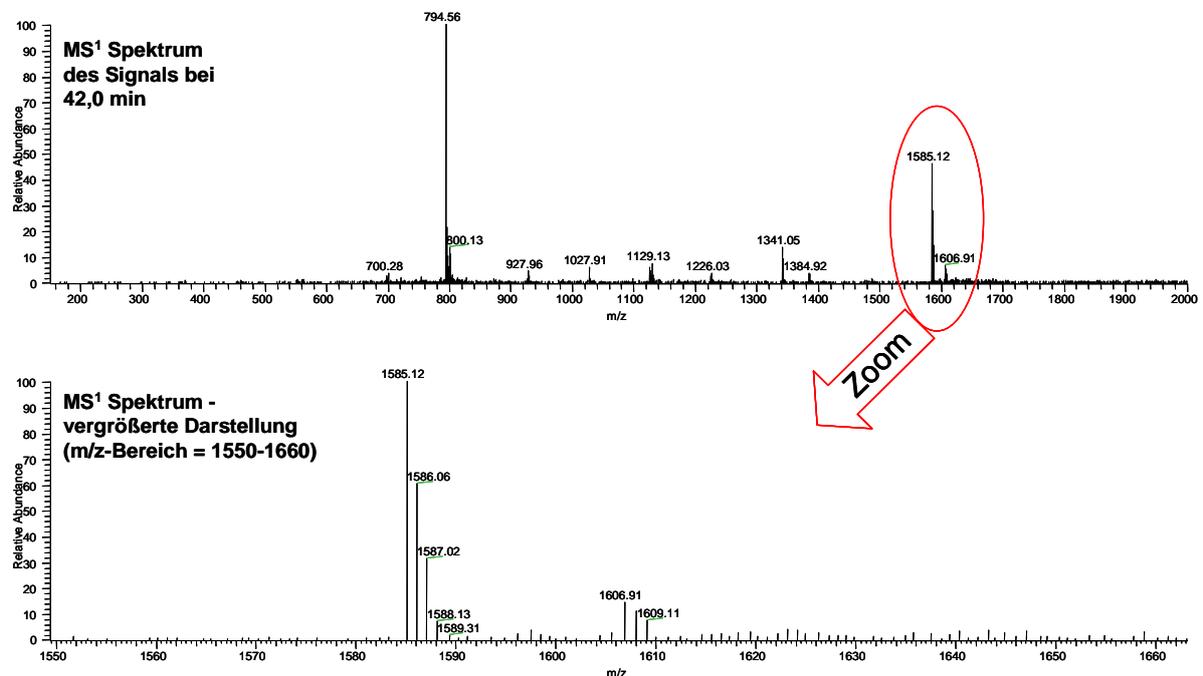


Abb. 26: MS¹-Spektrum des Peaks zur Retentionszeit 42,0 min (oben) mit vergrößertem Ausschnitt (unten)

Die Betrachtung des MS² Spektrums lieferte zunächst nicht viele Informationen über die Sequenz des gesuchten Peptides. Der einzige deutlich erkennbare Abstand, dessen m/z-Differenz der Masse einer Aminosäure entspricht, liegt zwischen den Signalen bei m/z = 1340,6 und 1225,6 und weist auf die Aminosäure Asparaginsäure (D) in der Sequenz hin (Abb. 27).

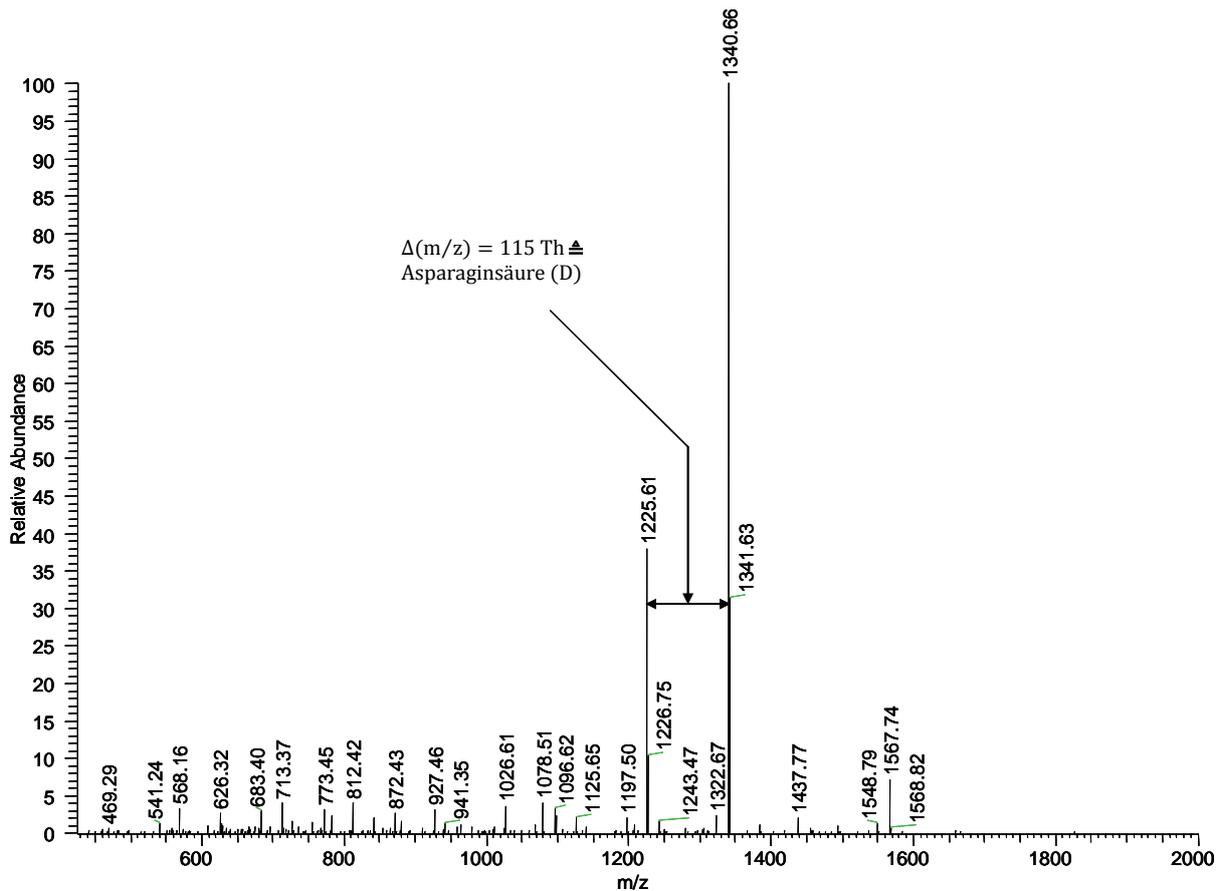


Abb. 27: MS²-Spektrum des gesuchten Peptides zur Retentionszeit 42,0 min ($[M+H]^+ = 1585,1$)

Nach diesen ersten Schritten wurde anhand des Molekulargewichts (1584,1 Da) mit dem Programm GPMW eine Liste der möglichen Peptide mit einer für das verwendete Gerät üblichen Fehlertoleranz von 0,05% erstellt. Dazu mussten alle möglichen Sequenzen des IgG berücksichtigt werden: Die schweren Ketten des IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, sowie die leichten Ketten κ und λ . Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierteschwefelhaltiger Aminosäuren

Peptid-Nr.	theoretische Masse	Δm zur experimentellen Masse in %	Zuordnung	Erste AS	Letzte AS	Sequenz
1	1583.87	-0.01	IgG1	248	261	LTCLVKGFYPSDIA
2	1583.83	-0.02	IgG1	22	35	TAALGCLVKDYFPE
3	1583.81	-0.02	IgG1	222	235	AKGQPREPQVYTLF
4	1583.76	-0.02	IgG1	234	247	LPPSRDELTKNQVS
5	1583.76	-0.02	IgG1	235	248	PPSRDELTKNQVSL
6	1583.76	-0.02	IgG1	155	167	EVKFNWYVDGVEV
7	1583.76	-0.02	IgG1	63	78	YSLSSVVTVPSSSLGT
8	1583.75	-0.02	IgG1	297	309	KSRWQQGNVFSCS
9	1584.72	0.04	IgG1	143	156	TCVVVDVSHEDPEV
10	1584.72	0.04	IgG1	140	153	PEVTCVVVDVSHED
11	1584.72	0.04	IgG1	142	155	VTCVVVDVSHEDPE
12	1584.72	0.04	IgG1	141	154	EVTCVVVDVSHEDP
13	1584.76	0.04	IgG1	307	319	SCSVMHEALHNHY
14	1584.79	0.04	IgG1	43	58	SGALTSGVHTFPAVLQ
15	1584.79	0.04	IgG1	44	59	GALTSGVHTFPAVLQS
16	1584.84	0.05	IgG1	215	228	IEKTISKAKGQPRE
17	1583.87	-0.01	IgG2	244	257	LTCLVKGFYPSDIA
18	1583.83	-0.02	IgG2	95	106	DKTVERKCCVEC
19	1583.83	-0.02	IgG2	22	35	TAALGCLVKDYFPE
20	1583.77	-0.02	IgG2	163	175	VHNAKTKPREEQF
21	1583.75	-0.02	IgG2	293	305	KSRWQQGNVFSCS
22	1583.72	-0.02	IgG2	13	27	PCSRSTSESTAALGC
23	1583.72	-0.02	IgG2	151	163	EVQFNWYVDGVEV
24	1584.72	0.04	IgG2	137	150	EVTCVVVDVSHEDP
25	1584.72	0.04	IgG2	138	151	VTCVVVDVSHEDPE
26	1584.72	0.04	IgG2	139	152	TCVVVDVSHEDPEV
27	1584.72	0.04	IgG2	136	149	PEVTCVVVDVSHED
28	1584.76	0.04	IgG2	303	315	SCSVMHEALHNHY
29	1584.79	0.04	IgG2	44	59	GALTSGVHTFPAVLQS
30	1584.79	0.04	IgG2	43	58	SGALTSGVHTFPAVLQ
31	1583.87	-0.01	IgG3	208	221	LTCLVKGFYPSDIA
32	1584.72	0.04	IgG3	101	114	EVTCVVVDVSHEDP
33	1584.72	0.04	IgG3	102	115	VTCVVVDVSHEDPE
34	1584.72	0.04	IgG3	103	116	TCVVVDVSHEDPEV
35	1584.72	0.04	IgG3	100	113	PEVTCVVVDVSHED
36	1583.87	-0.01	IgG4	245	258	LTCLVKGFYPSDIA

37	1583.83	-0.02	IgG4	22	35	TAALGCLVKDYFPE
38	1583.81	-0.02	IgG4	219	232	AKGQPREPQVYTLF
39	1583.77	-0.02	IgG4	164	176	VHNAKTKPREEQF
40	1583.76	-0.02	IgG4	63	78	YSLSSVVTVPSSSLGT
41	1583.72	-0.02	IgG4	13	27	PCSRSTSESTAALGC
42	1583.72	-0.02	IgG4	152	164	EVQFNWYVDGVEV
43	1584.73	0.04	IgG4	294	306	KSRWQEGNVFSCS
44	1584.75	0.04	IgG4	313	326	HNHYTQKSLSLSLG
45	1584.76	0.04	IgG4	304	316	SCSVMHEALHNHY
46	1584.79	0.04	IgG4	43	58	SGALTSGVHTFPAVLQ
47	1584.79	0.04	IgG4	44	59	GALTSGVHTFPAVLQS
48	1584.84	0.05	IgG4	212	225	IEKTISKAKGQPRE
49	1583.87	-0.01	λ	22	35	KATLVCLISDFYPG
50	1583.76	-0.02	λ	12	26	PPSSEELQANKATLV
51	1583.68	-0.03	λ	55	69	TTPSKQSNNKYAASS
52	1583.65	-0.03	λ	83	96	SYSCQVTHEGSTVE

Tab. 13: Theoretisch mögliche Peptidsequenzen mit $[M+H]^+$ -Ionen der Masse 1585,1 innerhalb einer Massentoleranz von $\pm 0,05\%$; Asparaginsäure, Methionin und Cystein sind durch Fettdruck hervorgehoben

Diese Fülle möglicher Peptidsequenzen anhand der theoretisch zu erwartenden b- und y-Ionenserie zu untersuchen, um eine eindeutige Zuordnung zu treffen, wäre zeitraubend und aufwendig. Daher wurde das Peptid auf das Vorhandensein von Methionin und Cystein getestet, um weitere Sequenzinformationen zu erhalten.

Der erzeugte IgG-Verdau wurde bei pH 5 mit 500 äq. H_2O_2 oxidativem Stress ausgesetzt, um die methioninhaltigen Peptide zu oxidieren, ohne das Cystein mitzuschädigen.

In Abb. 28 sind die Basisionenchromatogramme der Referenzprobe und der mit 500 äq. H_2O_2 gestressten Probe untereinander dargestellt, wobei als Ionenspur die m/z-Werte 1585,1, 1601,1, 1617,1 und 1633,1 ausgewählt worden sind, um das Referenzpeptid und Oxidationsprodukte die aus der Einführung von ein bis drei Sauerstoffatomen resultieren, abzubilden. Dabei erkennt man, dass keinerlei Veränderung durch die oxidative Wirkung des H_2O_2 eingetreten ist und das Vorhandensein von Methionin im gesuchten Peptid ausgeschlossen werden kann.

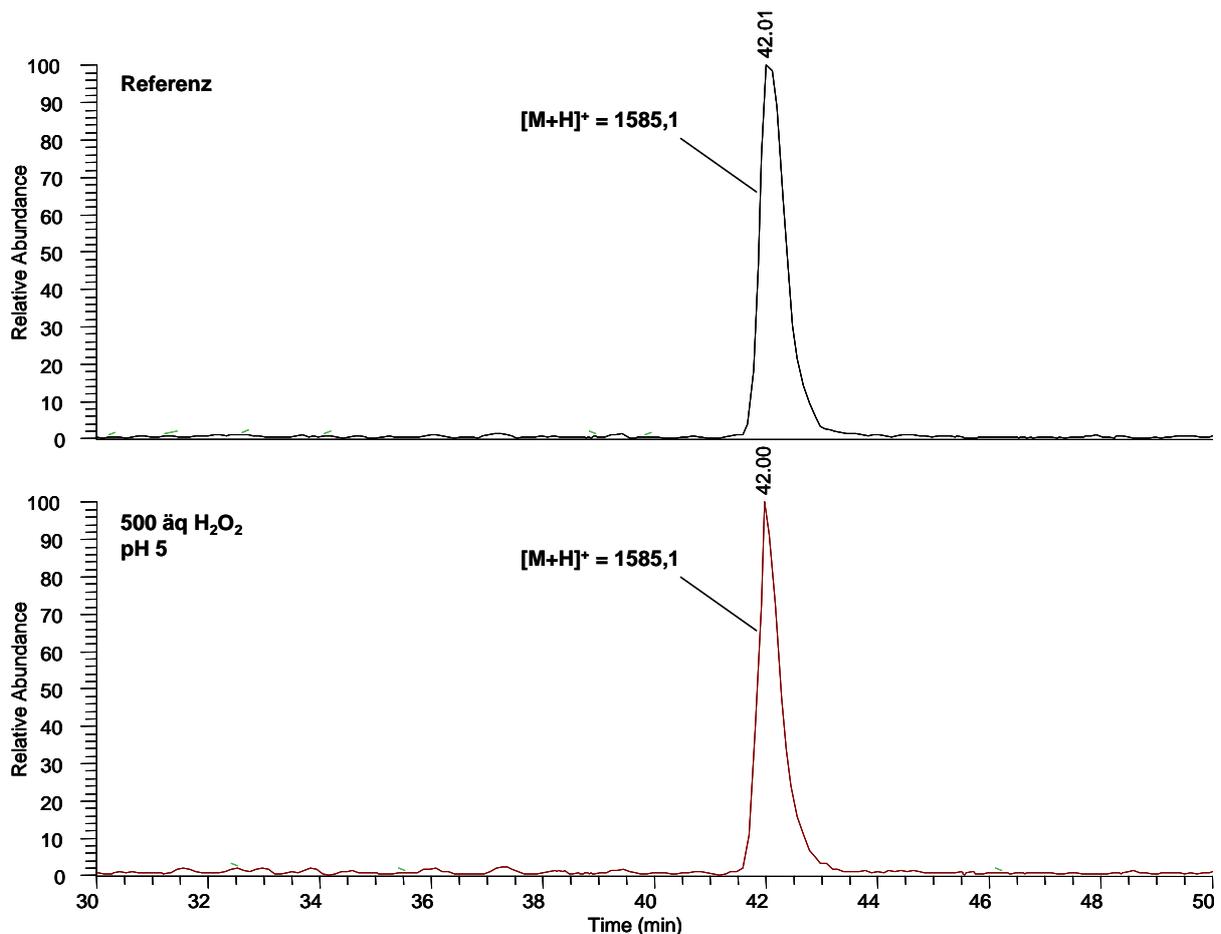


Abb. 28: Ionenspuren der m/z -Werte 1585,1, 1601,1, 1617,1 und 1633,1 der Referenzprobe (oben) und der mit 500 äq. H₂O₂ bei pH 5 gestressten Methionin-Testprobe (unten)

Im nächsten Schritt wurde durch Oxidation mit 2000 äq. H₂O₂ bei pH 3 auf die Inkorporation von Cystein im Peptid getestet. Es wurden die Ionenspuren der m/z -Werte 1585,1, 1601,1, 1617,1 und 1633,1 ausgewertet und im Falle der Cystein-Testprobe zwei neue Signale detektiert, welche beide einem [M+H]⁺-Ion der Masse 1601,1 zugeordnet werden konnten. Der Referenzpeak ist nicht mehr vorhanden. Dies lässt auf vollständige Oxidation des betreffenden Peptides schließen, wobei es sich aufgrund der zwei Signale entweder um Diastereomere eines Peptids mit oxidiertem Cystein oder zwei verschiedene Hydroxytryptophan-Derivate handeln kann. Die Ionenspuren sind in Abb. 29 dargestellt.

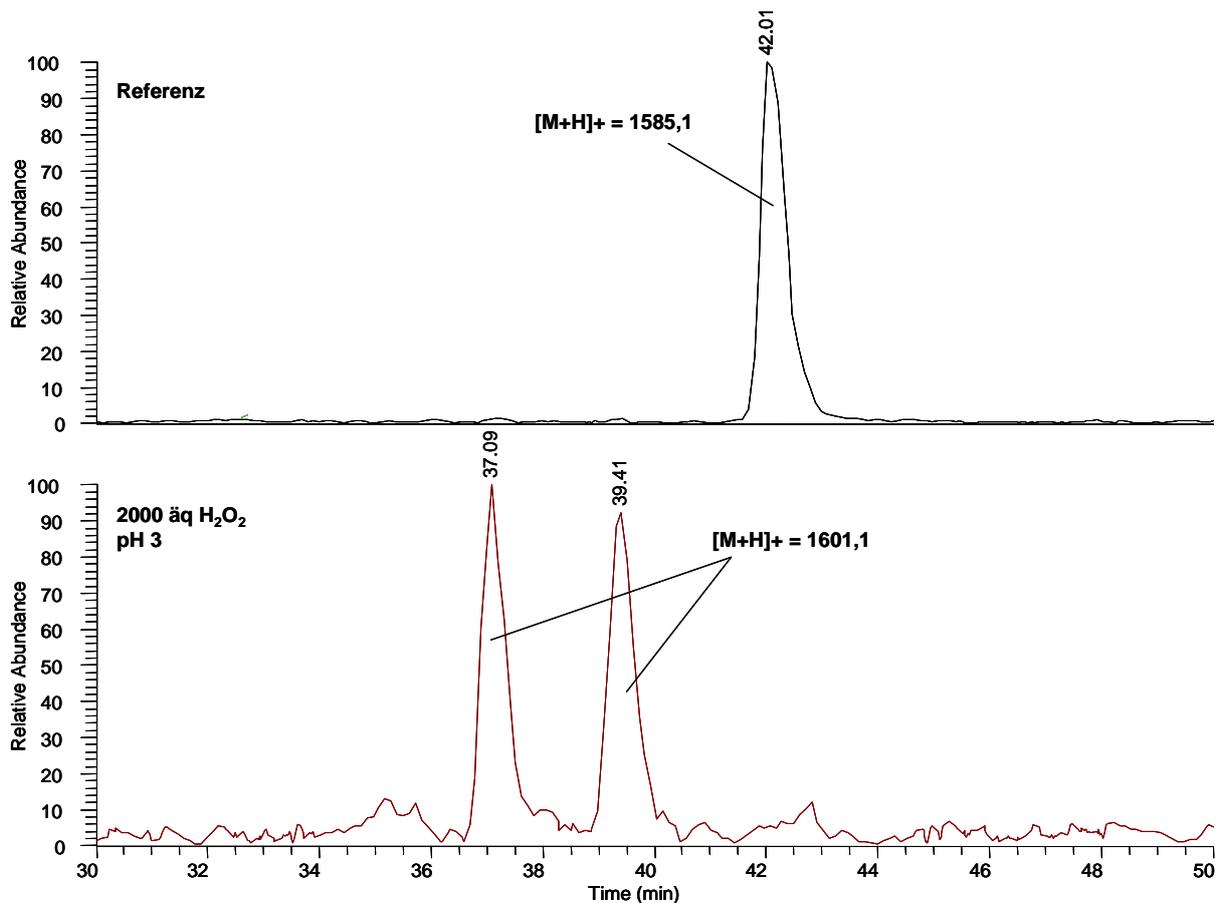


Abb. 29: Ionenspuren der m/z -Werte 1585,1, 1601,1, 1617,1 und 1633,1 der Referenzprobe (oben) und der mit 2000 äq. H_2O_2 bei pH 3 gestressten Cystein-Testprobe (unten)

Da weitere Oxidationsprodukte nicht gefunden wurden, ist zusammenfassend über das gesuchte Peptid folgendes bekannt: es enthält aller Voraussicht nach mindestens einmal die Aminosäure Asparaginsäure, es enthält kein Methionin und genau ein Cystein. Berücksichtigt man diese Informationen und entfernt man die redundanten Peptidsequenzen, die sich aufgrund der Homologie der verschiedenen IgG-Allotypen wiederholen, verbleiben sieben Möglichkeiten für die gesuchte Peptidsequenz, die in Tab. 14 zusammengefasst sind.

Die Betrachtung der zu erwartenden MS^2 -Fragmentierungsmuster der verbliebenen Peptide, führte schließlich zur Aufklärung der Sequenz. Es handelt sich um ein Fehlschnitt-Peptid, bei dem ein Soll-Schnitt nicht erfolgt ist und stammt aus den schweren Ketten des IgG1, IgG2 und IgG3. Das Spektrum, das die Struktur belegt, ist in Abb. 31 dargestellt.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

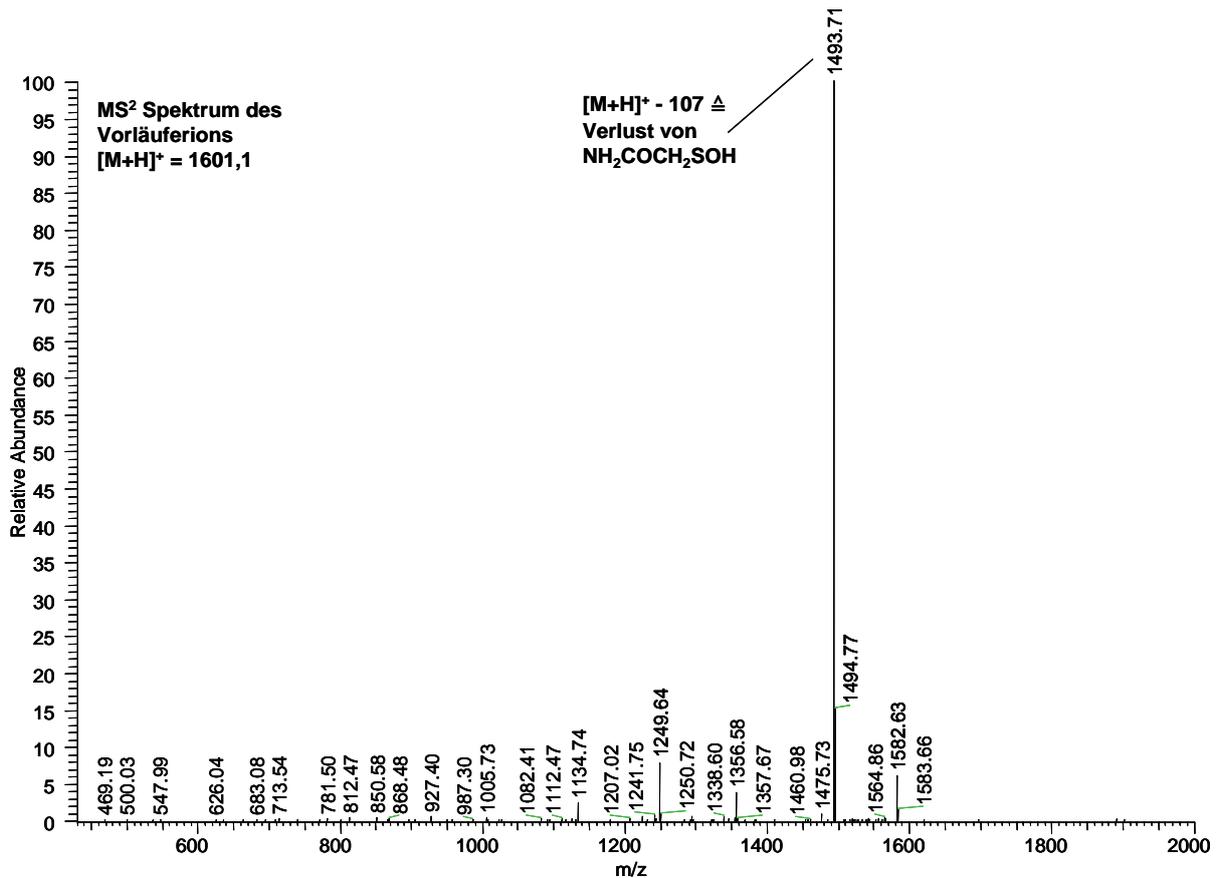


Abb. 30: MS²-Spektrum des Vorläuferions [M+H]⁺ = 1601,1 des einfach oxidierten Peptides

Peptid-Nr.	gefundene Masse	Massenabweichung zum Sollwert in %	Zuordnung	Erste AS	Letzte AS	Sequenz
1,17,31,36	1583.87	-0.01	IgG1,2,3,4	248	261	LTCLVKGFYPSDIA
2,19,37	1583.83	-0.02	IgG1,2,4	22	35	TAALGCLVKDYFPE
9,26,34	1584.72	0.04	IgG1,2,3	143	156	TCVVVDVSHEDPEV
10,27,35	1584.72	0.04	IgG1,2,3	140	153	PEVTCVVVDVSHED
11,25,33	1584.72	0.04	IgG1,2,3	142	155	VTCVVVDVSHEDPE
12,24,32	1584.72	0.04	IgG1,2,3	141	154	EVTCTVVVDVSHEDP
49	1583.87	-0.01	λ	22	35	KATLVCLISDFYPG

Tab. 14: Zu berücksichtigende Sequenzen für das gesuchte Peptid

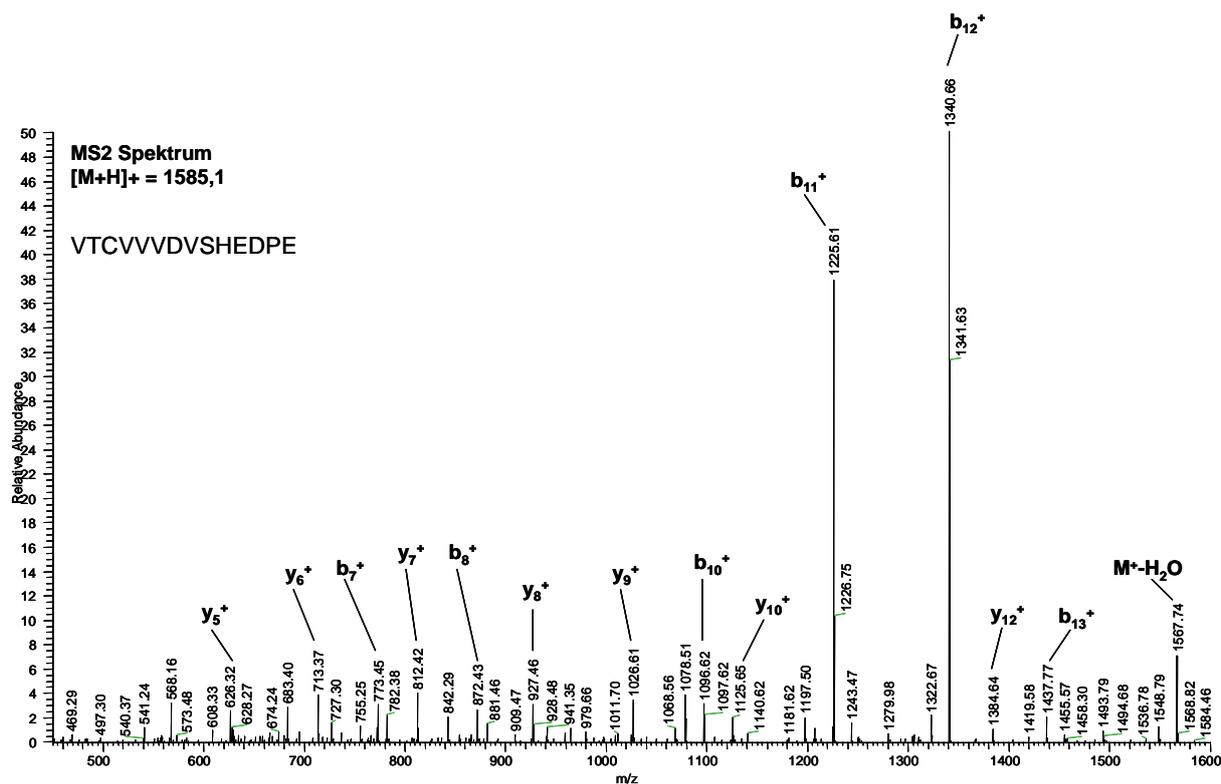


Abb. 31: MS²-Spektrum des aufgeklärten Peptids VTCVVVDVSHEDPE

4.2.2 Nachweis von Cystin und Disulfidbrücken

Oxidiertes Cystin wird nach Giles et al. durch freie Thiole reduziert^[30] (vgl. Schema 4, Kap. 4.1.4.2). Bei der reduktiven Aufarbeitung des Proteins führt die Zugabe von DTT dazu, dass keine Information über den Grad der oxidativen Schädigung von Disulfidbrücken erhalten bleibt. Bei den Untersuchungen von oxidativ gestresstem IgG-Material konnte auch kein Hinweis auf eine Schädigung von Cystein im intakten Protein gefunden werden.

Cystin kann zum Mono- und Dioxid oxidiert werden^[30]. Im Gegensatz zum Oxidationsverhalten liegen keine Informationen über das Fragmentierungsverhalten dieser Spezies vor. Die Fragmentierung oxidierter Disulfidbrücken wurde untersucht, um eine Sonde zur Detektion von SS-Brücken zu entwickeln.

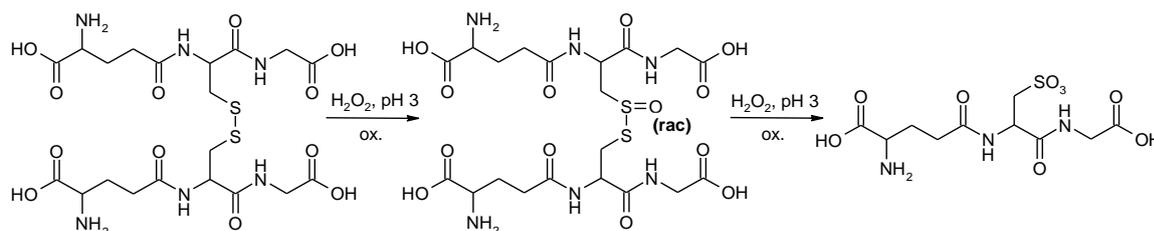
4.2.2.1 Oxidation von Gluthation

Um die Oxidierbarkeit, die Art der Oxidation sowie das Fragmentierungsverhalten von Disulfidbrücken zu untersuchen, wurde Glutathion in seiner oxidierten Form (GSSG), oxidativem Stress ausgesetzt. GSSG ist ein endogenes Tripeptid, welches maßgeblich an Redoxprozessen im Körper beteiligt ist^[128].

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

Die Versuche wurden sowohl unter sauren (pH 3) als auch unter basischen (pH 11) Bedingungen durchgeführt und die Edukte und Produkte chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen eindeutig, dass die Disulfidbrücke des GSSG oxidierbar ist. Bei Verwendung eines pH-Wertes von 3 entstanden zwei neue Peaks, die vor dem GSSG-Peak eluieren und denen ein $[M+H]^+$ -Ion von 629 zuzuordnen ist (Abb. 32). Da das $[M+H]^+$ -Ion des GSSG ein m/z -Verhältnis von 613 aufweist, liegt auf der Hand, dass es sich um die Einführung eines Sauerstoffatoms handeln muss, wobei zwei GSSG-Monooxid Isomere (GS(O)SG) entstanden, die getrennt voneinander eluieren. Lässt man die Oxidation fortschreiten, wird ein weiterer Peak beobachtet, der auf ein $[M+H]^+$ -Ion mit dem m/z -Verhältnis 356 zurückzuführen ist. Die Ursache für diesen Peak bildet das zur Sulfonsäure oxidierte Glutathion(G-SO₃H), das durch den Bruch der SS-Brücke entsteht. (Schema 8). Eine Oxidation des GSSG zum SS-Dioxid ($m/z = 645$) wurde nicht beobachtet.



Schema 8: Oxidation von GSSG unter sauren Bedingungen.

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich eine Abnahme von GSSG bei gleichzeitiger Zunahme von GS(O)SG und G-SO₃H, wobei GS(O)SG ein Maximum bei ca. 600 min durchläuft und danach zu Gunsten des G-SO₃H wieder abnimmt. Das G-SO₃H entsteht demnach durch fortschreitende Oxidation (Abb. 33).

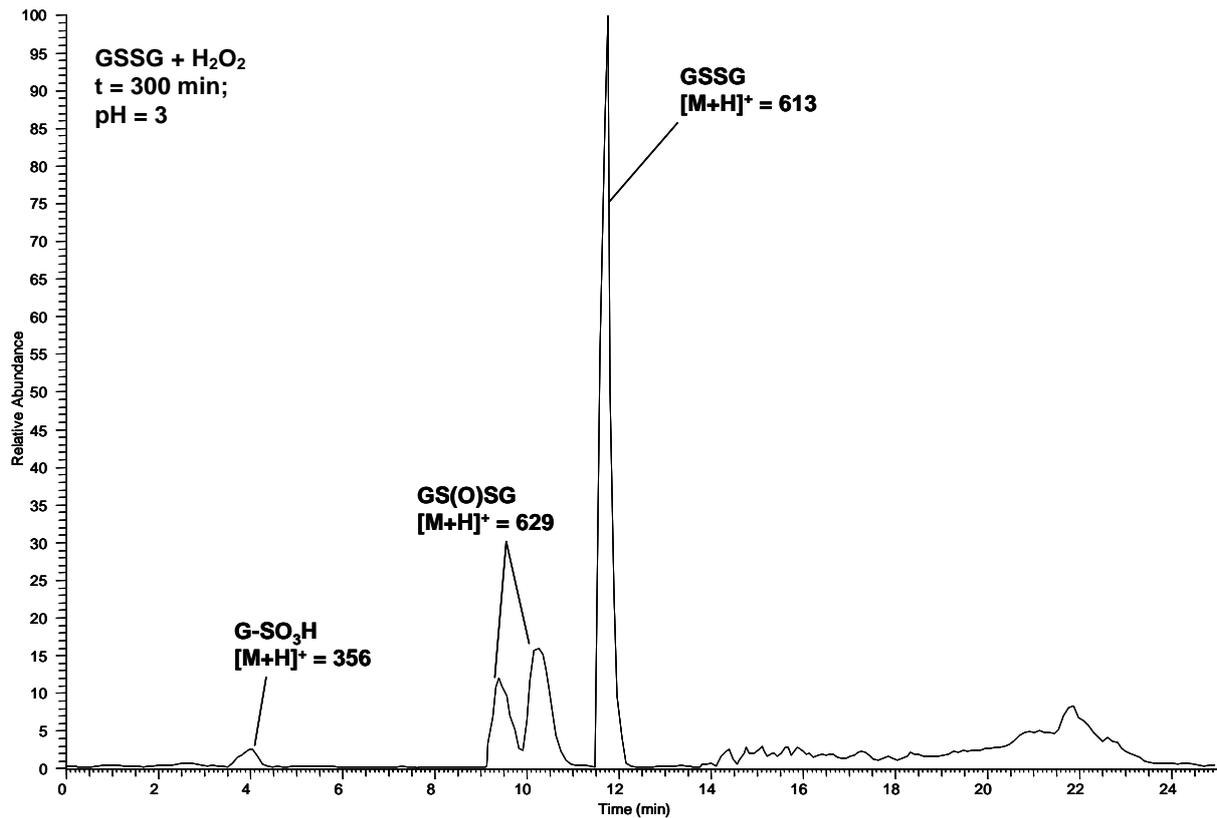


Abb. 32: Basisionenchromatogramm der mit H₂O₂ bei pH 3 oxidierten GSSG-Probe nach t = 300 min.

Unter basischen Bedingungen (pH 11) wurde keine Oxidation der Disulfidbrücke beobachtet. Vielmehr wurde eine Zersetzung des Moleküls erreicht, wobei [M+H]⁺-Ionen mit den m/z-Verhältnissen 597, 583, 567, 550, 466 und 338 detektiert wurden (Abb. 34). Als Oxidationsprodukt entsteht das G-SO₃H ([M+H]⁺ = 356), allerdings nach wesentlich kürzerer Zeit und in größeren Mengen im Vergleich zur Oxidation im sauren Milieu (Abb. 35).

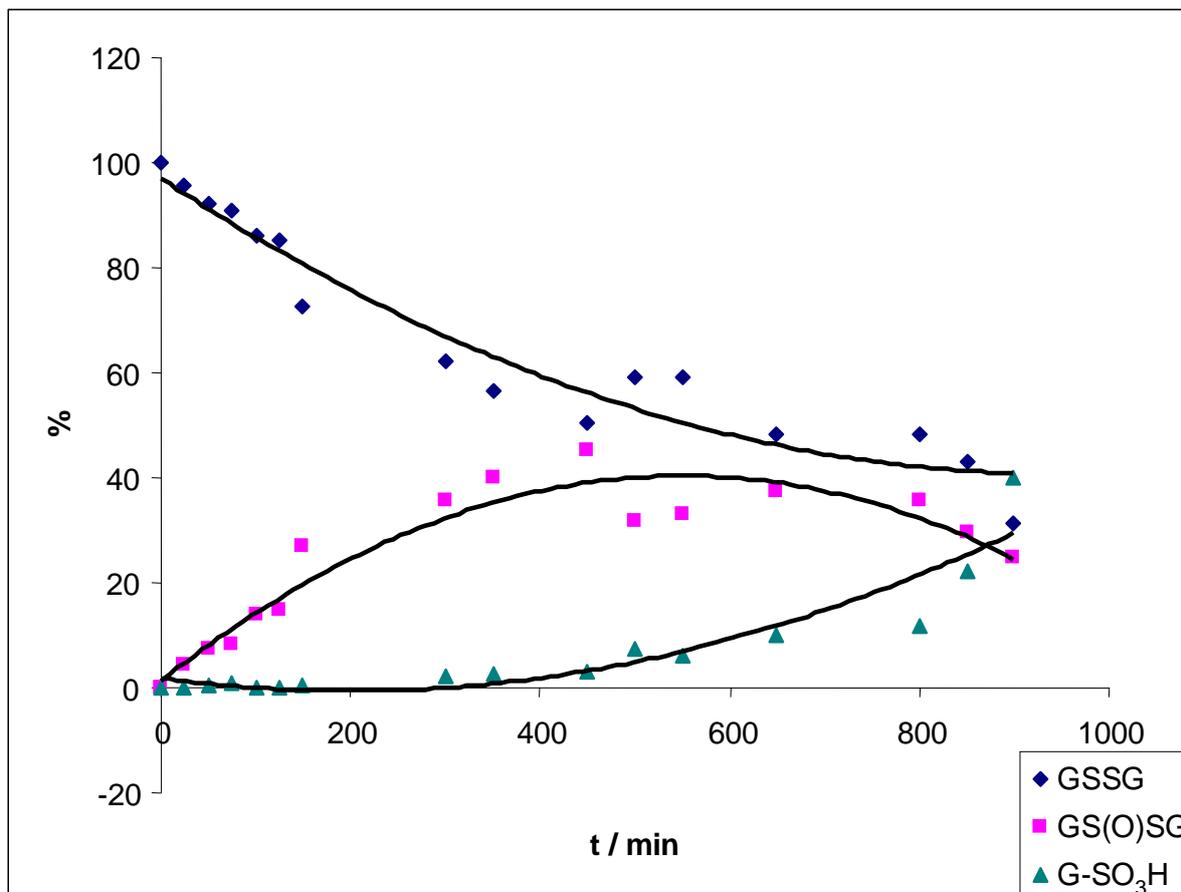


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf der Oxidation von GSSG (◆) zu GS(O)SG (■) und G-SO₃H (▲) bei pH 3; Werte normiert auf 100 %.

Die Massen konnten folgenden Fragmenten zugeordnet werden:

m/z-Verhältnis des [M+H] ⁺ -Ions	Produkt
597	GSSG – 16 Da? (Reduktion zum Aldehyd?)
583	GSSG – CO
567	GSSG – CO ₂
550	GSSG – CO ₂ – NH ₃
466	GSSG – HOOC-CHNH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂
388	G-S-SH

Tab. 15: Detektierte Produkte der Zersetzung von GSSG in basischem Milieu

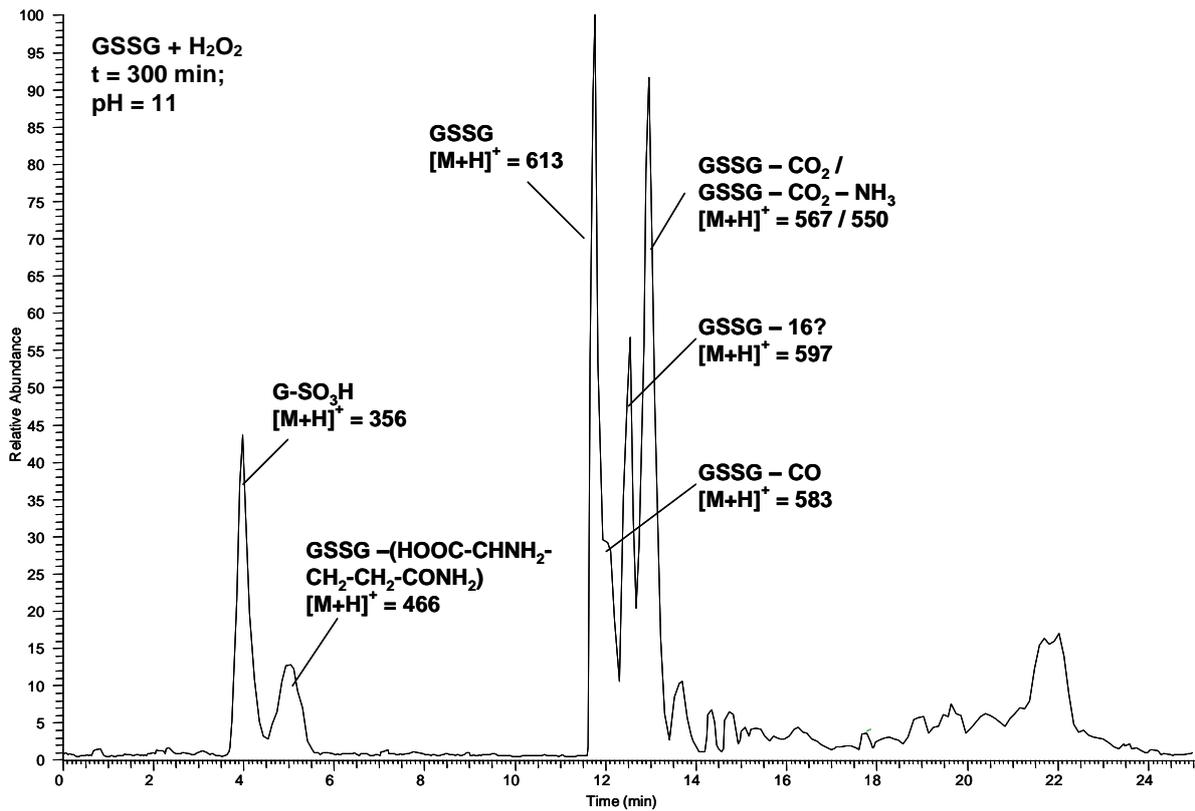


Abb. 34: Basisionenchromatogramm der mit H₂O₂ bei pH 11 oxidierten GSSG-Probe nach t = 300 min.

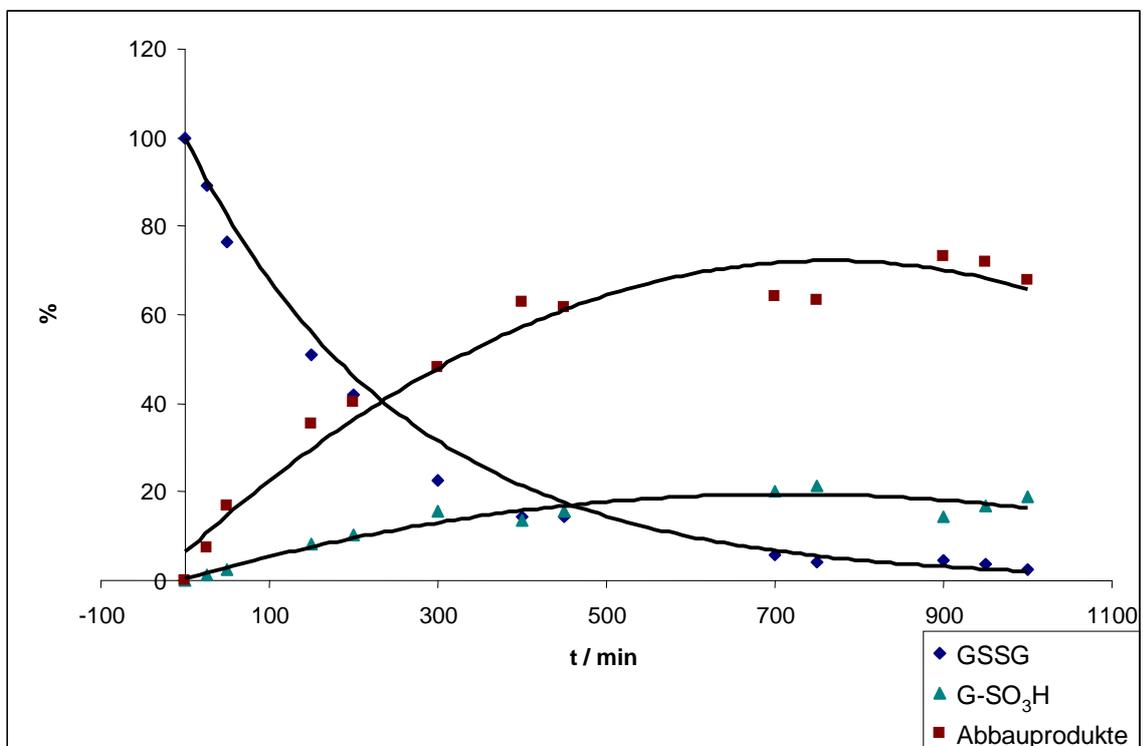


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf der Oxidation von GSSG (◆) zu G-SO₃H (▲) und Abbauprodukten (■) bei pH 11; Werte normiert auf 100 %.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

Das MS²-Spektrum des GSSG zeigt ein für Peptide typisches Fragmentierungsverhalten. Es sind vorwiegend Brüche der Peptidbindungen zu beobachten, die zur Abspaltung von Glutaminsäure (-129 Da), Glycin (-57 Da) und Wasser (-18 Da) führen. Eine Fragmentierung der SS-Brücke konnte nicht festgestellt werden (Abb.36), was aufgrund bisheriger Erkenntnisse und Erfahrungen mit dem ESI-MS Fragmentierungsverhalten von disulfidhaltigen Peptiden auch zu erwarten war.

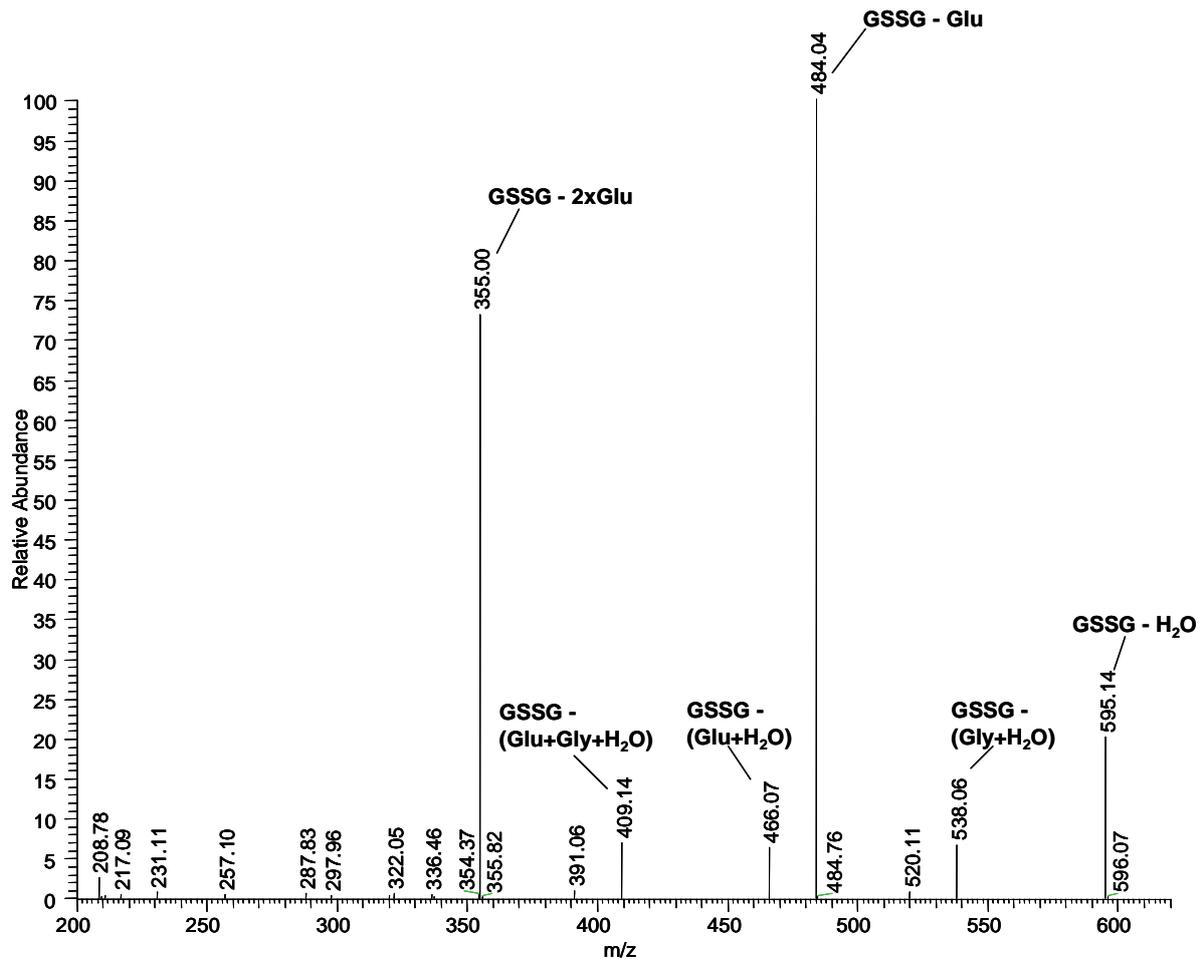


Abb. 36: MS²-Spektrum von GSSG

Im Gegensatz dazu zeigt das MS²-Spektrum des Glutathion-S-Oxids (GS(O)SG) (Abb. 37) ein deutlich unterschiedliches Fragmentierungsverhalten, gekennzeichnet durch die dominante Spaltung der Disulfidbrücke des Moleküls. Die Spektren beider entstandenen Isomere sind dabei identisch. Es wurde festgestellt, dass die Fragmentierung nicht durch homolytische Spaltung der Disulfidbrücke erfolgt und somit zwei Fragmente liefert, die sich nur durch die Masse des Sauerstoffs unterscheiden (16 Da), sondern ein Protonenshift stattfindet, der eine Massendifferenz von insgesamt 18 Da hervorruft. Diese Feststellung lässt vermuten, dass als Resultat der Fragmentierung eine Sulfensäure (G-SOH; [M+H]⁺ = 324)

und das zugehörige Spaltprodukt ($G=S$; $[M+H]^+ = 306$) entstehen. Die Struktur des Spaltproduktes ($G=S$) weist dabei vermutlich eine Doppelbindung am Schwefel auf. Zu etwa 10 % wird eine Spaltung des Moleküls beobachtet, bei der das eine Fragment beide Schwefelatome, den eingeführten Sauerstoff, sowie ein zusätzliches Wasserstoffatom trägt ($G-SSOH$; $[M+H]^+ = 356$). Das andere Fragment hingegen verliert beide Schwefelatome und wird voraussichtlich in ein Dehydroalanin-Derivat überführt ($G=$; $[M+H]^+ = 274$).

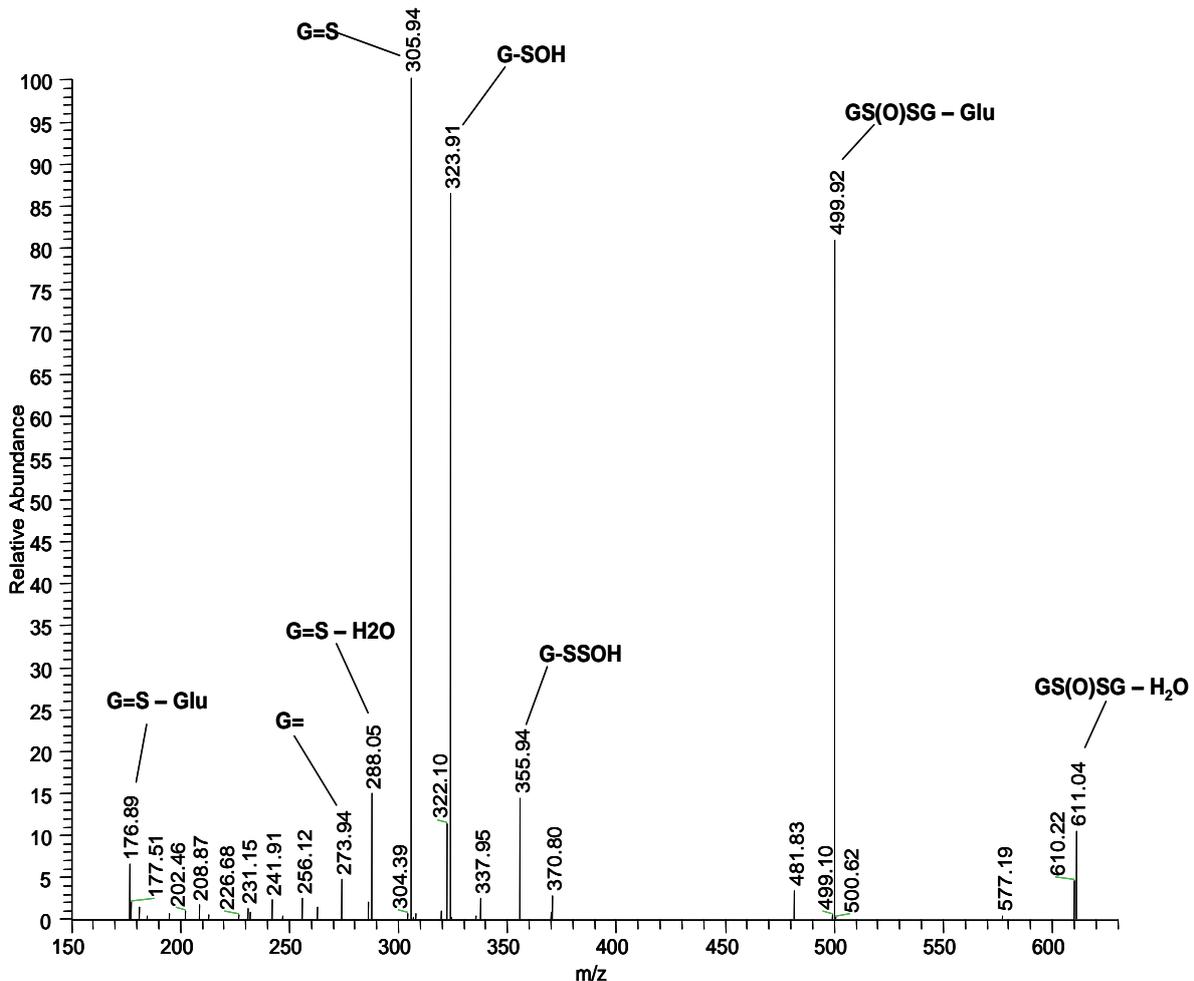
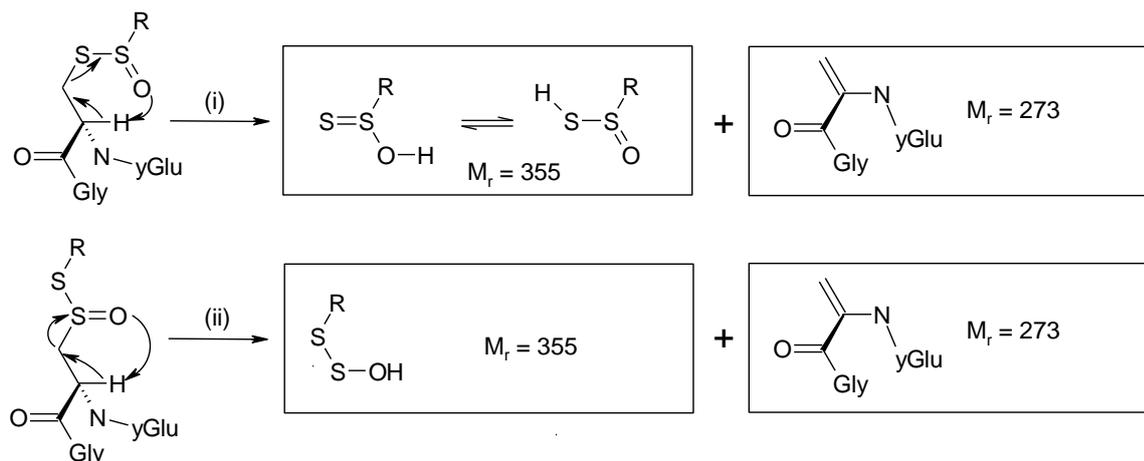


Abb. 37: MS²-Spektrum von GS(O)SG

4.2.2.2 Mechanistische Betrachtung der Fragmentierung oxidierter Disulfidbrücken

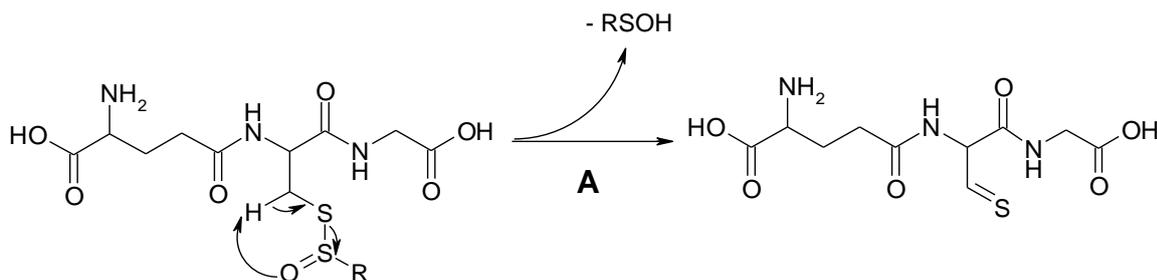
Die asymmetrische Spaltung, die zu den beiden letztgenannten Molekülen führt, kann nur durch folgenden Mechanismus erklärt werden (Schema 9):



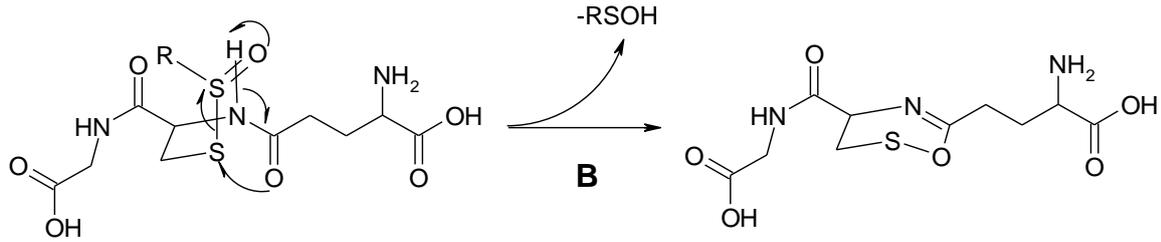
Schema 9: Mechanismus der asymmetrischen Fragmentierung von GS(O)SG

Das vom Schwefelatom aus betrachtete β -Wasserstoffatom wird in einem cyclischen Übergangszustand auf den Sauerstoff des S-Oxids übertragen, wobei je nach Lage des Sauerstoffs 5 oder 6 Atome involviert sind. Durch Spaltung der Schwefel-Kohlenstoff-Bindung wird das Dehydroalanin-Derivat freigesetzt und eine Thiosulfinsäure (i) oder eine Disulfid-Sulfensäure (ii) generiert.

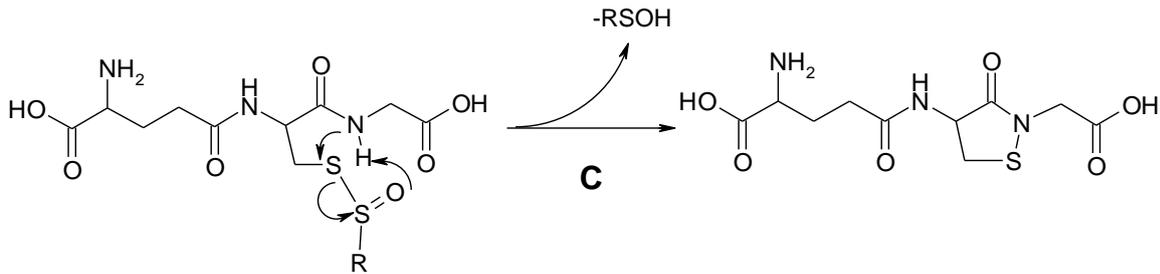
In Analogie dazu wird die Spaltung der Disulfid-Brücke durch die Übertragung des α -Wasserstoffs erreicht (s. Schema 10; Struktur A), wobei theoretisch auch andere Mechanismen denkbar wären. Zum einen könnte der Carbonylsauerstoff der Glutamat-Peptidbindung am nicht-oxidierten Schwefelatom angreifen, wobei das Proton des Amidstickstoffes auf den Sauerstoff der SS-Brücke übertragen wird und nach Bindungsbruch der SS-Brücke sowie Austreten der Sulfensäure ein Sechsring zurück bleibt (s. Schema 11; Struktur B). Zum anderen könnte der Amidstickstoff des Glycins am nicht-oxidierten Schwefel angreifen, dabei sein Proton auf den Sauerstoff der oxidierten SS-Brücke übertragen und nach Abspaltung der Sulfensäure zu einem Fünfring führen (s. Schema 9; Struktur C). Alternativ könnte auch der Carbonylsauerstoff des Cysteins am Schwefel angreifen (Schema 10; Struktur D).



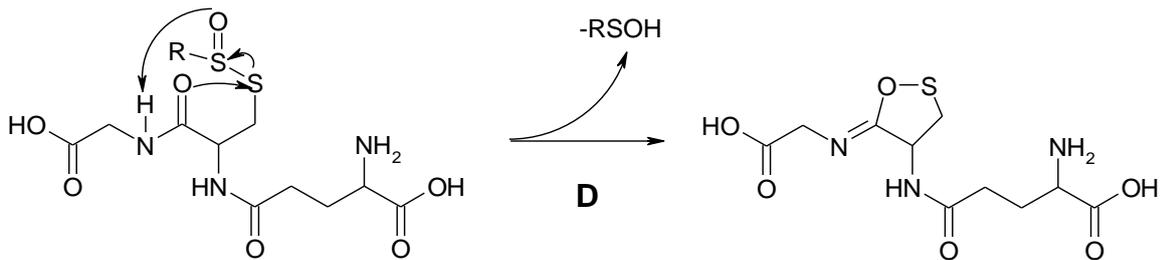
Schema 10: Vermuteter Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke



Schema 11: Alternativer Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke I.



Schema 12: Alternativer Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke II.



Schema 13: Alternativer Mechanismus der Fragmentierung der oxidierten SS-Brücke III.

Um den Mechanismus näher zu untersuchen und weitere Informationen über den tatsächlichen Ablauf zu gewinnen, wurden MSⁿ Versuche mit oxidiertem GSSG durchgeführt. Das oxidierte Produkt wurde dazu per Direktinfusion ins Massenspektrometer eingeführt und anschließend fragmentiert. Die erhaltenen Tochterionen wurden in der Ionenfalle isoliert und weiter fragmentiert.

Das in Abb. 37 dargestellte MS²-Spektrum zeigt die bereits bekannten Fragmente der Disulfidspaltung: die Sulfensäure G-SOH ($[M+H]^+ = 324$) und das um 18 Da leichtere Gegenstück, das mit G=S bezeichnet wurde ($[M+H]^+ = 306$) und dessen Struktur geklärt werden soll. Ferner beobachtet man die Abspaltung von Glutaminsäure ($[M+H]^+ = 500$).

Im ersten Schritt wurde das Tochterion mit dem m/z -Verhältnis 324 in einem MS^3 -Experiment weiter fragmentiert. Das zugehörige Spektrum ist in Abb. 38 dargestellt.

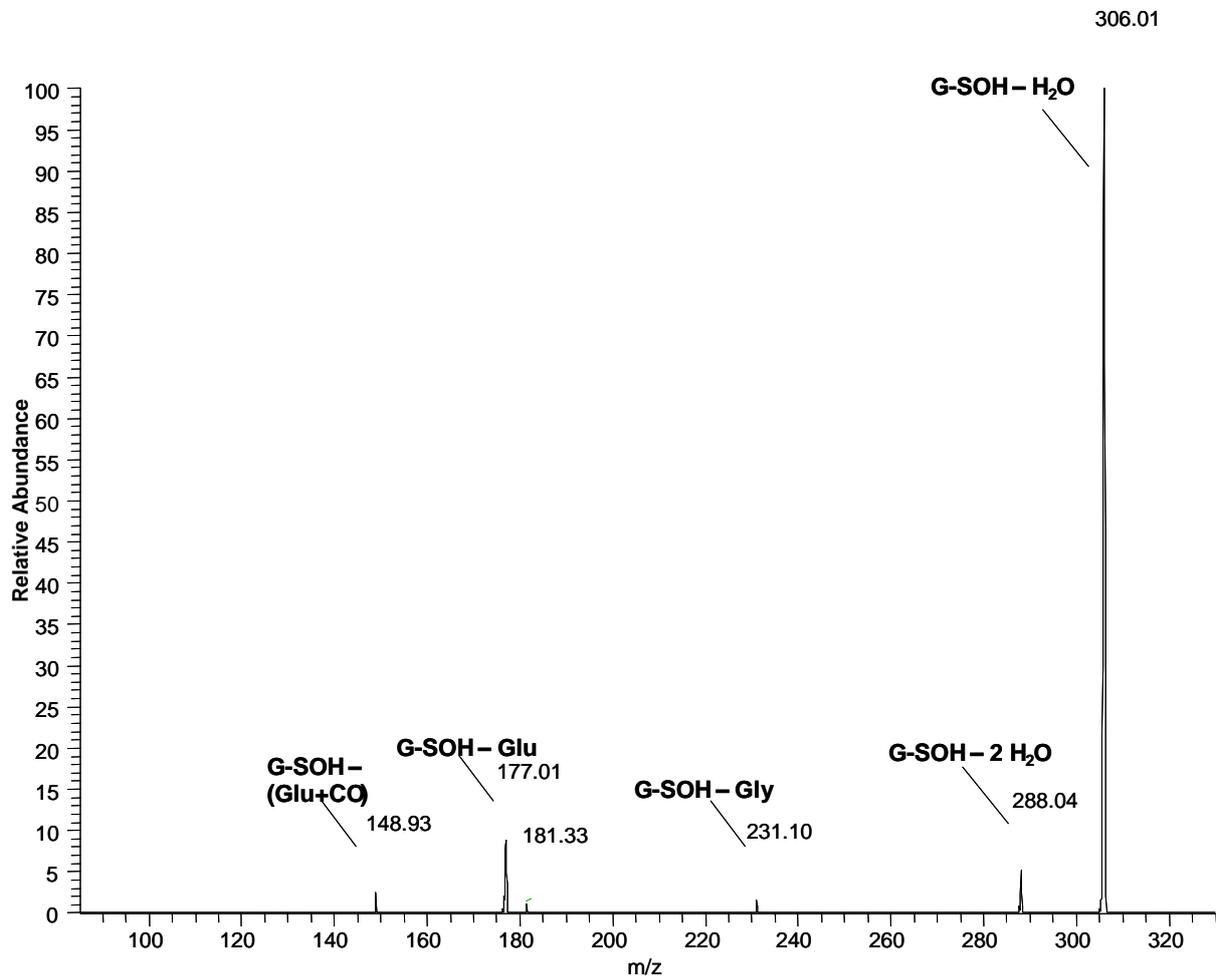


Abb. 38: MS^3 -Spektrum der Glutathionsulfensäure: $629 \rightarrow 324$

Das Spektrum zeigt ein dominantes Signal bei einem m/z -Wert von 306. Dies könnte bedeuten, dass die Sulfensäure durch Wasserabspaltung in die Struktur A überführt wird. Die Wasserabspaltung muss nicht zwangsläufig über die Sulfengruppe laufen, sondern kann auch auf die Carboxylgruppe zurück zu führen sein. Ein weiteres Signal bei einem m/z -Wert von 288 deutet auf eine zweite Wasserabspaltung hin. Zur Überprüfung wurde das Tochterion mit dem m/z -Wert 306 aus dem beschriebenen MS^3 -Experiment in einem weiteren Schritt erneut fragmentiert. Das erhaltene MS^4 -Spektrum ($629 \rightarrow 324 \rightarrow 306$) wurde anschließend mit dem MS^3 -Spektrum der Struktur A ($629 \rightarrow 306$) verglichen (Abb. 39).

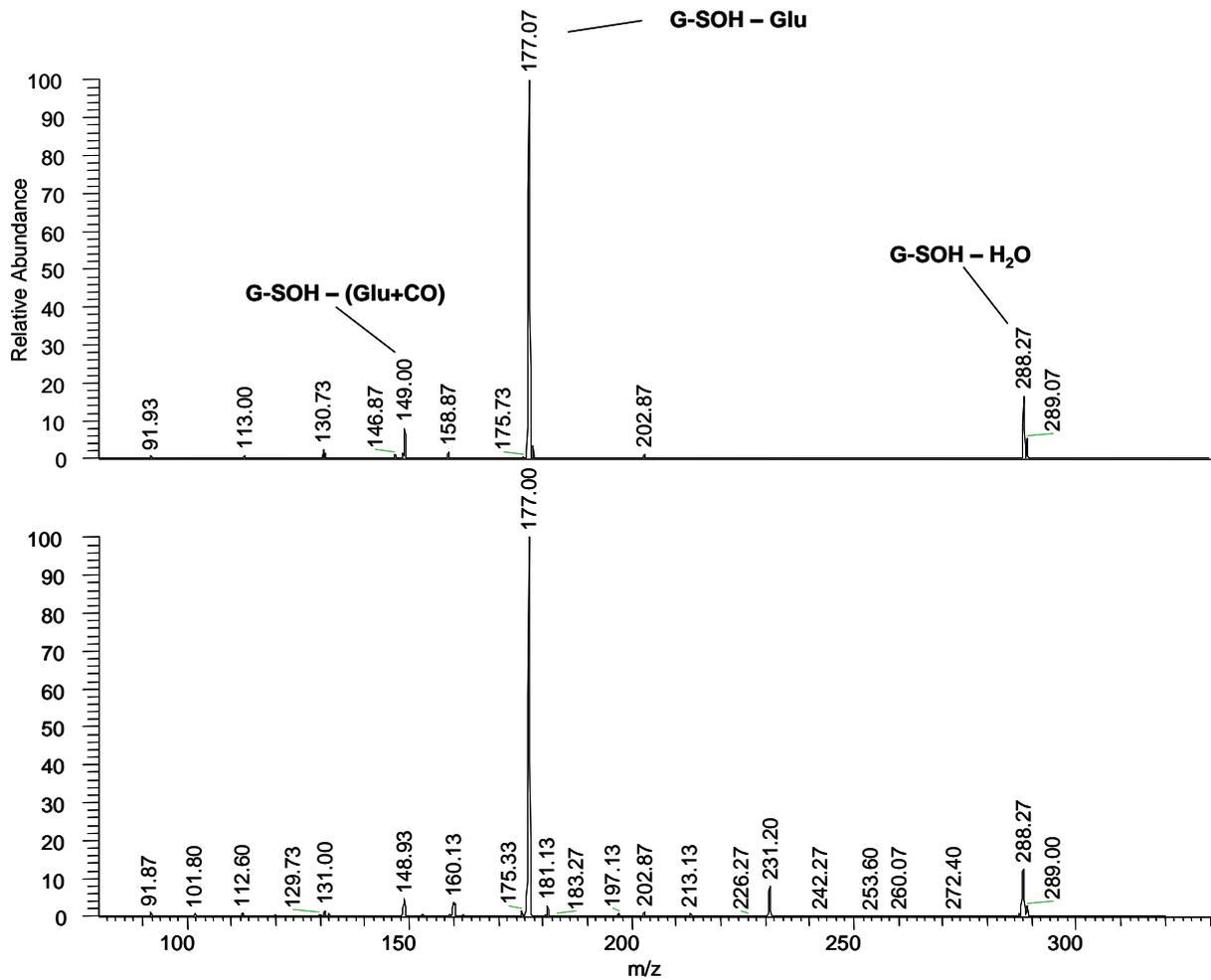


Abb. 39: Vergleich des MS⁴-Spektrums (629 → 324 → 306) mit dem MS³-Spektrum (629 → 306)

Bei diesem Vergleich zeigt sich, dass die Spektren beider Ionen das gleiche Fragmentierungsmuster aufweisen und berechtigt zu der Annahme, dass beide Verbindungen identisch sind. Das beobachtete Ion der Masse 306 scheint somit durch Wasserabspaltung aus der Sulfensäure ($m/z = 324$) hervorzugehen, was ein Indiz für die vorgeschlagene Struktur A darstellt.

Die Abspaltung eines Fragmentes der Masse 129 entspricht aller Voraussicht nach der Abspaltung von Glutamat und führt zu einem Peak mit dem m/z -Wert 177. Dies ist bei der Struktur B nicht möglich, so dass diese bereits zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden kann.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

Um weitere Strukturaussagen treffen zu können, wurde in einem MS⁴-Experiment das Ion mit dem m/z-Verhältnis 177 fragmentiert (629→306→177). Das erhaltene Spektrum ist in Abb. 40 dargestellt und ist ein weiterer Beleg für Struktur A.

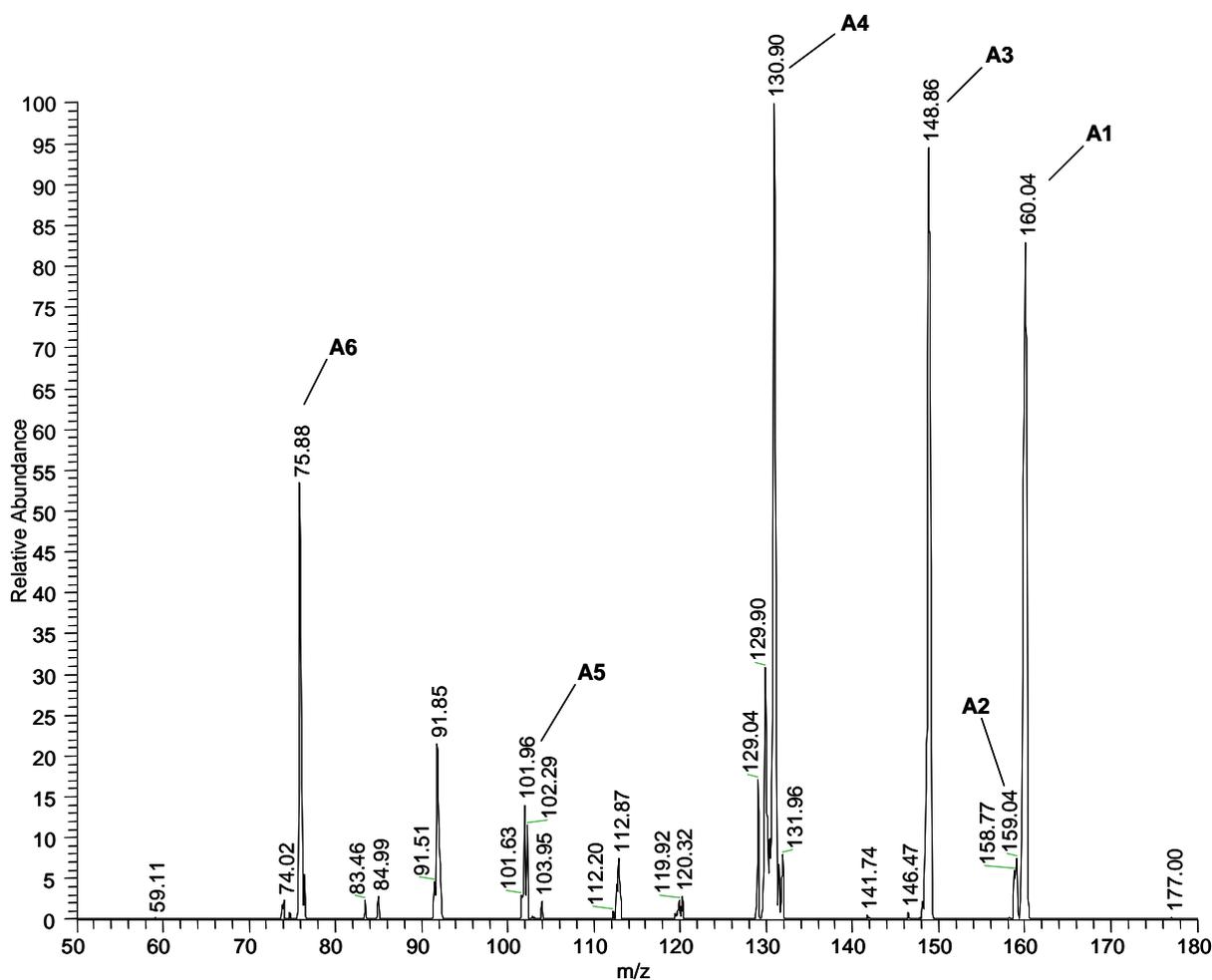


Abb. 40: MS⁴-Spektrum des Ions mit dem m/z-Wert 177 (629→306→177)

Nach Abspaltung des Glutamatrestes, was wie bereits erwähnt nur bei den Strukturen A, C und D möglich ist, verblieben als mögliche Vorläuferionen mit einem m/z-Verhältnis von 177 die Strukturen A', C' und D', die in Abb. 41 dargestellt sind.

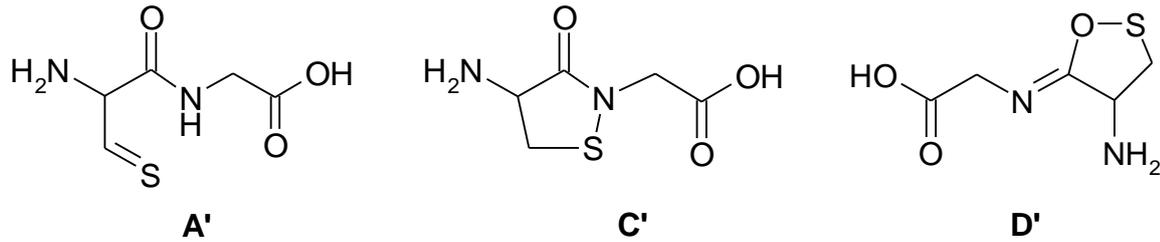
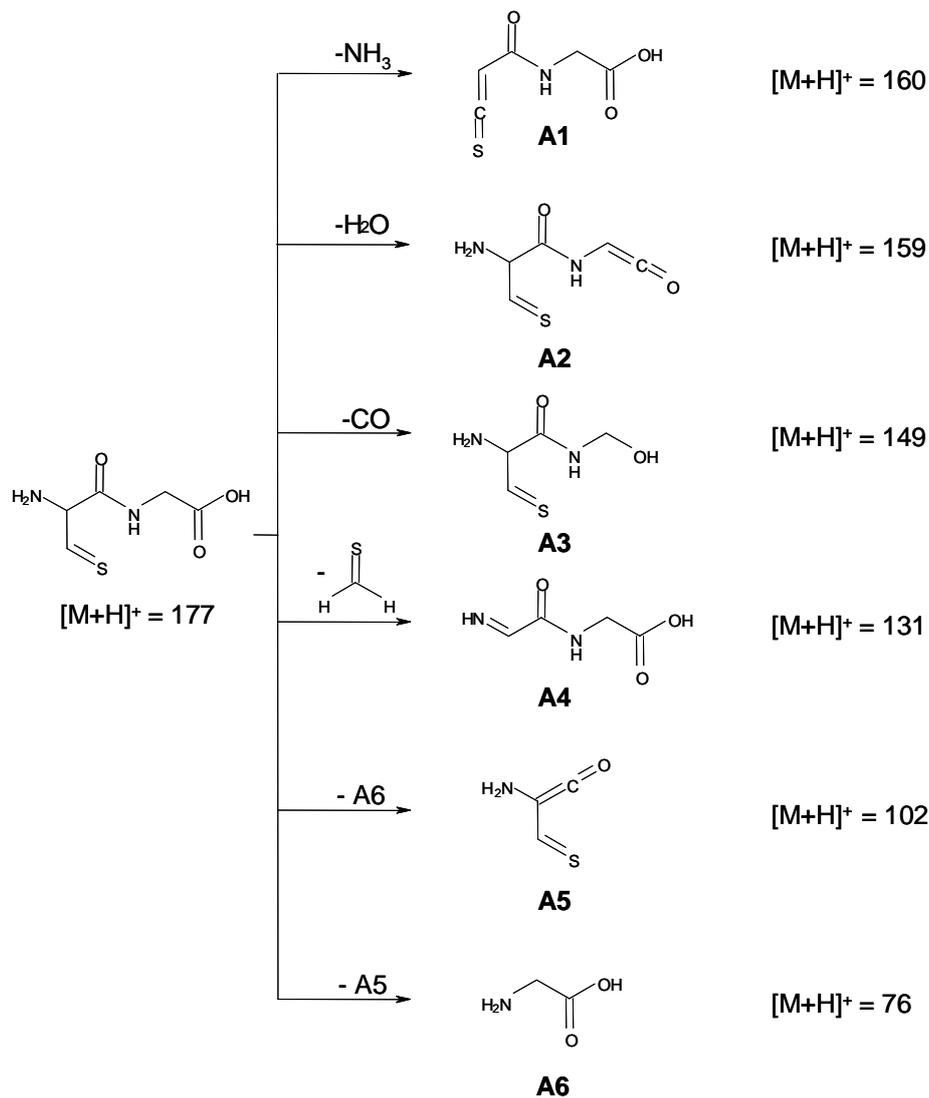


Abb. 41: Mögliche Vorläuferionen mit dem m/z -Verhältnis 177

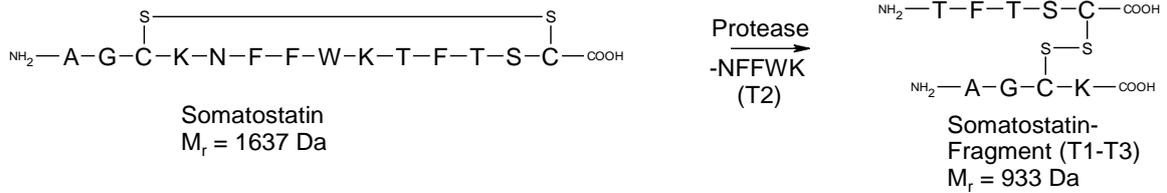
Die Fragmentionen A1, A2 und A3, die aus dem Verlust von NH_3 , H_2O und CO respektive resultieren, können von allen drei Strukturen stammen. Der Verlust dieser Neutralteilchen aus Peptidstrukturen entspricht den Erwartungen. Das Fragmention A4 hingegen, das durch die Abspaltung von Thioformaldehyd entsteht, kann nur aus Struktur A' hervorgehen. Durch Bruch der Amidbindung entstehen weiterhin die beiden Fragmente A5 ($m/z = 102$) und A6 ($m/z = 76$). Auch diese Ionen können nicht aus den Strukturen C' und D' hervorgehen, womit belegt werden konnte, dass die Fragmentierung der oxidierten Disulfidbrücke als Produkte eine Sulfensäure und einen Thioaldehyd liefert. Das Thioaldehyd geht ebenfalls durch Wasserabspaltung aus der Sulfensäure hervor. Eine Übersicht über die entstehenden Fragmentionen der Fragmentierung von A' bietet Schema 14.



Schema 14: Übersicht über die entstehenden Fragmentionen aus der Fragmentierung von A'

4.2.2.3 Oxidation von Somatostatin

Um die Ergebnisse des Testpeptids GSSG auf eine Realprobe zu übertragen, wurde zunächst ein Modellpeptid mittlerer Größe, das Somatostatin, auf seine Oxidierbarkeit und die Fragmentierung der oxidierten Spezies hin untersucht. Somatostatin ist ein humanes Neuropeptid, welches das Endokrinsystem reguliert und die Neurotransmission sowie die Zellproliferation beeinflusst^[129]. Es enthält eine intramolekulare Disulfidbrücke und zwischen den beiden Cysteinen zwei Lysine (Lys). Durch die Endopeptidasen Trypsin und LysC kann ein Pentapeptid herausgeschnitten werden und man erhält als Produkt zwei über eine SS-Brücke verknüpfte Peptide (Schema 15). Mit einem Molekulargewicht von 933 g/mol liegt das erhaltene Peptid in einem gut chromatographier- und messbaren Massenbereich.



Schema 15: Verdau von Somatostatin mit LysC

Die Oxidation des Somatostatin-Verdaus mit 2000 äq. H₂O₂ liefert bei pH 3 nach 100 min ca. 15 % des Peptids T1-T3 mit oxidierter Disulfidbrücke (Abb. 42). Ferner kann eine Oxidation des Tryptophans des Peptids T2 beobachtet werden, wobei zwei verschiedene Hydroxytryptophane entstehen, die insgesamt nach 100 min etwa 10 % ausmachen (Abb. 43).

Die beiden Verdauprodukte T2 und T1-T3, sowie das T1-T3-S-Oxid und das oxidierte T2 sind chromatographisch trennbar (Abb. 44) und wurden massenspektrometrisch untersucht. Das T1-T3-S-Oxid gibt dabei nur einen chromatographischen Peak, obwohl in Abhängigkeit davon welches der beiden Schwefelatome oxidiert wurde, zwei Isomere entstehen. Diese Isomere scheinen sich bezüglich ihrer chromatographischen Eigenschaften aber nicht hinreichend genug zu unterscheiden, so dass sie koeluiieren.

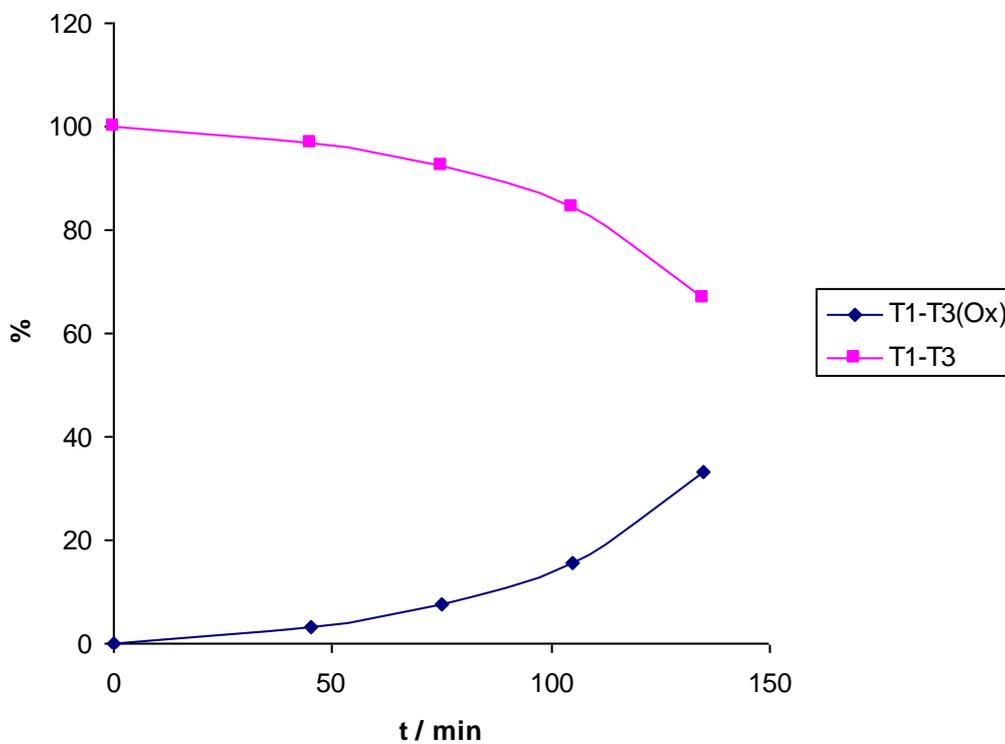


Abb. 42: Oxidation von Somatostatin-Peptid T1-T3 zum korrespondierenden S-Oxid.

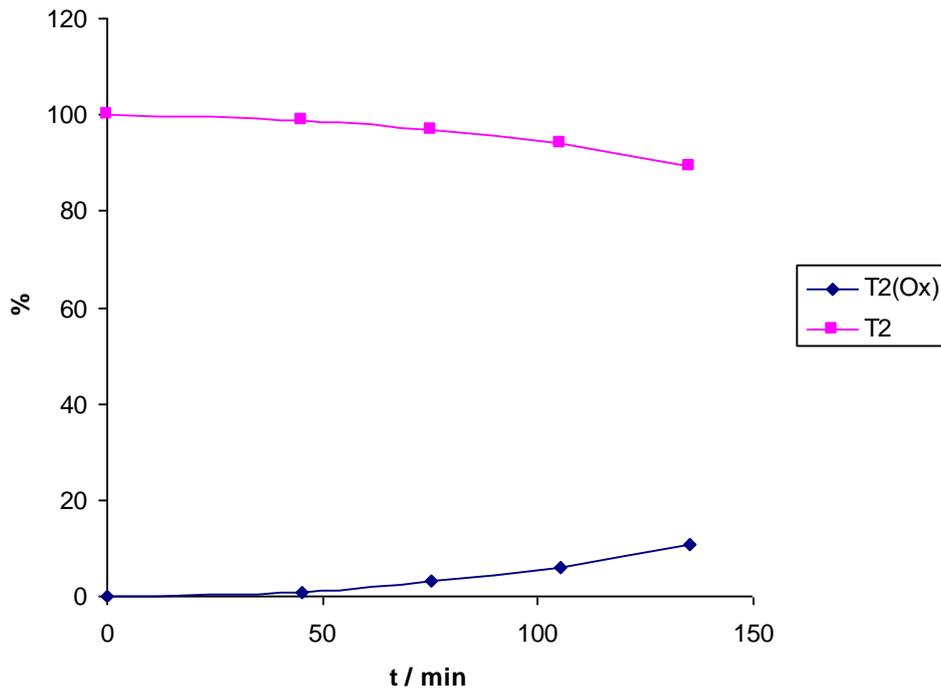


Abb. 43: Oxidation von Somatostatin-Peptid T2 zu den Hydroxytryptophan-Derivaten

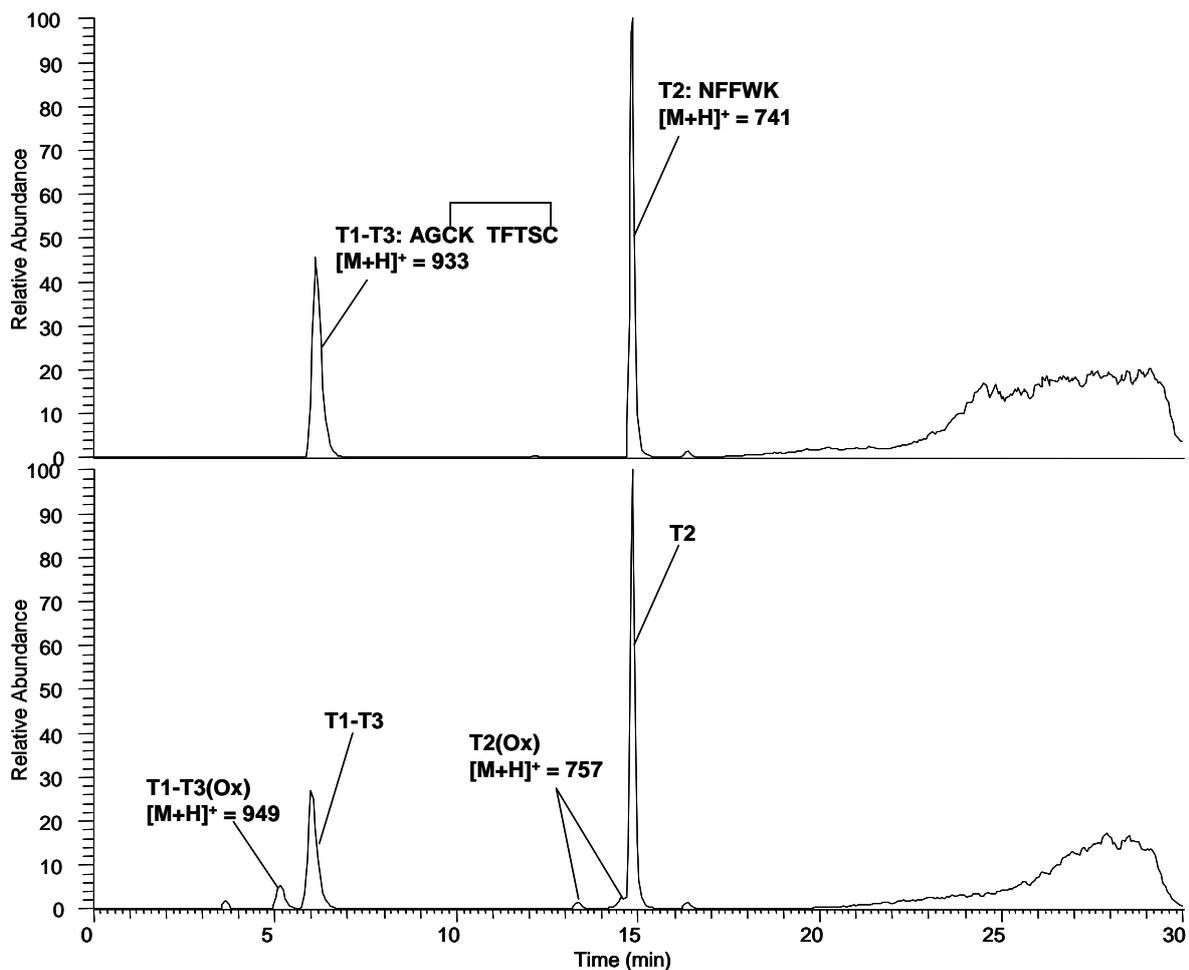


Abb. 44: Basisionenchromatogramm des Somatostatinverdaus (oben) und der 105 min mit H₂O₂ oxidierten Probe (unten)

Auch die Fragmentierung des Somatostatin-Peptids T1-T3 bildet ein für Peptide typisches Muster aus (Abb. 45), wobei als Signale b- und y-Ionen der Peptidbindungsbrüche erhalten werden. Die Disulfidbrücke bleibt dabei stets intakt.

Das MS²-Spektrum des T1-T3-S-Oxids (Abb. 46) zeigt vier nennenswerte Signale, die allesamt vom Peptid AGCK stammen: die Thiosulfinsäure ($[M+H]^+ = 426$), die Sulfensäure ($[M+H]^+ = 394$), das Thioaldehyd ($[M+H]^+ = 376$) und das Dehydroalanin-Derivat ($[M+H]^+ = 344$). Das abgespaltene Peptid TFTSC gibt im Gegensatz dazu keinerlei Signal. Eine mögliche Erklärung liefert die Tatsache, dass das Peptid AGCK mit dem C-terminalen Lysin eine basische Aminosäure trägt, die bevorzugt protoniert wird. Das einfach geladene Vorläuferion wird daher, statistisch betrachtet, wesentlich häufiger Fragmente hervorbringen, bei denen das Lysin protoniert und somit Ladungsträger ist. In diesem Fall wird das Peptid TFTSC als Neutralteilchen abgespalten und kann nicht detektiert werden.

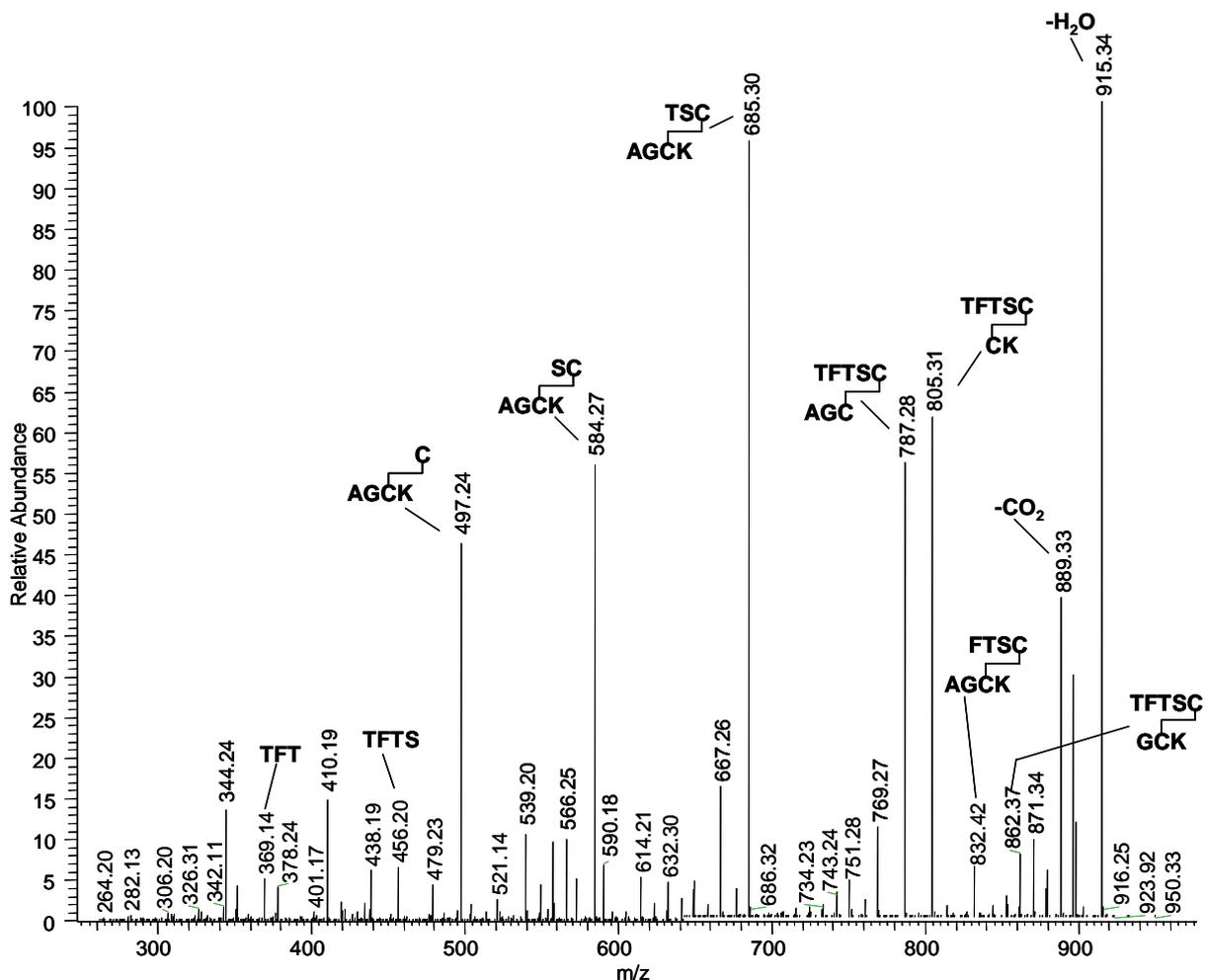


Abb. 45: MS²-Spektrum des Somatostatin-Peptids T1-T3.

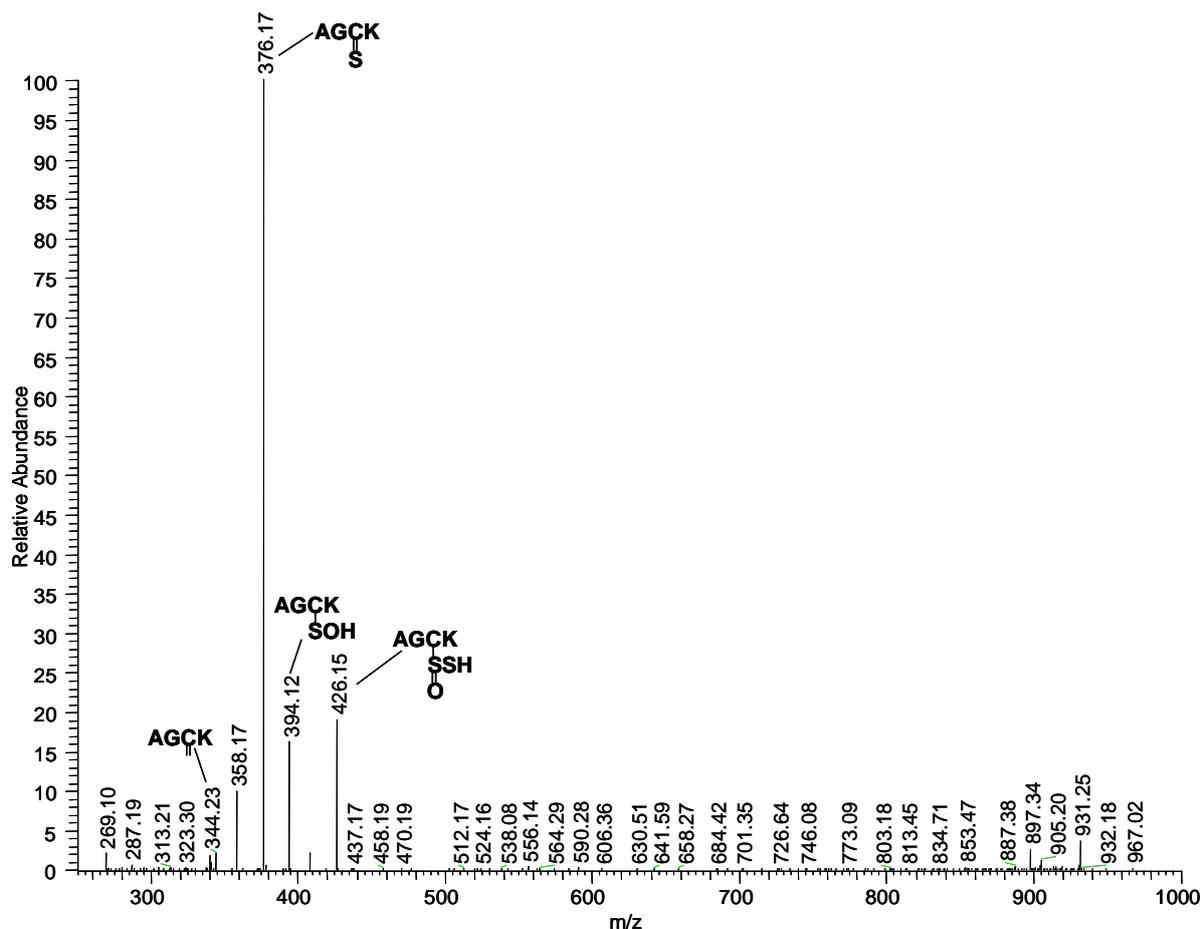


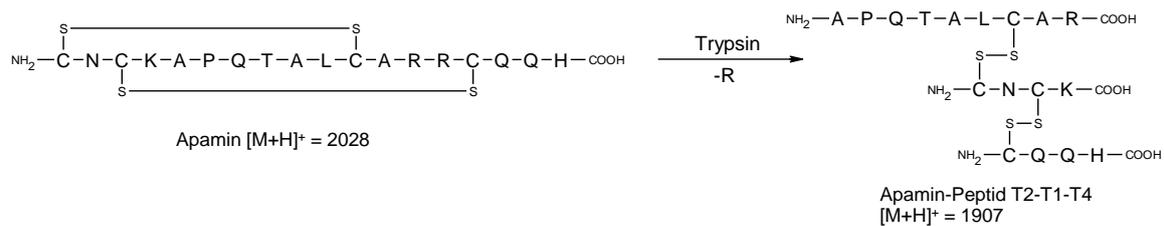
Abb. 46: MS²-Spektrum des oxidierten Somatostatin-Peptids T1-T3-S-Oxid

4.2.2.4 Oxidation von Apamin

Die entdeckte Spaltbarkeit oxidierter Disulfidbrücken eröffnet neue Wege in der Aufklärung von Disulfidbrücken mit Hilfe der Massenspektrometrie. Die größte Schwierigkeit liegt darin, disulfidbrückenhaltige Peptide im Chromatogramm auszumachen. Die Veränderung des Fragmentierungsverhaltens führt zu auffälligen Spektren, aus denen auf die Inkorporation einer SS-Brücke geschlossen werden kann. Somit eignet sich die Methode hervorragend zur Identifizierung disulfidverbrückter Peptide. Für die Aufklärung der Position der Disulfidbrücke beschränken sich bisherige Methoden auf den Verdau des intakten Proteins, gefolgt von der chromatographischen Trennung und Analyse der MS²-Spektren. Da die Disulfidbrücke dabei nicht gespalten wird, kann jedes der drei verbrückten Peptide für sich Aminosäuren abspalten. Das Ergebnis sind sehr komplexe, unübersichtliche Spektren, die schwierig und oft nur mehrdeutig zu interpretieren sind. Die chromatographisch getrennten Peptide werden in der Regel fraktioniert, erneut mit weiteren Proteasen verdaut und wieder analysiert. Diese Arbeitsschritte sind zeitaufwendig und z.T. ineffektiv. Die genaue

Bestimmung der Lage der Disulfidbrücke muss anhand von Spektren erfolgen, deren Komplexität wiederum Interpretationsunsicherheiten hervorrufen können.

Um diese Vorgehensweise zu vereinfachen soll in einem nächsten Schritt erprobt werden, ob Oxidation und Fragmentierung als Werkzeug zur genauen Detektion von Disulfidbrücken-Positionen eingesetzt werden kann. Für diesen Zweck wird ein Peptid benötigt, welches drei Peptide enthält, die über zwei SS-Brücken miteinander verknüpft sind. Um die Methode zu verifizieren wurde ein Peptid gewählt, dessen Disulfidbrücken bereits aufgeklärt sind: Das Apamin. Apamin ist ein Polypeptid aus dem Gift der Honigbiene, welches selektiv Kaliumkanäle des Zentralnervensystems blockiert^[130]. Seine Sequenz besteht aus 18 Aminosäuren. Es enthält vier Cysteine mit Disulfidbrücken zwischen Cys-1 und Cys-11, sowie Cys-3 und Cys-15. Der Verdau mit Trypsin liefert ein zweifach SS-verbrücktes Peptid, wobei sowohl Peptid 2 als auch Peptid 4 über Disulfidbrücken mit Peptid 1 verknüpft sind (Schema 16).



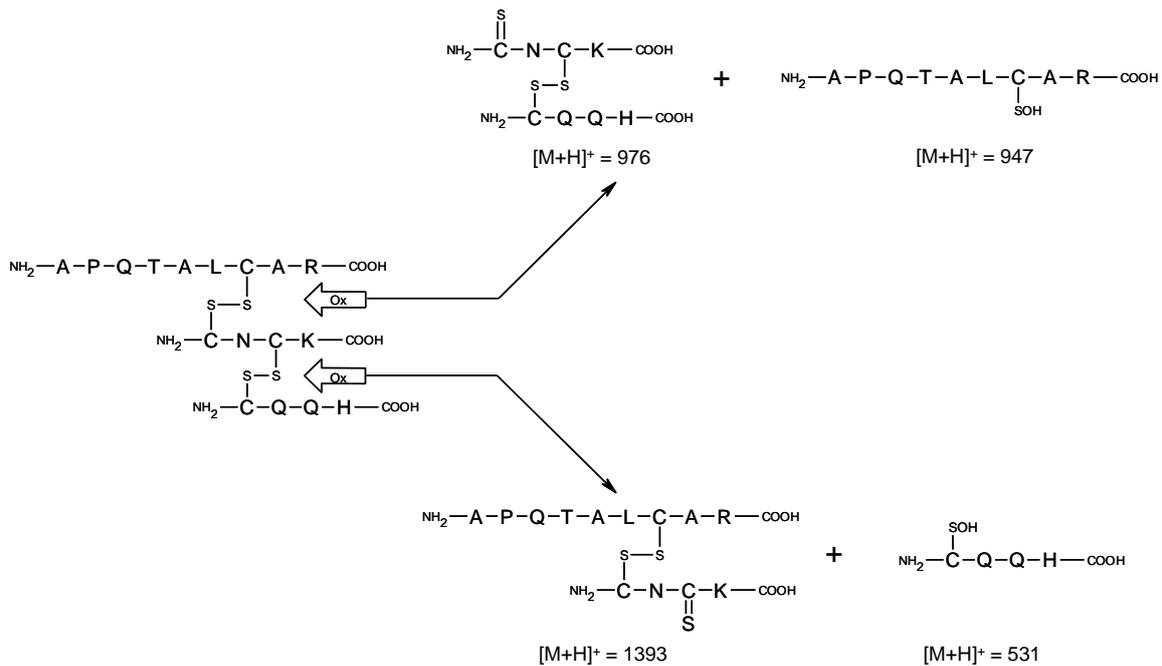
Schema 16: Verdau von Apamin mit Trypsin

Da jedes der drei verbrückten Peptide eine basische Aminosäure enthält (R, K und H), ist zu erwarten, dass alle potentiell möglichen Fragmente detektierbare Signale geben.

Die Aufklärung der Disulfidbrücken kann am besten dadurch erfolgen, dass man die beiden Disulfid-Monooxide fragmentiert und vom jeweils entstehenden einfach verknüpften Peptid ein MS³-Spektrum aufnimmt. Das Thioaldehyd-Derivat wird für die Fragmentierung im MS³ gewählt, da die Fragmentierung der Sulfensäure nur zu einer Wasserabspaltung führt. Im besten Falle erhält man ein Spektrum indem ersichtlich wird, welches der Cysteine in das Thioaldehyd umgewandelt wurde und somit an das abgespaltene Peptid gebunden war.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

Die Fragmentierung sollte folglich zwei weiter zu untersuchende Strukturen liefern: Das Peptid T2-T1 und das Peptid T1-T4, welche beide an der Bruchstelle das Thioaldehyd enthalten müssten (Schema 17). Die Fragmentierung dieser Peptide kann Aufschluss über die Sequenz geben und eine Zuordnung der SS-Brücke erlauben. Im vorliegenden Fall des Apamins werden die Fragmente mit den m/z-Verhältnissen 1393 (T2-T1) und 976 (T1-T4) weiter fragmentiert.



Schema 17: Übersicht über die Fragmentierungsprodukte des Apamin-Peptids T2-T1-T4, je nach Oxidationsstelle.

Ein Blick auf das Chromatogramm (Abb. 47) und das MS¹-Spektrum (Abb. 48) zeigt, dass die Oxidationsprodukte, trotz eines sehr flachen Gradienten im Bereich der eluierenden Peaks, nicht vom nativen Peptid T2-T1-T4 zu trennen sind.

Abb. 49 zeigt das MS²-Spektrum des nativen Peptids T2-T1-T4. Fragmentiert wurde das [M+2H]²⁺-Ion mit dem m/z-Verhältnis 954. Die Zuordnung einzelner Signale gelingt nur, da man die Sequenz des fragmentierten Peptids kennt. Für den Fall eines völlig unbekanntes Peptids ohne Information über Anzahl und Lage der Disulfidbrücken, wäre eine eindeutige Zuordnung der Signale des Spektrums sehr schwierig. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum des oxidierten Pendants deutlich weniger Signale, deren Interpretation dadurch wesentlich vereinfacht wird (Abb. 50).

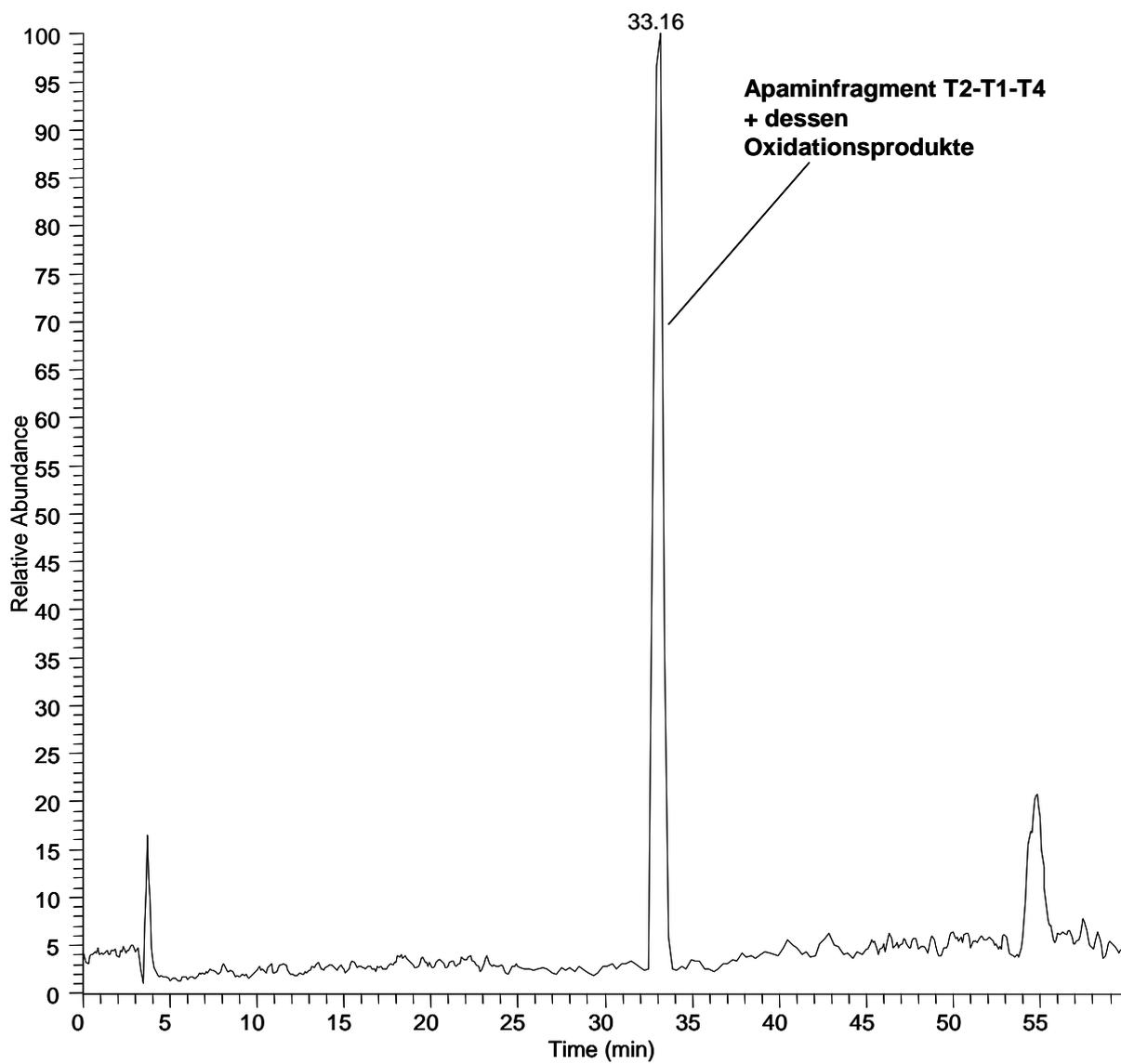


Abb. 47: Chromatogramm von Apamin-Peptid T2-T1-T4 nach 180 min Oxidation mit 8000 äq. H₂O₂ bei pH 3.

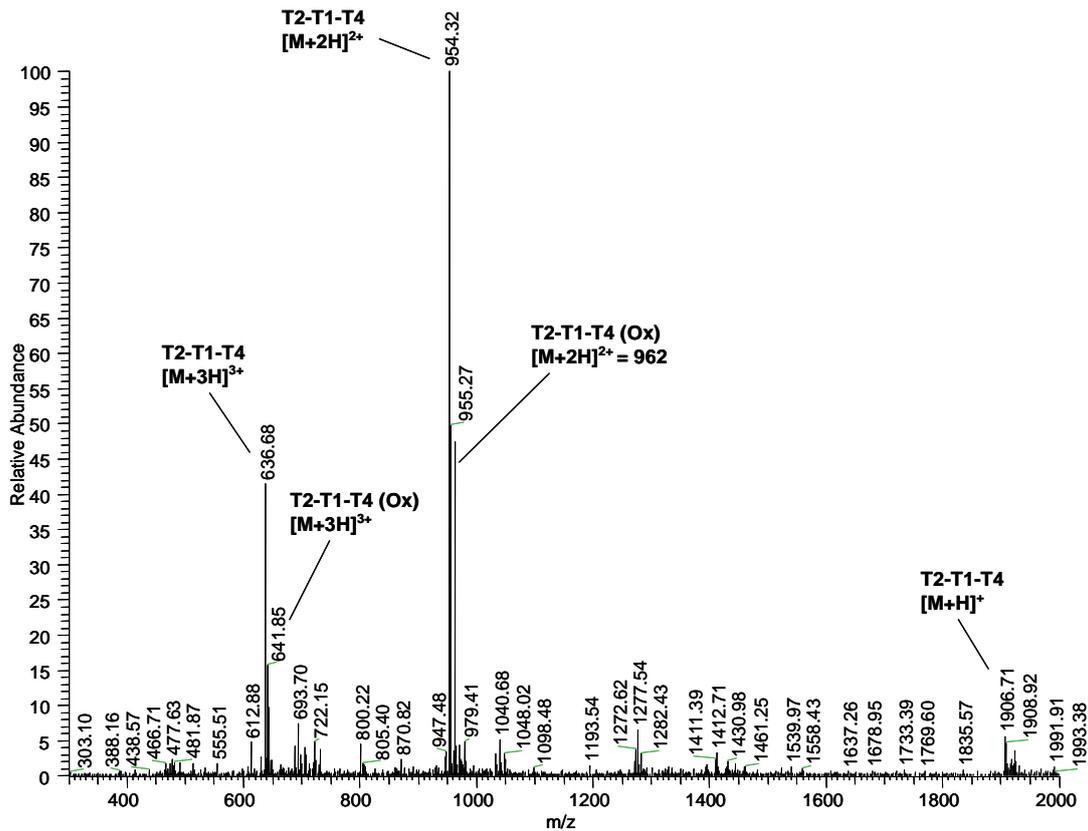


Abb. 48: MS¹-Spektrum von Apamin-Peptid T2-T1-T4 nach 180 min Oxidation mit 8000 äq. H₂O₂ bei pH 3.

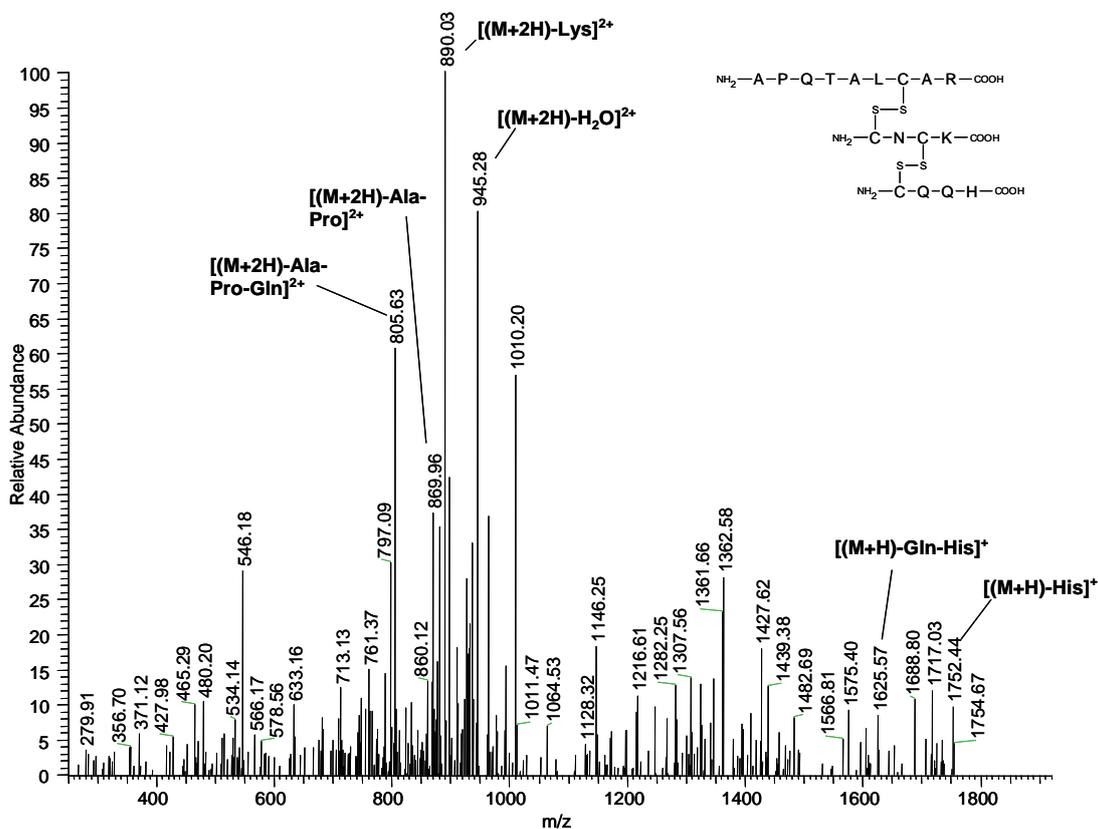


Abb. 49: MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Apamin-Peptids T2-T1-T4

Im MS²-Spektrum des oxidierten Peptids T2-T1-T4 (Abb. 50) ist zu erkennen, dass beide Isomere zeitgleich fragmentiert werden. Da sie koeluierten und das gleiche m/z-Verhältnis besitzen, werden beide in der Ionenfalle festgehalten und stoßaktiviert. Dies wird deutlich, da beide Disulfidbrücken Fragmentierung zeigen und die jeweiligen Fragmentionen bilden, obwohl nur ein Sauerstoffatom eingeführt wurde und somit nur eine der beiden SS-Brücken oxidiert und fragmentierbar sein dürfte.

Besonders anschaulich wird dies an dem Peak mit dem m/z-Verhältnis 976, der dem Thioaldehyd des Fragments T1-T4 zuzuordnen ist und dem Peak mit dem m/z-Verhältnis 1411, der der Sulfensäure des Fragments T2-T1 zugeordnet werden kann. Trotz der Fragmentierung beider Isomere liefert das Spektrum ein übersichtliches Bild. Das typische Fragmentierungsmuster lässt sofort auf das Vorhandensein von Disulfidbrücken schließen. Der Abstand von 18 Da gibt Hinweise darauf welches der Fragmente die Sulfensäure und welches das Thioaldehyd ist. Damit steht der Wahl geeigneter Fragmente für die Identifizierung der Sequenz mit Hilfe von MS³-Spektren nichts mehr im Wege.

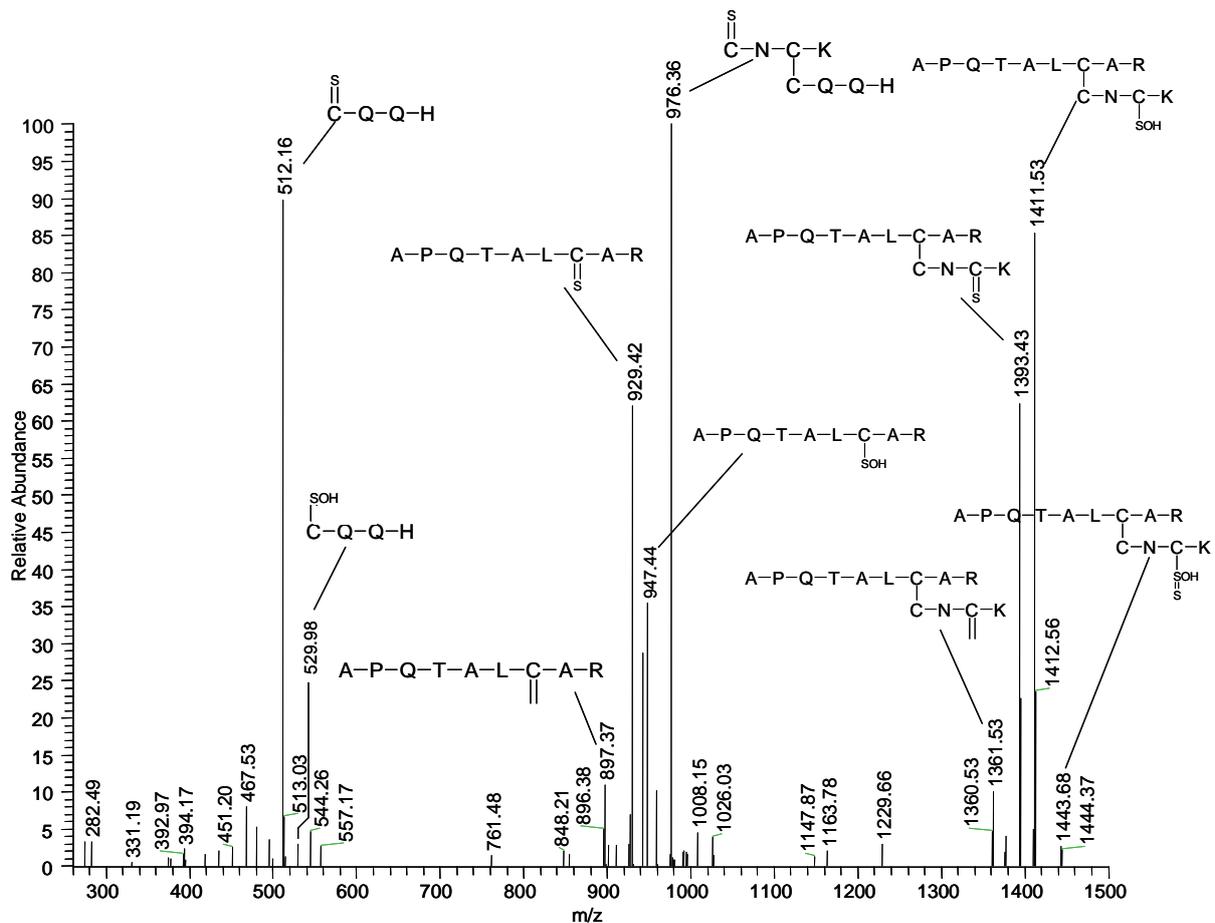


Abb. 50: MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des einfach oxidierten Apamin Peptids T2-T1-T4

Die Koelution und gleichzeitige Fragmentierung der beiden Isomere ist hinsichtlich der MS³-Experimente nicht hinderlich. Es ist gelungen Spektren der Fragmente mit den m/z-Verhältnissen 976 (Abb. 51) und 1393 (Abb. 52) aufzunehmen.

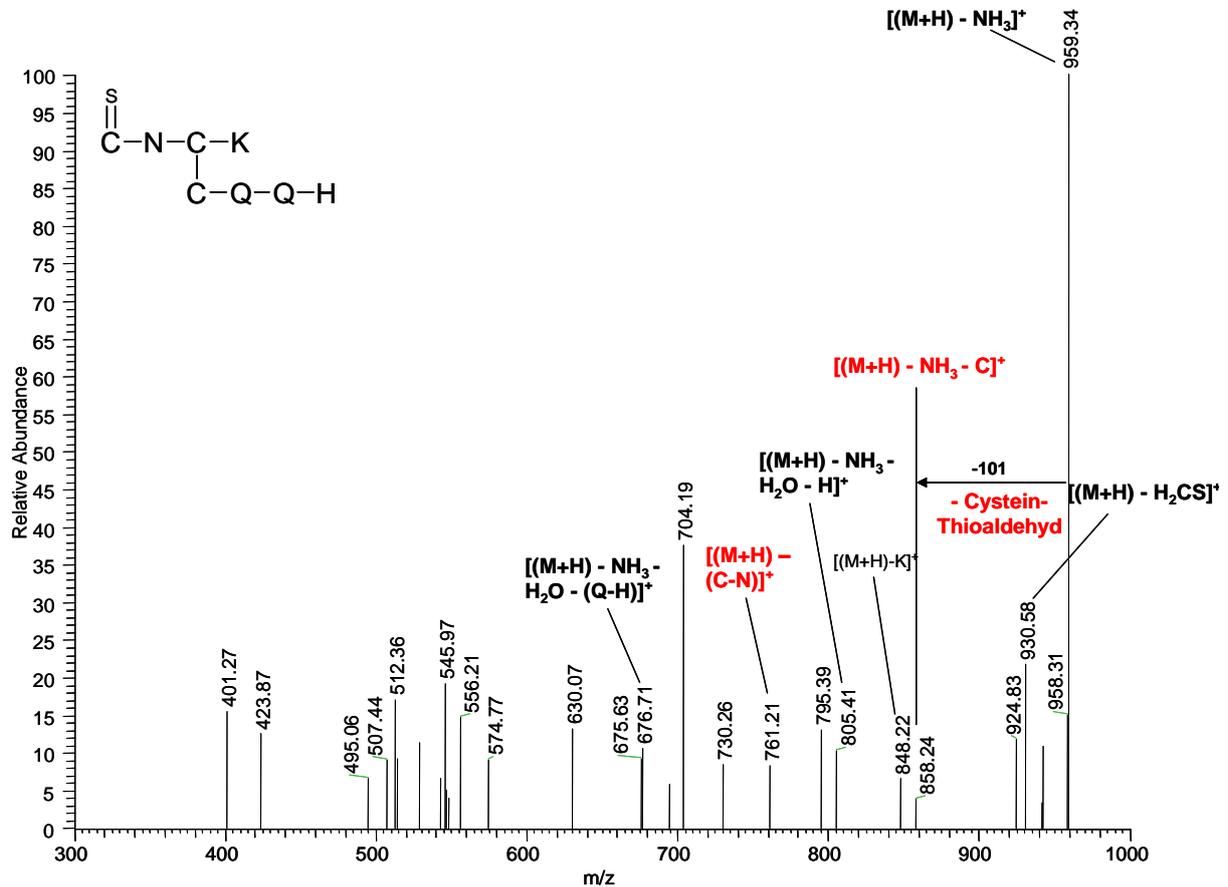


Abb. 51: MS³-Spektrum des Thioaldehyd-Fragmentes T1-T4

Im MS³-Spektrum des Thioaldehyd-Fragments T1-T4 (Abb. 51) folgt einer Ammoniakabspaltung direkt die Abspaltung des Cystein-Thioaldehyds, was als Beleg für die gebrochene Disulfidbindung zum Peptid T2 gewertet werden kann. Ferner beruht das Signal mit dem m/z-Verhältnis 761 auf der Abspaltung von Cystein-Thioaldehyd und Asparagin. Auch das gilt als Beleg für die Disulfidbrücke zwischen Cys-1 und Cys-11.

Im MS³-Spektrum des Thioaldehyd-Fragments T2-T1 (Abb. 52) findet man nach einer Wasserabspaltung (m/z = 1375), die Abspaltung der Aminosäure Lysin (m/z = 1247). Das Signal bei m/z = 1146 entspricht einer Abspaltung von Wasser, Lys und Cystein-Thioaldehyd und kann als Beweis für die Disulfidbrücke zwischen Cys-3 und Cys-15 geltend gemacht werden. Auch die anderen Fragmente liefern ein Bild einer noch intakten Disulfidbrücke

zwischen Cys-1 und Cys-11. Beide SS-Brücken konnten folglich bestätigt werden, wodurch die Eignung der Methode zur Disulfidbrücken-Aufklärung belegt wird.

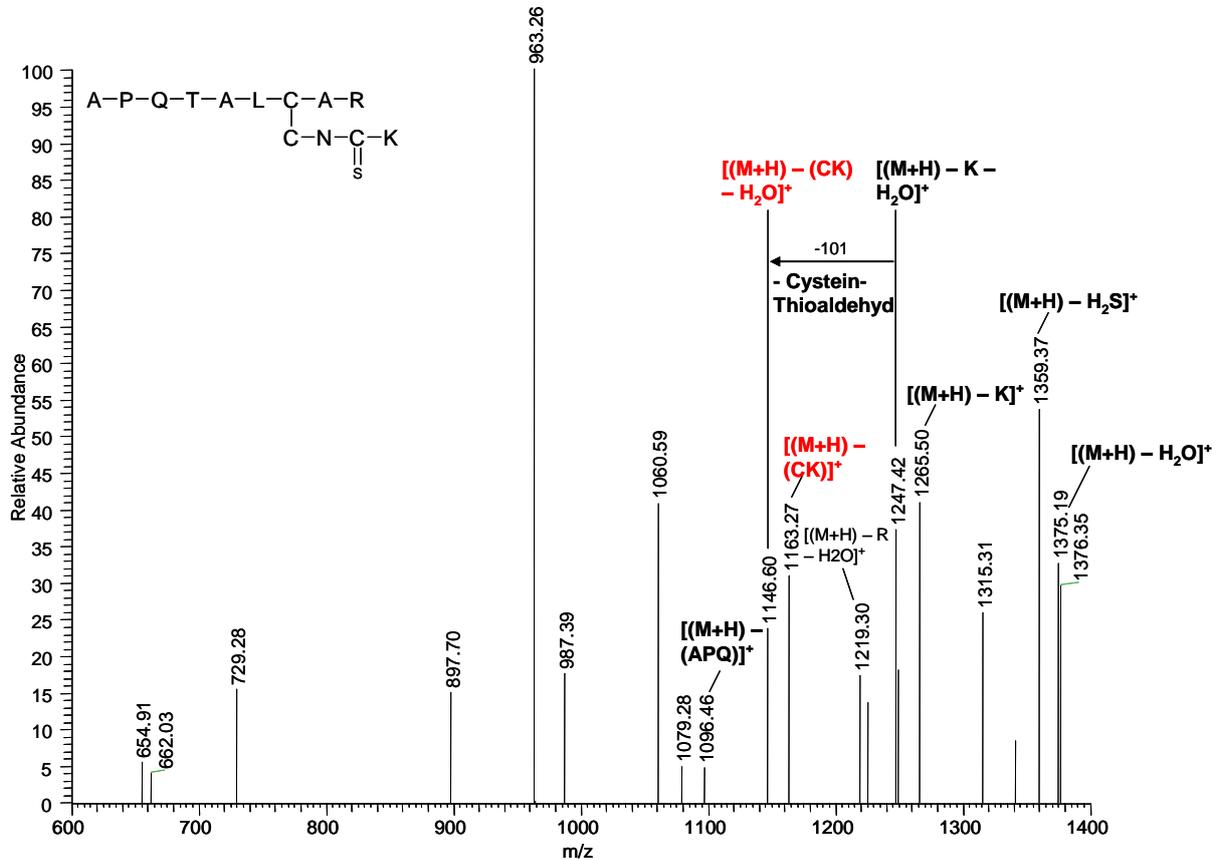


Abb. 52: MS³-Spektrum des Thioaldehyd-Fragmentes T2-T1

4.2.3 Fragmentierungsverhalten cyclisch verbrückter Peptide nach Oxidation

Bisher konnte gezeigt werden, dass linear verknüpfte Peptide, nach Oxidation zum SS-Monooxid, im Massenspektrometer fragmentierbar sind und Aufschluss über die Disulfidverbrückung liefern. Viele Peptide enthalten intramolekulare Disulfidbrücken (Abb. 53 a), mehrfache lineare Verbrückungen (Abb. 53 b), oder ringförmig aufgebaute Brücken (Abb. 53 c).

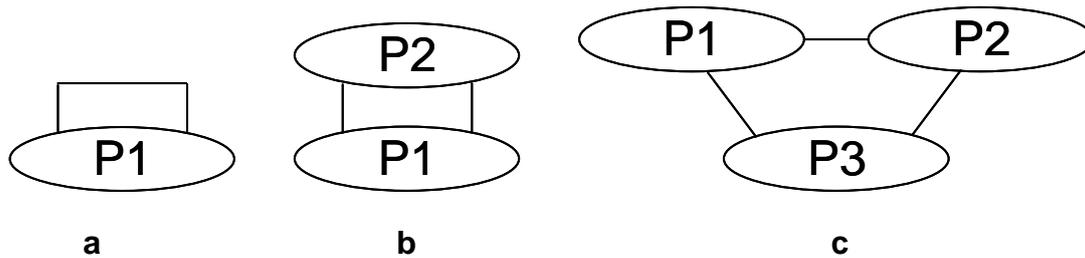


Abb. 53: Mögliche cyclische Verknüpfungsvarianten SS-verbrückter Peptide

Das Fragmentierungsverhalten der oxidierten Spezies wurde untersucht, um die Möglichkeiten der Methode zu untersuchen, auch diese Disulfidbrücken zweifelsfrei zu belegen.

Als Beispiel für ein Peptid mit intramolekularer SS-Brücke wurde natives Somatostatin gewählt, dessen Sequenz in Abb. 54 dargestellt ist.

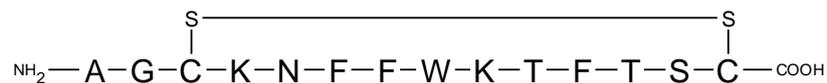


Abb. 54: Sequenz von Somatostatin

Das MS²-Spektrum der [M+2H]²⁺-Ionen des nativen Peptids, sowie das des oxidierten Derivates (Abb. 55), zeigen identische Fragmentierungsmuster und unterscheiden sich nur durch die Massenverschiebung aufgrund des eingeführten Sauerstoffs. Im Gegensatz zu den linear verknüpften Peptiden, zeigt die intramolekulare SS-Brücke keine Fragmentierung nach Oxidation. Als Hauptsignal wird sowohl beim nativen, als auch beim oxidierten Peptid im Spektrum vorwiegend eine Wasserabspaltung beobachtet (Abb. 55). Die Weiterfragmentierung der oxidierten Spezies in MSⁿ-Versuchen liefert ebenfalls nur Ionen, die durch Wasserabspaltung zu erklären sind. Bedingt durch die intakte Disulfidbrücke ist eine Sequenzierung des Moleküls im MS nicht möglich. Im Falle eines Bindungsbruches der Disulfidbrücke müsste sich spätestens im MS³-Spektrum ein für Peptide übliches Fragmentierungsmuster zeigen. Da dies nicht beobachtet wird, kann davon ausgegangen werden, dass die SS-Brücke, trotz Oxidation, nicht im MSⁿ-Experiment fragmentiert. Die Aufklärung von intramolekularen Disulfidbrücken ist daher nicht gelungen.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidiertes schwefelhaltiger Aminosäuren

Die MS²-Spektren des nativen und des oxidierten Lsyc-verdauten Apamins (Abb. 56) unterscheiden sich nur durch die Massenverschiebung, die durch die Einführung des Sauerstoffs bedingt ist. Ferner scheint das oxidierte Derivat leichter Wasser abzuspalten, so dass intensivere Signale für den Wasserverlust beobachtbar sind. Eine Fragmentierung der SS-Brücke wird auch hier nicht erreicht. Bedingt durch die intakte SS-Brücke, führt eine Weiterfragmentierung im MS³-Experiment nicht zu einer Sequenzierung des Peptids. Auch die doppelt oxidierte Spezies (m/z = 1039) zeigt keine Fragmentierung der SS-Brücken.

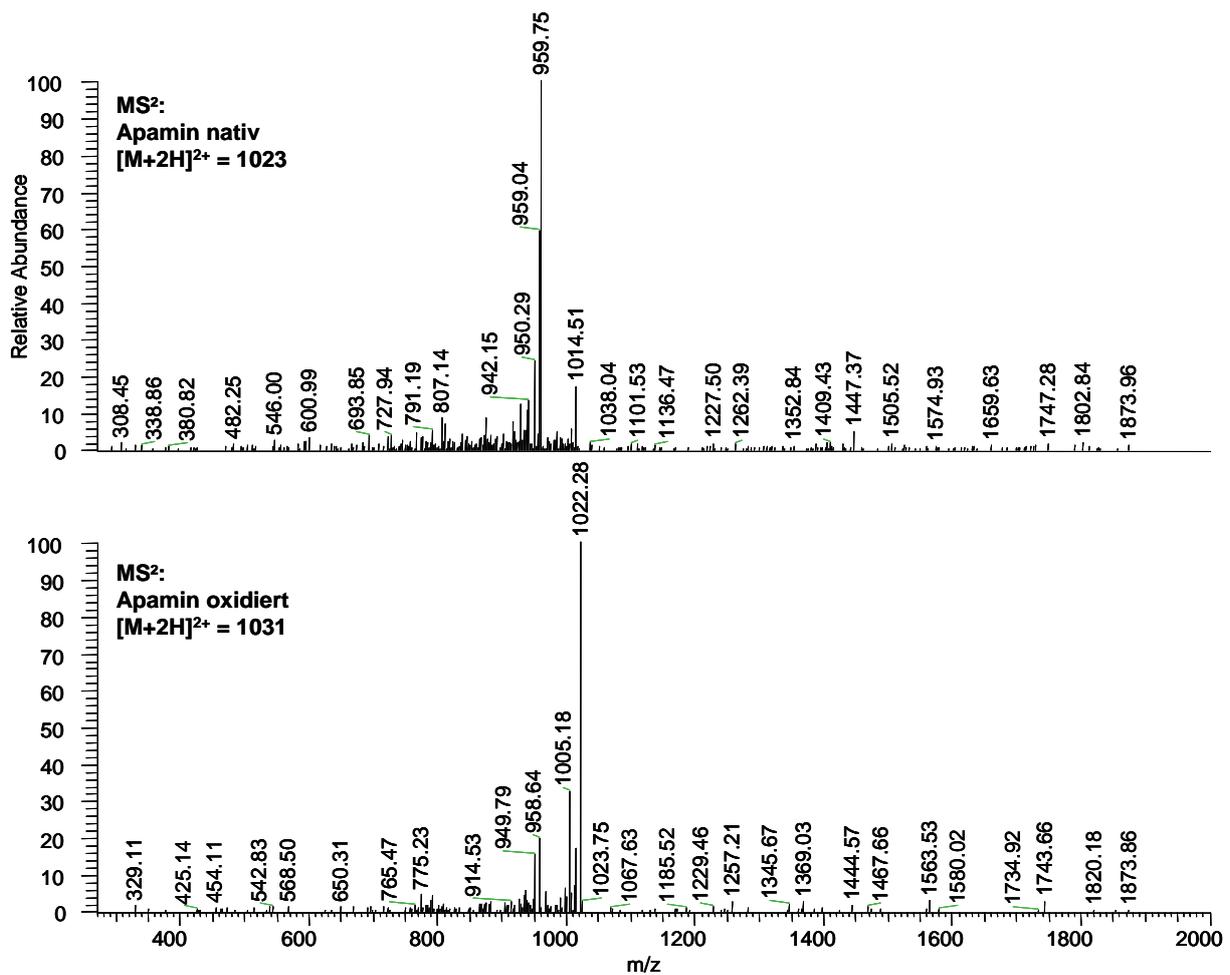
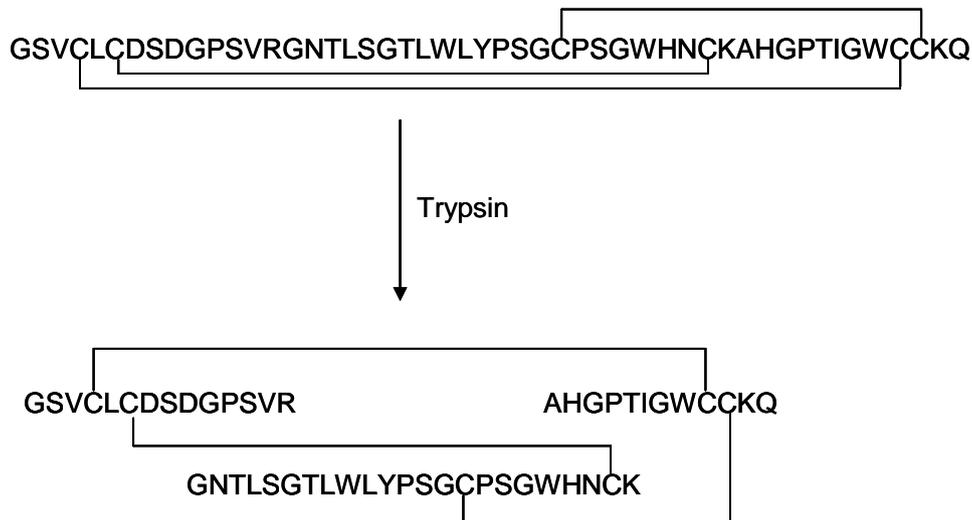


Abb. 56: MS²-Spektrum von Lsyc-verdautem Apamin (oben) und von der oxidierten Spezies (unten)

Ringförmig verknüpfte Peptide erhält man, wenn man z.B. Anthopleurin-A mit Trypsin verdaut (Schema 19). Als Ergebnis erhält man drei Peptide, die jeweils alle untereinander verbrückt sind und so einen Ring schließen (Abb. 53 c).



Schema 19: Verdau von Anthopleurin-A mit Trypsin

Das MS²-Spektrum des Anthopleurin-A-Verdaus unterscheidet sich, bis auf die Massenverschiebung, nicht von dem des einfach oxidierten Derivats (Abb. 57). In beiden Fällen wird das vierfach geladene Ion fragmentiert. Als einziger Unterschied ist eine spektrale Verschiebung von 4 Th (entspricht 16 Da) zu beobachten. Eine Spaltung der Disulfidbrücke konnte weder beim einfach oxidierten Derivat, noch bei den Oxidationsprodukten mit zwei oder drei oxidierten Disulfidbrücken erreicht werden. Ebenso wenig konnte, bedingt durch die intakten Brücken, eine Sequenzierung mit MSⁿ-Experimenten beobachtet werden.

Somit konnte in allen Fällen, in denen die SS-Verknüpfung zu einem Ringschluss im Molekül führt, keine Spaltung der Disulfidbrücke in der Ionenfalle erreicht werden.

Die Methode der Disulfidoxidation mit anschließender Fragmentierung im MS erlaubt folglich nur die Untersuchung linear verbrückter Peptide. Cyclische Verknüpfungen jedweder Art zeigen kein außergewöhnliches Fragmentierungsmuster. Die Disulfidbrücken werden bei Peptidringen durch Oxidation nicht spaltbar.

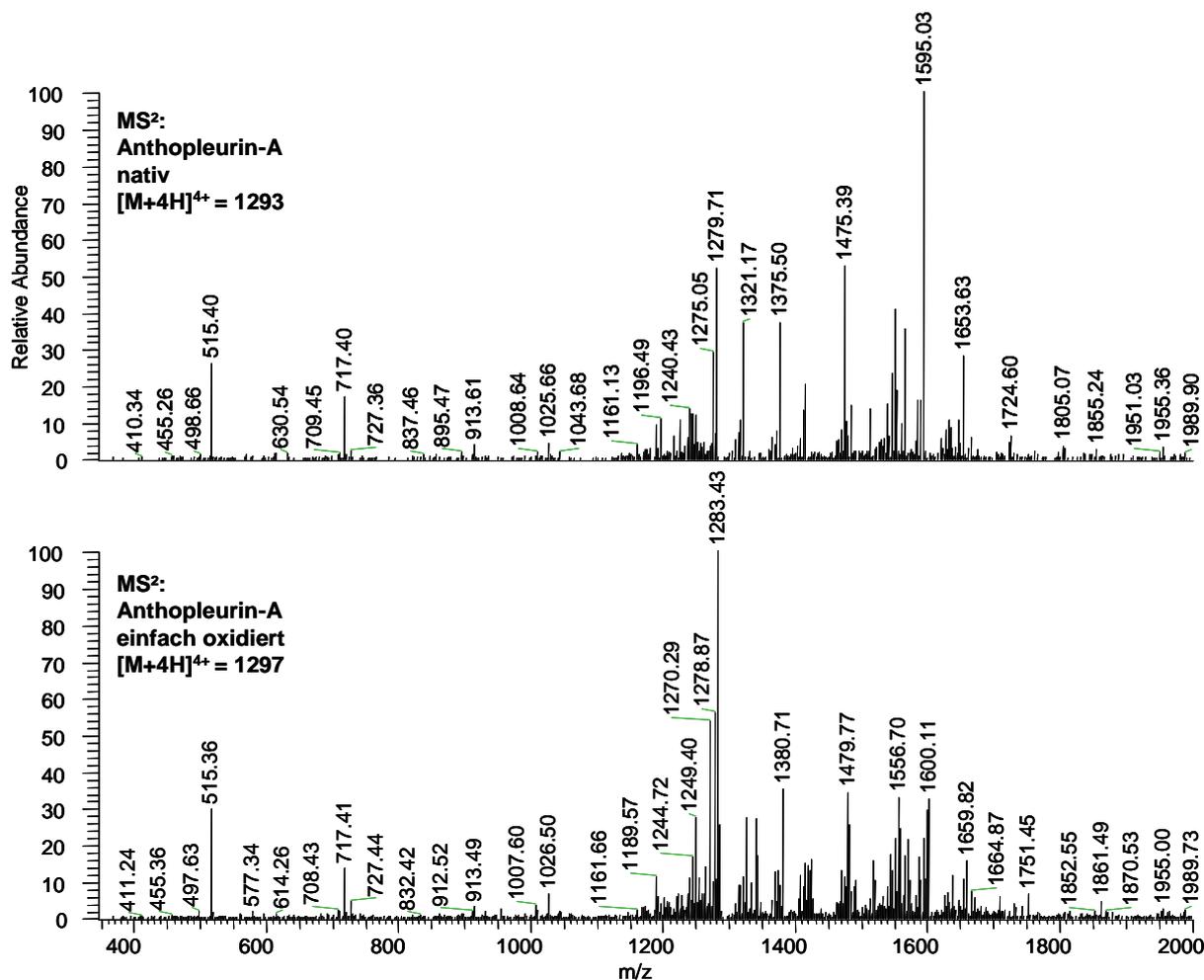


Abb. 57: MS²-Spektrum von Trypsin-verdautem Anthopleurin-A (oben) und von der einfach oxidierten Spezies (unten)

4.2.4 Optimierung der Methode der Disulfidbrückenoxidation

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass durch Oxidation der Disulfidbrücke diese im Massenspektrometer fragmentiert und nutzbringend für die Aufklärung von SS-Brücken verwendet werden kann. Ziel der Optimierung der Oxidationsmethode ist es Zeitaufwand und Bildung von Nebenprodukten, wie z.B. Sulfonsäure, zu minimieren.

4.2.4.1 Der Einfluss der Säure und des pH-Wertes

Die Stop-Methode für den proteolytischen Verdau, wo der Zusatz von Säure für die Inaktivierung der Protease verwendet wurde, resultierte in der Oxidation der Disulfidbrücken mit hohen Überschüssen an H₂O₂ bei pH 3, wobei zum Ansäuern Ameisensäure verwendet wurde.

Die Mischung von Wasserstoffperoxid und Ameisensäure führt bekanntermaßen zur Bildung von Perameisensäure. Deren Oxidationskraft wird genutzt, um Disulfidbrücken oxidativ unter Bildung von Sulfonsäuren zu spalten^[132].

Im Falle der Disulfidbrückenaufklärung muss die vollständige Oxidation vermieden werden, da sonst das Disulfid-Monooxid nicht weiter untersucht werden kann. Die Möglichkeit der selektiven Oxidation, die hauptsächlich oder im besten Fall ausschließlich das gewünschte Oxidationszwischenprodukt liefert, wäre wünschenswert. Die Methodenoptimierung wurde am Beispiel des GSSG durchgeführt und umfasst Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Säuren und pH-Werte auf die Reaktion.

Die Bildung von Oxidationsprodukten wurde qualitativ nach $t = 840$ min ausgewertet. In Tabelle 16 sind die verwendeten Versuchsanordnungen vergleichend für Oxidation mit und ohne den Zusatz von Säure gegenübergestellt.

Zusatz 1	äq.	Zusatz 2	äq.	pH-Wert
Ameisensäure	10	-	-	3
Essigsäure	10	-	-	5
Propionsäure	10	-	-	6
Ammoniumformiat	10	-	-	7
Ammoniumacetat	10	-	-	7
Ammoniumpropionat	10	-	-	7
Salzsäure	10	-	-	1
Schwefelsäure	10	-	-	1
Trifluoressigsäure	10	-	-	1
Ameisensäure	10	Salzsäure	10	1
Essigsäure	10	Salzsäure	10	1
Propionsäure	10	Salzsäure	10	1
Tris-HCl	10	-	-	9
Carbonatpuffer	10	-	-	9

Tab. 16: Durchgeführte Versuche zur Bestimmung der Abhängigkeit der Oxidationsreaktion beim Zusatz verschiedener Säuren und der Abhängigkeit vom pH-Wert. Eingesetzt wurden bei allen Versuchen 1 äq. GSSG und 100 äq. H_2O_2 .

Dabei zeigte sich zunächst, dass die Anwesenheit von Säure die Oxidationsreaktion eher bremst. Für den Fall, dass Proteaseinhibitoren die Analytik stören und die Proben thermisch nicht belastbar sind, ist das Ansäuern ein unverzichtbarer Schritt in der Aufarbeitung, um den proteolytischen Verdau zu stoppen. Sonst besteht die Gefahr von Fehlschnitten durch zu lange Verdauzeiten. Der Zusatz von Essigsäure liefert im Vergleich zur Ameisensäure wesentlich höhere Ausbeuten an GS(O)SG, ohne dabei die Menge an entstehendem Nebenprodukt, dem G-SO₃H, merklich zu erhöhen. Der Zusatz von Mineralsäuren oder TFA, die zu den starken Säuren gehören, verlangsamt die Produktbildung sehr stark, so dass diese Säuren als ungeeignet eingestuft werden. Um zu analysieren, ob die Umsetzung von der Art der Säure oder dem vorherrschenden pH-Wert abhängt, wurden weitere Versuche mit den Ammoniumsalzen der organischen Säuren bei pH 7 durchgeführt. Der Einfluss der organischen Säuren wurde bei pH 1 durch Ansäuern mit Salzsäure getestet.

Unter stark sauren Bedingungen (pH 1) kommt die Reaktion, unabhängig von der eingesetzten Säure, fast vollständig zum Erliegen. Bei Verwendung der Ammoniumsalz-Puffer bei pH 7 zeigt sich ein unterschiedliches Bild. Im Vergleich zur reinen Säure steigt die Ausbeute an Oxidationsprodukten durch den Einsatz von Ammoniumformiat, während die Ausbeute sowohl beim Zusatz von Acetat als auch von Propionat sinkt. Das Arbeiten unter basischen Bedingungen schlägt fehl, da statt Oxidationsprodukten nur Zersetzungsprodukte gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 58 zusammengefasst. Für die verschiedenen Experimente ist der Gesamtumsatz der Oxidationsprodukte, separat für die Bildung von GS(O)SG und G-SO₃H dargestellt. Der Gesamtumsatz berechnet sich aus den Flächenprozenten der Basischromatogramme.

Sowohl die Art der Säure als auch der eingestellte pH-Wert nehmen Einfluss auf die Bildung der Produkte. Da sich im Rahmen der routinierten Analyse die Oxidation an den Verdauenschritt anschließt, welcher u.U. die Zugabe von Säure bedingt, wird die Verwendung einer der organischen Säuren favorisiert. Essigsäure zeigt dabei die höchste Ausbeute am gewünschten Oxidationsprodukt, dem Disulfidmonooxid, wogegen die Propionsäure durch eine verminderte Bildung des Nebenprodukts Sulfonsäure hervorsticht.

Die Einstellung eines niedrigen pH Wertes kann genutzt werden, um die Oxidation gezielt zu stoppen und die Probe effektiv zu konservieren.

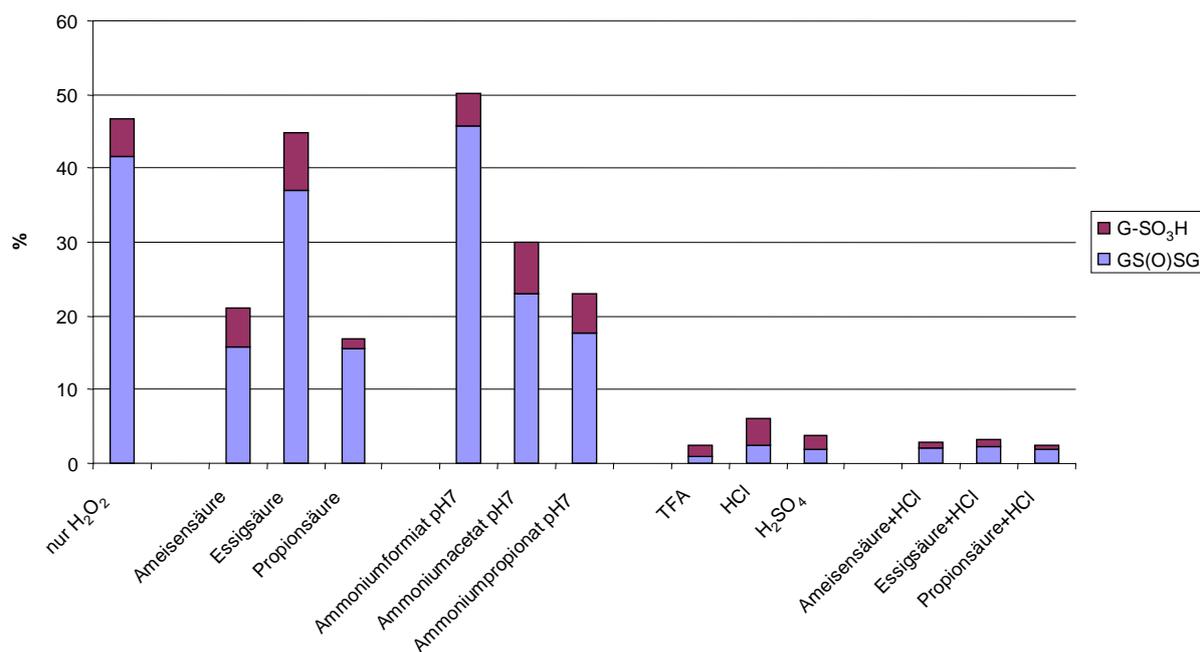


Abb. 58: Prozentuale Bildung von GS(O)SG und G-SO₃H aus GSSG durch Oxidation von GSSG; berechnet als Flächenprozent aus den Ionenchromatogrammen

4.2.4.2 Der Einfluss von Persäuren und mCPBA

Die im Vergleich zur Oxidation mit reinem Wasserstoffperoxid verminderte Produktbildung bei den Oxidationsversuchen mit Säurezusatz, lässt sich auf eine konkurrierende Reaktion zwischen dem H₂O₂ und der organischen Säure, unter Bildung einer Persäure, zurückführen. Das Disulfid wird durch Peroxide ins Monooxid überführt, wobei dies mit Wasserstoffperoxid oder dem Säureperoxid möglich ist. Die Zugabe von Säureperoxiden bestätigt dies. Es wurden vorab die Peroxide der Essig- und der Propionsäure durch H₂O₂-Zusatz erzeugt und in äquimolaren Mengen zu einer GSSG-Lösung hinzu gegeben. Sowohl die Bildung des Monooxids als auch die der Sulfonsäure unter Spaltung der Disulfidbrücke wird damit begünstigt. Äquivalent zur Verwendung von Perameisensäure können Disulfidbrücken mit Peressig- bzw. Perpropionsäure oxidativ geöffnet werden. Die Persäuren führen zu hohen Produktausbeuten, die jedoch durch hohe Ausbeuten an Nebenprodukt begleitet werden. Im Vergleich zur Oxidation mit reinem Wasserstoffperoxid kann lediglich die Ausbeute am Nebenprodukt gesteigert werden (Abb. 59), so dass die Verwendung von Persäuren für die Identifizierung von Disulfidbrücken nicht empfohlen werden kann.

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

Vergleichend dazu wurde die Wirkung von mCPBA untersucht. Diese Persäure wird für die Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden und Sulfonen genutzt^[133] und besticht durch sichere und einfache Handhabung.

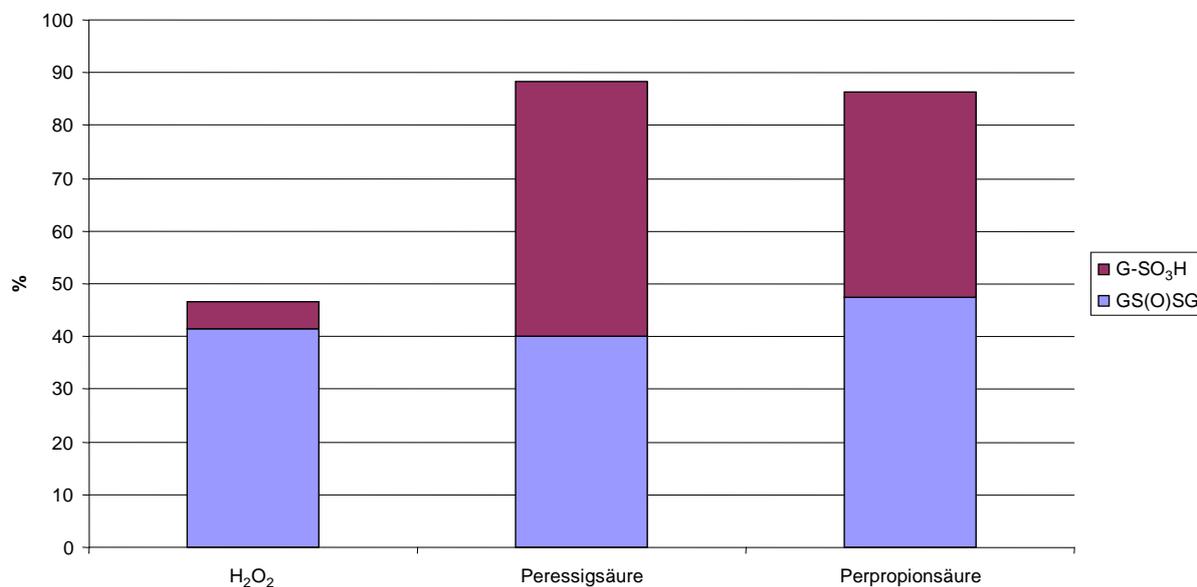


Abb. 59: Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H₂O₂, Peressigsäure und Perpropionsäure nach einer Reaktionszeit von 840 min

Die Versuche zeigten, dass die Verwendung von mCPBA nicht nur hohe Ausbeuten am gewünschten Monooxid liefert, sondern auch die Weiterreaktion zur Sulfonsäure unter Bindungsbruch nur eine untergeordnete Rolle spielt (Abb. 60). Des Weiteren kann die Reaktionszeit auf 100 min verkürzt werden, was für routinemäßige Untersuchungen von hohem Nutzen ist. Der Einsatz von 0,7 äq. mCPBA führt zu vollständigem Umsatz des Eduktes wobei zu 97 % das Hauptprodukt und nur zu 3 % das Nebenprodukt erhalten werden. Ferner wird durch einen Überschuss an mCPBA die Weiterreaktion zum Sulfon nicht begünstigt, so lange die Reaktionszeiten nicht zu lang gewählt werden.

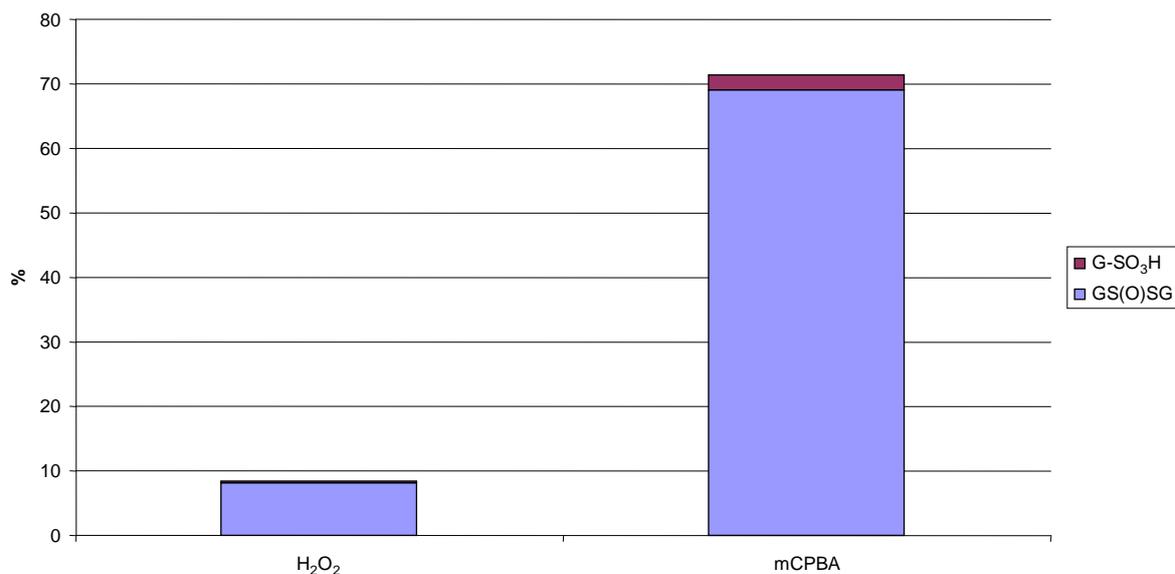


Abb. 60: Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H₂O₂ und mCPBA nach einer Reaktionszeit von 100 min

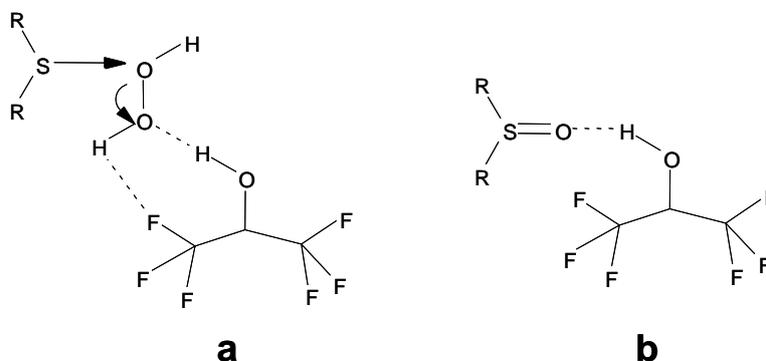
4.2.4.3 Der Einfluss von Katalysatoren

Hexafluorisopropanol

Zur Steigerung der Produktausbeute unter Verwendung des Oxidationsmittels H₂O₂ wurden Katalysatoren getestet. Ravikumar et al. untersuchten die Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden und Sulfonen mit Wasserstoffperoxid unter Verwendung von Hexafluorisopropanol (HFIP) als Lösungsmittel^[134]. Dabei konnten sie zeigen, dass bedingt durch starke Wasserstoffbrücken die Ausbeute am Sulfoxid gesteigert werden kann, während die Weiterreaktion zum Sulfon nicht stattfand. Die deutlich geringere Nucleophilie des Schwefels in Sulfoxiden wird durch die Bildung von H-Brücken zum HFIP zusätzlich gesenkt. Die Koordination des H₂O₂ am HFIP erhöht dagegen die Elektrophilie des Sauerstoffs und begünstigt somit die Oxidation des Sulfids. Dies konnte durch NMR Untersuchungen von Ravikumar et al. belegt werden und wird in Schema 20 verdeutlicht.

Die Verwendung von HFIP als Lösungsmittel für die Oxidation von Protein- und Peptidproben scheitert daran, dass diese in organischen Lösungsmitteln denaturiert werden und ausfallen. In einer 10 %igen wässrigen HFIP-Lösung sind die Proteine jedoch stabil, so dass in diesem System die Oxidation von Disulfidbrücken untersucht werden konnte. Die Oxidation von GSSG mit H₂O₂ in einer 10 %igen HFIP-Lösung wurde mit der Verwendung von reinem Wasser als Lösungsmittel verglichen. Die Ergebnisse der Sulfidoxidation von Ravikumar et. al. konnten dabei nur z.T. auf die Disulfide übertragen werden. Der Zusatz von

HFIP führt zu gesteigerten Produktausbeuten und einer geringeren Bildung des Nebenproduktes (Abb. 61). Dagegen verläuft die Reaktion im gewählten Zeitraum nicht quantitativ, wie es unter den Bedingungen der Sulfidoxidation der Fall ist.



Schema 20: Rolle von HFIP bei der Oxidation von Sulfiden nach Ravikumar et al.
 a) Begünstigung der Oxidation des Sulfids durch Steigerung der Elektrophilie des H_2O_2 b) Herabsetzung der Nucleophilie des Schwefelatoms im Sulfoxid

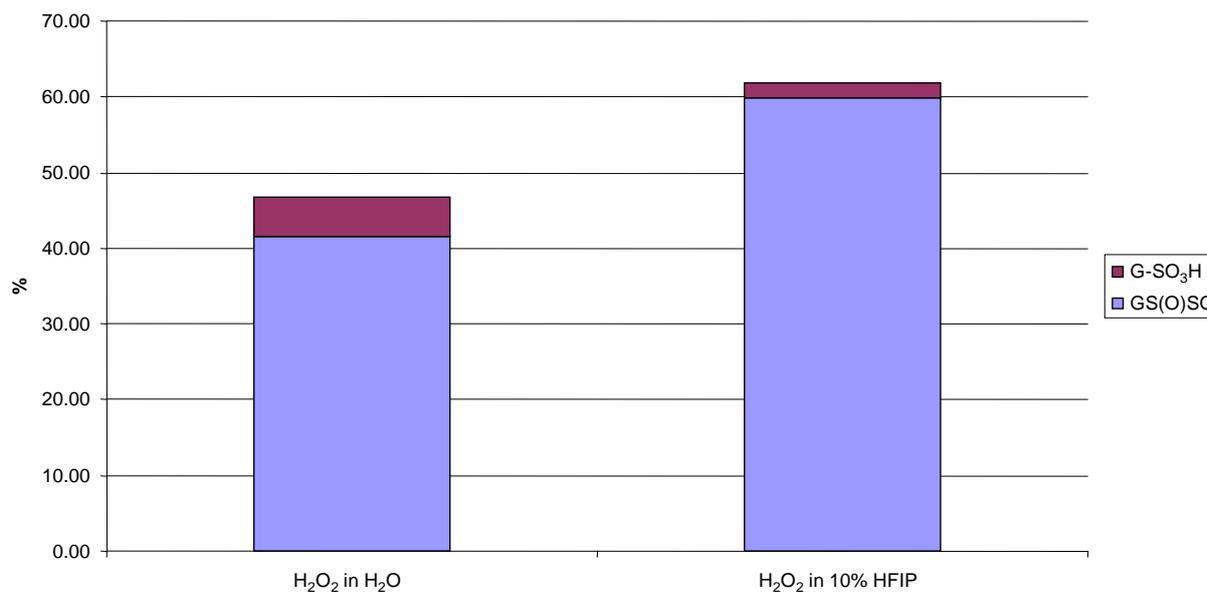


Abb. 61: Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H_2O_2 in reinem Wasser und einer 10 %igen wässrigen HFIP-Lösung nach einer Reaktionszeit von 840 min

Molybdän(VI)-dichloriddioxid (MoO_2Cl_2)

Für die selektive Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden und Sulfonen verwenden Jeyakumar et. al. Molybdän(VI)-Salze, wobei durch die Wahl der Reaktionsbedingungen entweder das Sulfoxid oder durch Weiterreaktion das Sulfon erhalten werden kann. Die Verwendung von 1,5 äq. MoO_2Cl_2 und 1,05 äq. H_2O_2 führt bei 20 untersuchten Sulfiden zur Bildung des Sulfoxids mit Ausbeuten von 78-96 %. Die untersuchten Sulfide enthalten z.T.

oxidationsempfindliche funktionelle Gruppen, die jedoch während der Oxidation des Schwefels erhalten bleiben^[135]. Diese Ergebnisse sollen auf die Oxidation des GSSG übertragen werden, wobei abweichend reines Wasser als Lösungsmittel verwendet werden musste.

Im Vergleich zur Oxidation mit reinem H₂O₂ konnte durch den Einsatz des Katalysators MoO₂Cl₂ eine um ca. 30 % erhöhte Ausbeute an Glutathion-S-Oxid erzielt werden, bei gleichzeitig verminderter Bildung des Überoxidationsproduktes (Abb. 62).

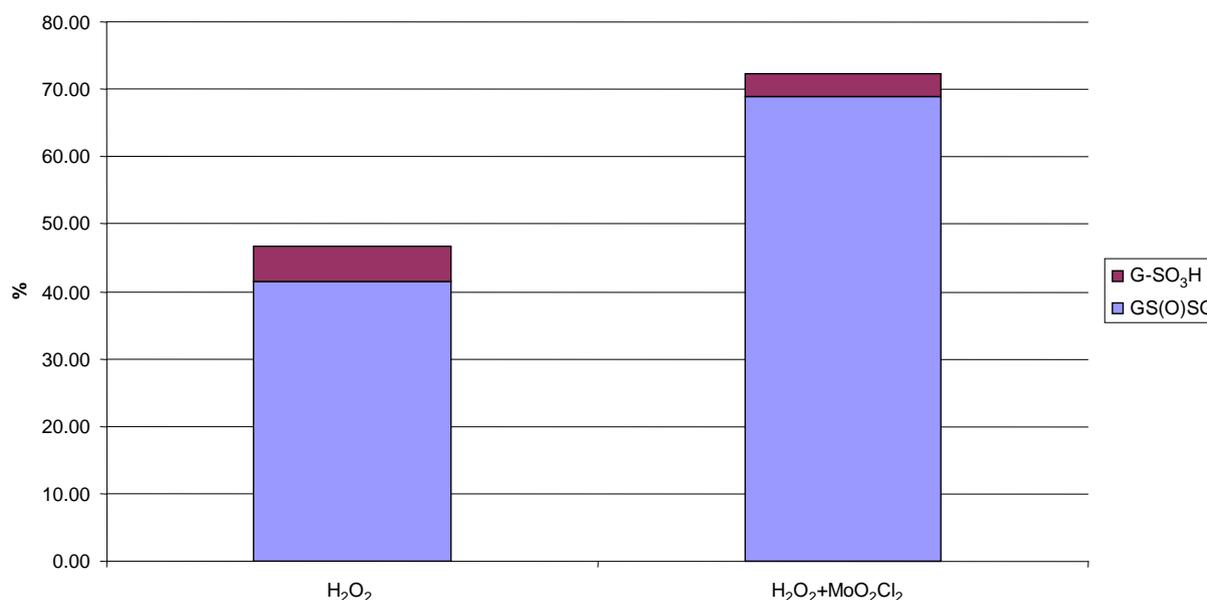


Abb. 62: Vergleich der Produktausbeuten bei der Oxidation von GSSG mit H₂O₂ ohne und mit Katalysatorzusatz nach einer Reaktionszeit von 840 min

4.2.4.4 Die Kinetik der Oxidationsreaktion unter verschiedenen Bedingungen

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Bildung von GS(O)SG und G-SO₃H für ausgewählte Versuchsanordnungen ermittelt und gegenüber gestellt. Hierzu wurde zunächst die Reaktionsordnung der Oxidation von GSSG mit H₂O₂ und HCOOH nach der Methode der variierenden Ausgangskonzentrationen bestimmt. Die Oxidation von 1 äq. GSSG mit 100 äq. H₂O₂ und 10 äq. Säure stellte den Bezugswert dar. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von GS(O)SG kann durch folgende Formel bestimmt werden:

$$v = \frac{d[\text{GS(O)SG}]}{dt} = \frac{[\text{GS(O)SG}]_t - [\text{GS(O)SG}]_0}{t}$$

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

In verschiedenen Experimenten wurde jeweils die Konzentration eines der Reaktanden verdoppelt, woraus drei verschiedene Möglichkeiten resultieren: die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt konstant, verdoppelt sich, oder vervierfacht sich. Bezogen auf die Konzentration des untersuchten Reaktanden deutet dies auf eine Reaktion nullter, erster oder zweiter Ordnung hin. Die Gesamtordnung kann anschließend aus der Summe der Einzelordnungen bestimmt werden.

Nach Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit des Bezugsexperiments wurde in weiteren Versuchen jeweils die Konzentration des Oxidationsmittels, der Säure oder des GSSG verdoppelt. Für alle Versuchsanordnungen wurde nach $t = 150, 300, 450, 600, 750$ und 900 min die Menge an gebildetem GS(O)SG als Flächenprozentwert aus dem Basisionenchromatogramm ermittelt.

Nur die Erhöhung der GSSG-Ausgangskonzentration führt zu einer Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 63). Die erhaltenen Geschwindigkeiten wurden alle auf den Referenzansatz normiert und ergeben sich als Mittelwerte der Geschwindigkeiten zu den jeweiligen Messzeitpunkten aus $n = 3$ Versuchen.

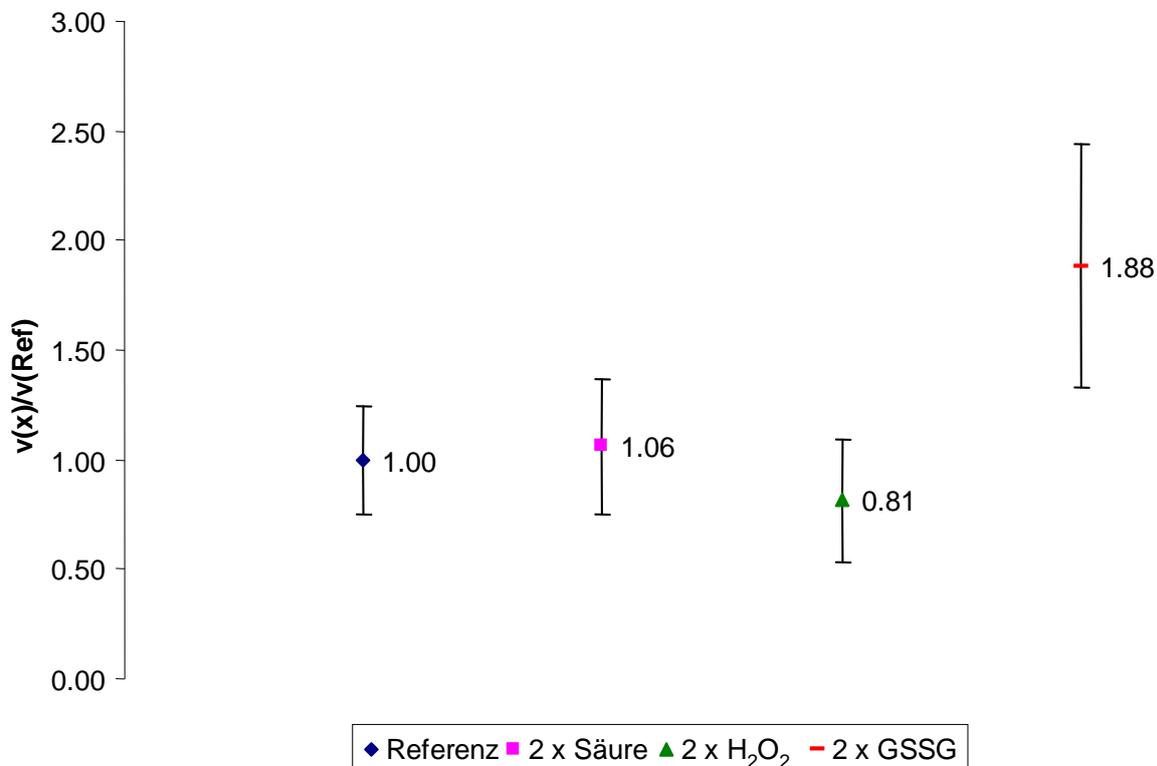


Abb. 63: Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von GSSG zu GS(O)SG in Abhängigkeit der Konzentration der Reaktanden. Werte sind normiert auf den Referenzwert.

Aufgrund des hohen Überschusses an Oxidationsmittel und Säure ergibt sich für die Verdopplung dieser Ausgangskonzentrationen keine Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit, gleichbedeutend einer Reaktion nullter Ordnung. Die Abhängigkeit von der GSSG-Konzentration kann im Bereich des Fehlerintervalls auf eine Reaktion erster Ordnung zurückgeführt werden. Die Gesamtreaktion hat somit eine pseudo-erste Ordnung.

Unter Annahme einer Reaktion pseudo-erster Ordnung wurden für den Referenzversuch und die Experimente mit den Alkansäuren die Geschwindigkeitskonstanten der Produktbildung errechnet. Die Abnahme der GSSG Konzentration entspricht dabei der Bildung von GS(O)SG, woraus folgende Formel resultiert:

$$v = \frac{d[\text{GS(O)SG}]}{dt} = -\frac{d[\text{GSSG}]}{dt} = -k \cdot [\text{GSSG}]$$

Integriert man die Funktion erhält man:

$$[\text{GSSG}]_t = [\text{GSSG}]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Als Endergebnis berechnet sich die Geschwindigkeitskonstante k wie folgt:

$$k = \frac{\ln \frac{[\text{GSSG}]_0}{[\text{GSSG}]_t}}{t}$$

Trägt man den Logarithmus des Quotienten aus Anfangskonzentration c_0 zu Konzentration zum Zeitpunkt t $c(t)$ gegen die Zeit t graphisch auf, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Die Geschwindigkeitskonstante k kann aus der Steigung der Anpassungsgeraden ermittelt werden. Da die Konzentration an GSSG im Laufe der Zeit abnimmt, ist eine Reaktion pseudo-erster Ordnung nur in der Initialphase gewährleistet. Nach einer gewissen Zeit t tritt u.U. eine Krümmung der Kurve auf, welche zur Bestimmung der Geraden nicht berücksichtigt werden sollte. Dies gilt insbesondere für die Versuchsanordnungen mit MoO_2Cl_2 und mit mCPBA. Hierbei handelt es sich um Reaktionen zweiter Ordnung. Um vergleichbare Werte für die Geschwindigkeitskonstanten zu erhalten, wurden auch diese Experimente zusätzlich als Reaktionen erster Ordnung ausgewertet, wobei nur die Initialphase, in der die Konzentrationsveränderung noch keine merkliche Rolle spielt, zur Berechnung der Steigung genutzt wurde.

Der Vollständigkeit und Richtigkeit halber wurden bei den betreffenden Versuchen die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zweiter Ordnung nach folgender Gleichung mit ausgewertet:

$$k = \frac{\frac{1}{[\text{GSSG}]_t} - \frac{1}{[\text{GSSG}]_0}}{t}$$

Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Bildung der Sulfonsäure kann nicht über die Abnahme des Disulfidmonooxids berechnet werden, da die Konzentration des Edukts durch dessen Neubildung stets steigt und damit variabel ist. Aus diesem Grund wird die Abnahme von GSSG für die Berechnung herangezogen. In diesem Fall wird nur der Anteil berücksichtigt, der bereits vollständig oxidiert vorliegt. Somit lässt sich auch für dieses System eine Reaktion pseudo-erster Ordnung aufstellen.

Für jedes System wurde eine graphische Auswertung, basierend auf $n = 8$ Messreihen, durchgeführt. Exemplarisch ist diese Auswertung bei der Oxidation mit reinem Wasserstoffperoxid für die Bildung von GS(O)SG (Abb. 64) und für die Bildung von G-SO₃H (Abb. 65) dargestellt. Die ermittelten Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Produktbildung sind in Tab. 17 und Tab. 18 für die Reaktionen pseudo-erster und zweiter Ordnung respektive angegeben.

Abbildung 66 zeigt vergleichend die prozentuale Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten bezogen auf den Referenzversuch, der Oxidation von GSSG mit 100 äq. H₂O₂ bei pH7.

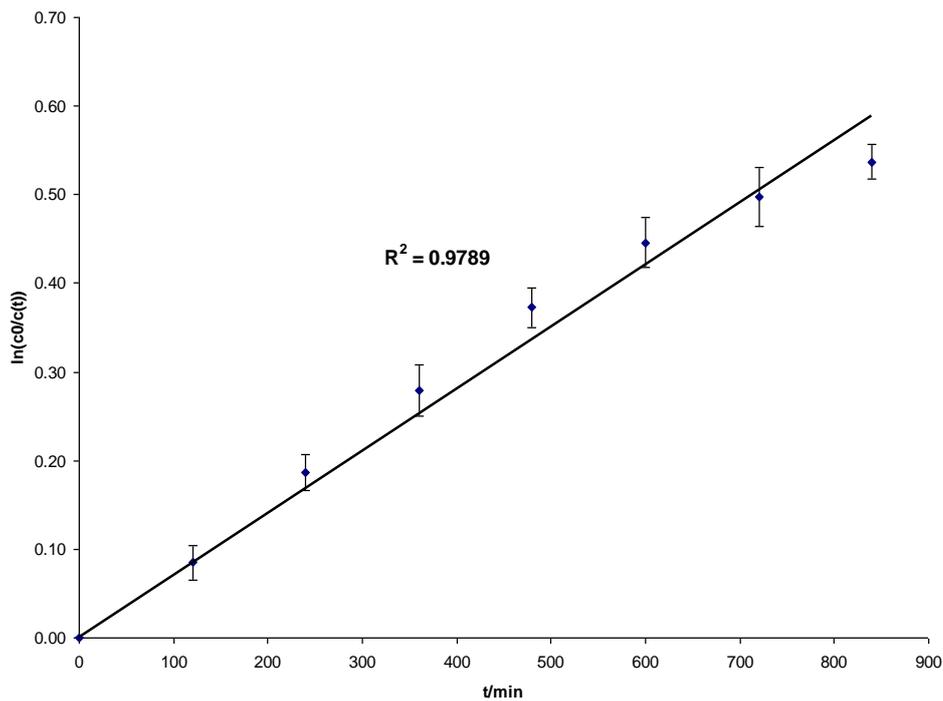


Abb. 64: Auswertung der Geschwindigkeitskonstante der Bildung von GS(O)SG durch Oxidation von GSSG mit H_2O_2 bei pH 7 über die Steigung der Regressionsgerade. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus $n = 8$ Messungen der Quotienten der Logarithmen gegen die Zeit

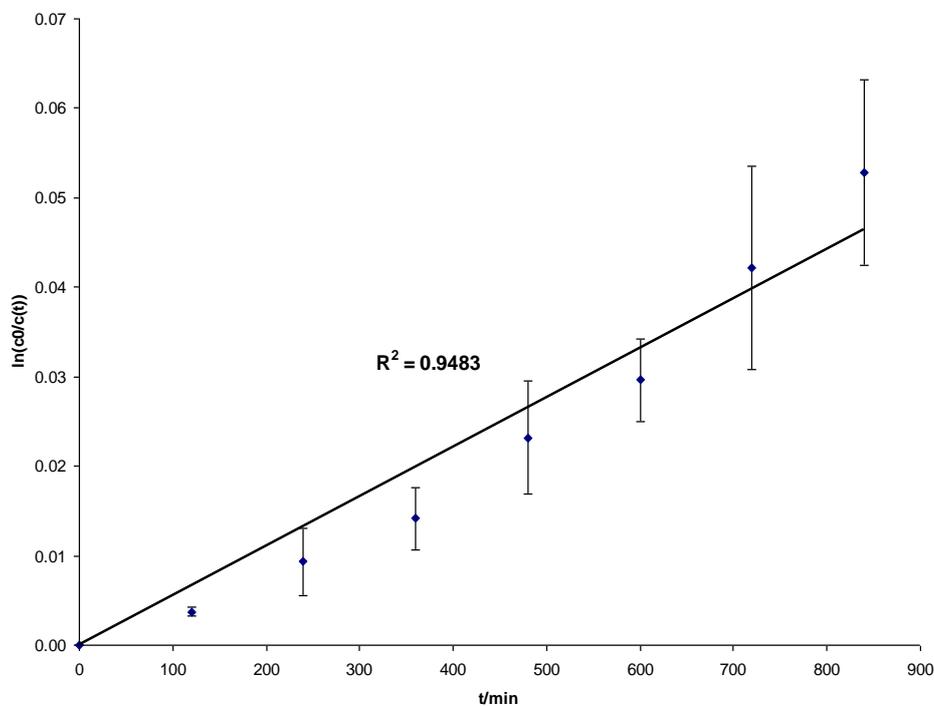


Abb. 65: Auswertung der Geschwindigkeitskonstante der Bildung von G- SO_3H durch Oxidation von GSSG mit H_2O_2 bei pH 7 über die Steigung der Regressionsgerade. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus $n = 8$ Messungen der Quotienten der Logarithmen gegen die Zeit

4.2 Teil 2 – Der Nutzen oxidierter schwefelhaltiger Aminosäuren

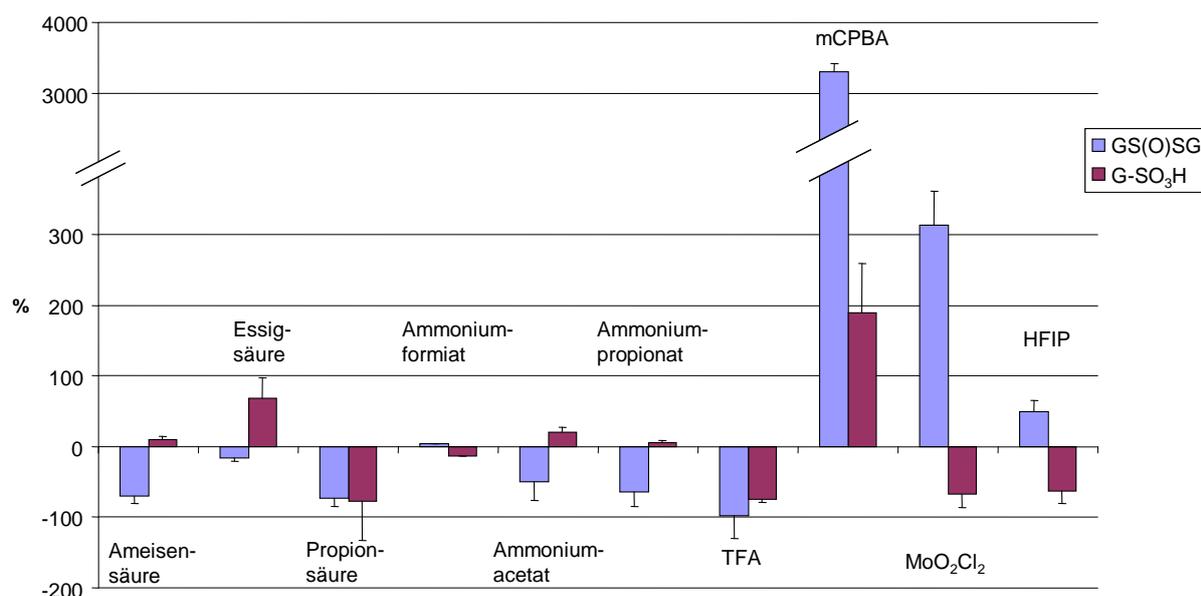


Abb. 66: Prozentuale Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten der Produktbildung verglichen mit dem Referenzansatz (Oxidation von GSSG mit 100 äq. H₂O₂ bei pH 7).

Ansatz	k' (GS(O)SG) /min ⁻¹	Δ% zu Referenz*	k' (G-SO ₃ H) /min ⁻¹	Δ% zu Referenz*
Referenz*	$(7,01 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$	-	$(5,54 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$	-
Ameisensäure	$(2,08 \pm 0,32) \cdot 10^{-4}$	-70	$(6,07 \pm 0,31) \cdot 10^{-5}$	+10
Essigsäure	$(5,83 \pm 1,27) \cdot 10^{-4}$	-17	$(9,34 \pm 3,89) \cdot 10^{-5}$	+69
Propionsäure	$(1,87 \pm 0,30) \cdot 10^{-4}$	-73	$(1,21 \pm 0,85) \cdot 10^{-5}$	-78
Ammoniumformiat	$(7,32 \pm 0,16) \cdot 10^{-4}$	+5	$(4,80 \pm 0,23) \cdot 10^{-5}$	-13
Ammoniumacetat	$(3,47 \pm 1,72) \cdot 10^{-4}$	-50	$(6,65 \pm 2,19) \cdot 10^{-5}$	+20
Ammoniumpropionat	$(2,51 \pm 0,81) \cdot 10^{-4}$	-64	$(5,87 \pm 2,20) \cdot 10^{-5}$	+6
TFA	$(1,21 \pm 0,39) \cdot 10^{-4}$	-98	$(1,43 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$	-74
mCPBA	$(2,30 \pm 0,51) \cdot 10^{-2}$	+3180	$(1,60 \pm 0,60) \cdot 10^{-4}$	+189
MoO ₂ Cl ₂	$(2,90 \pm 0,44) \cdot 10^{-3}$	+314	$(1,77 \pm 0,47) \cdot 10^{-5}$	-68
HFIP	$(1,04 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$	+49	$(2,02 \pm 0,53) \cdot 10^{-5}$	-63

* als Referenzansatz wurde das System aus GSSG mit 100 äq. H₂O₂ bei pH 7 ohne Zusätze gewählt

Tab. 17: Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung der Bildung von GS(O)SG und G-SO₃H aus GSSG mit prozentualer Veränderung gegenüber dem Referenzansatz

Ansatz	k (GS(O)SG) /M ⁻¹ min ⁻¹	k (G-SO ₃ H) /M ⁻¹ min ⁻¹
mCPBA	152±37	1,16±0,26
MoO ₂ Cl ₂	21,9±6,7	0,20±0,07

Tab. 18: Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der Bildung von GS(O)SG und G-SO₃H aus GSSG bei den Ansätzen mit mCPBA und MoO₂Cl₂

4.2.4.5 Abschließende Beurteilung der Optimierungsmöglichkeiten für die Oxidation von Disulfidbrücken

Im Sinne einer wirtschaftlichen Anwendung der Disulfidbrückenaufklärung via Oxidation und Fragmentierung im MS ist auf Kosteneffizienz, einfache Handhabung und Zeitersparnis zu achten.

Die Oxidation mit reinem Wasserstoffperoxid liefert Ergebnisse die den Kriterien entsprechen, ist u.U. aber nicht anwendbar, da die zu untersuchenden Peptide aus proteolytischem Verdau hervorgehen, welcher durch Säurezusatz gestoppt werden musste. Die Verwendung organischer Säuren, wie Ameisen-, Essig- oder Propionsäure führt zu verlangsamten Reaktionskinetiken bei der Produktbildung und wäre somit nicht Mittel der ersten Wahl. Im Sinne der Reproduzierbarkeit bei Routineanalysen bietet die Oxidation unter sauren Bedingungen den Vorteil, dass die Oxidationsreaktion durch die Einstellung des pH-Wertes auf pH = 1 abgebrochen werden kann. Durch die Festlegung der Reaktionszeit kann demnach eine definierte Menge Oxidationsprodukt reproduziert werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass für den Verdau mit Trypsin als Ansäuerungsmittel Essigsäure gewählt werden sollte. Sie senkt einerseits den pH-Wert genügend ab, um die Inaktivierung der Protease zu bewerkstelligen, deren pH-Arbeitsbereich zwischen pH 6,5 und pH 9 liegt^[136]. Andererseits wird die Bildungsgeschwindigkeit des S-Monooxids im Vergleich zum Versuch unter neutralen Bedingungen nur geringfügig beeinträchtigt. Für die Untersuchung proteolytischer Verdau, die mit Hilfe von GluC gewonnen werden, muss auf die Verwendung von Ameisensäure zurückgegriffen werden, da GluC erst ab pH 3 inaktiviert werden kann^[137].

Eine besonders schnelle und effektive Methode zur Generierung von Disulfidmonooxid ist die Oxidation mit mCPBA. Sie zeigt von allen getesteten Versuchsanordnungen die größte Reaktionsgeschwindigkeit. Der überdurchschnittlich hohe Anteil des Überoxidationsproduktes, sowie die Tatsache, dass eine pH-Wert-Erniedrigung nicht zum Stoppen der Reaktion führt, wirken sich dagegen nachteilig auf die routinemäßige Verwendung dieser Methode aus. Die Anwendbarkeit bleibt nur gewährleistet, so lange nicht mehr als ein Äquivalent des Oxidationsmittels zugegeben wird. mCPBA epoxidiert Doppelbindungen (Prileschajew-Reaktion)^[138], und greift Carbonylgruppen in der Bayer-Villiger-Oxidation^[139] an und stellt somit kein selektives Oxidationsmittel dar. Die Umsetzung von Aminen zu Amin-N-Oxiden^[140] zeigt einen weiteren Nachteil auf und macht eine Anwendbarkeit der Methode auf Realproben fraglich. Bei einer Realprobe, bestehend aus vielen Peptiden mit einer großen Anzahl an oxidierbaren Aminosäuren ist eine Vielzahl von Reaktionen zu erwarten, die das resultierende Chromatogramm sehr komplex werden lassen. Die Methode bietet aber eine gute Möglichkeit isolierte Peptide, die evtl. durch Fraktionierung gewonnen wurden, schnell und effektiv zu oxidieren.

Eine gute Alternative bildet die Verwendung von Molybdän(VI)-dichloriddioxid, als Katalysator für die Oxidation mit Wasserstoffperoxid. Die Bildungsgeschwindigkeit von GS(O)SG wird nach den vorliegenden Ergebnissen um mehr als 300 % gesteigert, wobei gleichzeitig die Überoxidation zur Sulfonsäure gebremst wird. Die Kompatibilität von MoO₂Cl₂ mit Alkoholen, Estern, Aldehyden, Oximen und Aromaten wurde bereits von Jeyakumar et. al. gezeigt^[135]. All diese Strukturen wurden nicht angegriffen oder chemisch modifiziert, während die Oxidation des Schwefels ablief. MoO₂Cl₂ bildet somit ein selektives Oxidationsmittel für schwefelhaltige Aminosäuren, wobei die Anwendbarkeit auf Realproben im Vorfeld abgeklärt werden muss, um Interaktionen des Katalysators mit dem Analyten auszuschließen.

Für den Fall dass die Verwendung von MoO₂Cl₂ zu unerwarteten Nebenreaktionen führt, kann durch die Beimengung von 10 vol% HFIP ebenfalls eine um fast 50 % beschleunigte Oxidation des Disulfids erreicht werden. Gleichzeitig wird die Weiteroxidation zur Sulfonsäure um über 60 % verlangsamt. Die Mischbarkeit mit Wasser ist gewährleistet und die Stabilität von Peptiden und Proteinen konnte am GluC-Verdau des IgG nachgewiesen werden. Es wurde keine Denaturierung des Probenmaterials beobachtet. Da außerdem bei diesem Versuchsaufbau nicht mit Nebenreaktionen zu rechnen ist, steht eine sichere Oxidationsmethode zur Verfügung.

Die Wahl der geeigneten Methode sollte durch Vorversuche an der zu untersuchenden Substanz abgeklärt werden, um die bestmögliche Strategie zu entwickeln schnell und frei von Nebenreaktionen zum gewünschten Ziel zu gelangen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf LC-MS/MS Technik basierende Methoden entwickelt, mit denen die schwefelhaltigen Aminosäuren sowie Disulfidbrücken in Peptiden und Proteinen nachgewiesen werden können. Die Möglichkeiten der oxidativen Schädigung schwefelhaltiger Aminosäuren wurden an humanem polyklonalem Immunglobulin G getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass Methionin selektiv durch die Zugabe von 500 äq. H_2O_2 bei einem pH-Wert von 5 ins Sulfoxid überführt werden kann und massenspektrometrisch anhand des Fragmentierungsverhaltens nachweisbar ist. Die in der Ionenfalle ablaufende Abspaltung von Methylsulfensäure aus Methioninsulfoxid liefert im MS^2 -Spektrum einen Basispeak, der um 64 Da leichter ist als das Mutterion und zur Identifizierung der oxidierten Spezies und somit auch der Inkorporation von Methionin im Peptid herangezogen werden kann. Bedingt durch die Proteinsequenz kann redoxlabiles Methionin im Peptid enthalten sein, welches nach der nötigen Aufarbeitung des Proteins reduziert wird, nicht mehr nachweisbar ist und somit nicht für die Quantifizierung der Gesamtschädigung herangezogen werden kann.

Für die Oxidation des aminocarboxymethylierten Cysteins bedarf es höherer Überschüsse an H_2O_2 (2000 äq.), sowie einem niedrigeren pH-Wert, um das Redoxpotential des Wasserstoffperoxids zu steigern. Die Oxidation gelingt unter Erhalt des Sulfoxids und führt im Massenspektrometer zur Fragmentierung des modifizierten Cysteinrestes, wobei 2-Aminocarboxyethylsulfensäure mit einer Masse von 107 Da abgespalten wird. Der resultierende Basispeak kann zur Identifizierung des Cysteins herangezogen werden. Durch eine geeignete Kombination zweier Oxidationsversuche können nacheinander Methionin und Cystein nachgewiesen werden, wodurch eine Methode zur Aufklärung unbekannter Peptide im *Peptide Mass Fingerprint Mapping* erhalten wird.

Die Oxidation des Cystins in intakten Proteinen wird nicht beobachtet, da das erhaltene Disulfid-S-Oxid nicht redoxstabil ist. Während der reduktiven Alkylierung wird das SS-Monooxid reduziert, so dass letztlich, wie bei ungeschädigtem Cystin auch, nur freies

Cystein erhalten wird. Es konnte an disulfidverbrückten Testpeptiden gezeigt werden, dass eine Oxidation der Disulfidbrücke stattfindet und das Monooxid erhalten wird. Durch Weiteroxidation wird als Nebenprodukt die Cysteinsulfonsäure gebildet. Das SS-Monooxid liefert charakteristische Fragmentierungsmuster im MS, wobei primär unter Bruch der Schwefel-Schwefel-Bindung die ehemals verknüpften Peptide einzeln detektiert werden. Somit konnte eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe der Nachweis von Disulfidbrücken in Peptiden via Oxidation zum SS-Monooxid und anschließender Fragmentierung im MS möglich ist. Dabei ist, je nach Fragestellung, die Wahl des richtigen Oxidationsmittels entscheidend. Die Verwendung von Wasserstoffperoxid unter saueren Bedingungen ist ideal für die Oxidation im Anschluss an den proteolytischen Verdau, da das gewünschte SS-Monooxid in ausreichenden Mengen reproduzierbar erhältlich ist. Die Beimengung von 10 vol% Hexafluorisopropanol zur Peptidlösung steigert die Ausbeute und spart Zeit. Für schnelle Routineanalysen einzelner Peptide kann auf mCPBA als Oxidationsmittel für die Disulfidbrücke zurückgegriffen werden, allerdings nur wenn keine empfindlichen funktionellen Gruppen im Peptid vorhanden sind. Ausreichend schnell kann auch mit Molybdän(VI)-dichloriddioxid und Wasserstoffperoxid oxidiert werden, solange keine ungewünschten Interaktionen des Katalysators mit dem Probenmaterial beobachtet werden. Die Aufklärung der Disulfidbrücken kann mit dieser Methode nur auf linear verbrückte Peptide angewandt werden. Cyclische Verbrückungen zeigen selbst nach Oxidation keine Spaltung der SS-Brücke im MS und müssen somit durch die Wahl geeigneter Experimente separat nachgewiesen werden.

Die entwickelten chromatographisch-massenspektrometrischen Methoden eignen sich folglich für einen Großteil der Aufklärungsarbeit an Proteinen. Sie können für die Identifizierung von Peptiden und von enthaltenen Disulfidbrücken in den beschriebenen Grenzen verwendet werden.

6 Fazit

In der Arbeit wurden Methoden entwickelt, deren Anwendung einerseits die Detektion und andererseits die Quantifizierung schwefelhaltiger Aminosäuren ermöglicht. Es werden Oxidationen der Aminosäuren durchgeführt, die zu einem charakteristischen Fragmentierungsverhalten der oxidierten Spezies in der Ionenfalle des Massenspektrometers führen, anhand dessen Methionin, Cystein und Cystin eindeutig nachweisbar werden. Die Weiterentwicklung dieser Methoden und die Erforschung neuer Verfahren sollten im Blickfeld zukünftiger Arbeiten auf diesem Gebiet bleiben. So wäre es wünschenswert, einen Weg zu entwickeln, Methionin als Marker für den Gesamtstress am Protein einzusetzen, da es sich aufgrund seiner Oxidationsempfindlichkeit anbietet. Dies scheitert bisher in einigen Fällen an der Instabilität des Methioninsulfoxids gegenüber Reduktionsmitteln. Hierfür könnte die Totalhydrolyse mit anschließender chromatographischer Trennung der Aminosäuren hilfreich sein, wenn es gelingt die Gesamtheit an Methioninsulfoxid verlustfrei zu quantifizieren.

Auch wenn nach den vorliegenden Erkenntnissen Disulfidbrücken durch Oxidation einfach und zeitsparend massenspektrometrisch nachweisbar werden, so gilt dies nur für linear verknüpfte Peptide. Dies ist ein wichtiger Schritt in die richtige Richtung, jedoch für die vollständige Charakterisierung aller in einem Protein enthaltenen Disulfidbrücken ungenügend. Cyclisch verknüpfte Peptide müssen auch weiterhin mit konventionellen Methoden detektiert werden. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt für weiterführende Forschungstätigkeiten, um die von mir etablierten Methoden zu ergänzen oder zu verbessern und so die Möglichkeit zu schaffen, mit wenigen einfachen Experimenten eine vollständige Charakterisierung zu gewährleisten.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Otagiri M., A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins, *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2005**, *20*, 309-23.
- [2] Bhattacharya A. A., Grüne T., Curry S., Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 721-32.
- [3] Collins R. E., Transport of gases through hemoglobin solution, *Science* **1961**, *133*, 1593-1594.
- [4] Wang J.H., Transport of oxygen through hemoglobin solutions, *Science* **1961**, *133*, 1770-1771.
- [5] Speyer J. F., Karam J. D., Lenny A. B., On the role of DNA polymerase in base selection, *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **1966**, *31*, 693-7.
- [6] Kates J. R., McAuslan B. R., Relationship between protein synthesis and viral deoxyribonucleic acid synthesis, *J. Virol.* **1967**, *1*, 110-4.
- [7] Ignarro L. J., Byrns R. E., Buga G. M., Wood K. S., Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical, *Circ. Res.* **1987**, *61*, 866-79.
- [8] Singh A., Chemical and biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1982**, *60*, 1330-45.
- [9] Shigenaga M. K., Hagen T. M., Ames B. N., Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1994**, *91*, 10771-8.

-
- [10] Stohs S. J., The role of free radicals in toxicity and disease, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **1995**, *6*, 205-28.
- [11] Davies K. J., Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, *61*, 1-31.
- [12] Ursini F., Barsacchi R., Pelosi G., Benassi A., Oxidative stress in the rat heart, studies on low-level chemiluminescence, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, *4*, 241-4.
- [13] Mehta J. L., Rasouli N., Sinha A. K., Molavi B., Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 794-803.
- [14] Schulman I. H., Zhou M. S., Rajj L., Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension, *J. Hypertens. Suppl.* **2006**, *24*, 45-50.
- [15] Soccio M., Toniato E., Evangelista V., Carluccio M., De Caterina R., Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants, *Eur. J. Clin. Invest.* **2005**, *35*, 305-14.
- [16] Li J. M., Shah A. M., ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**, *14*, 221-6.
- [17] Przedborski S., Jackson-Lewis V., Vila M., Wu D. C., Teismann P., Tieu K., Choi D. K., Cohen O., Free radical and nitric oxide toxicity in Parkinson's disease, *Adv. Neurol.* **2003**, *91*, 83-94.
- [18] Tieu K., Ischiropoulos H., Przedborski S., Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease, *IUBMB Life* **2003**, *55*, 329-35.
- [19] Morin B., Davies M. J., Dean R. T., The protein oxidation product 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage, *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1059-67.
- [20] Winterbourn C. C., Parsons-Mair H. N., Gebicki S., Gebicki J. M., Davies M. J., Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides, *Biochem. J.* **2004**, *381*, 241-8.
- [21] Finley E. L., Dillon J., Crouch R. K., Schey K. L., Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2391-7.

- [22] Schöneich C., Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *21*, 1093-7.
- [23] Stadtman E. R., Levine R. L., Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids* **2003**, *25*, 207-18.
- [24] Miller H., Claiborne A., Peroxide modification of monoalkylated glutathione reductase. Stabilization of an active-site cysteine-sulfenic acid, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 19342-50.
- [25] Soerbo B., Ewetz L., The enzymatic oxidation of cysteine to cysteinesulfinate in rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *18*, 359-63.
- [26] Lei K., Townsend D. M., Tew K. D., Protein cysteine sulfinic acid reductase (sulfiredoxin) as a regulator of cell proliferation and drug response, *Oncogene* **2008**, *27*, 4877-87.
- [27] Blackinton J., Lakshminarasimhan M., Thomas K. J., Ahmad R., Greggio E., Raza A. S., Cookson M. R., Wilson M. A., Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 6476-85.
- [28] Thomas E. L., Aune T. M., Oxidation of Escherichia coli sulfhydryl components by the peroxidase-hydrogen peroxide-iodide antimicrobial system, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *13*, 1006-10.
- [29] Moriarty-Craige S. E., Adkison J., Lynn M., Gensler G., Bressler S., Jones D. P., Sternberg P. Jr., Antioxidant supplements prevent oxidation of cysteine/cystine redox in patients with age-related macular degeneration, *Am. J. Ophthalmol.* **2005**, *140*, 1020-6.
- [30] Giles G. I., Tasker K. M., Collins C., Giles N. M., O'rourke E., Jacob C., Reactive sulphur species: an in vitro investigation of the oxidation properties of disulphide S-oxides, *Biochem. J.* **2002**, *364*, 579-85.
- [31] Slump P., Schreuder H. A., Oxidation of methionine and cystine in foods treated with hydrogen peroxide, *J. Sci. Food Agric.* **1973**, *24*, 657-61.
- [32] Takahashi K., Products of performic acid oxidation and acid hydrolysis of S-carboxymethylcysteine and related compounds, *J. Biochem.* **1973**, *74*, 1083-9.
- [33] Liu J. L., Lu K. V., Eris T., Katta V., Westcott K. R., Narhi L. O., Lu H. S., In vitro methionine oxidation of recombinant human leptin, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 632-40.

- [34] Fransson J. R., Oxidation of human insulin-like growth factor I in formulation studies. 3 Factorial experiments of the effects of ferric ions, EDTA, and visible light on methionine oxidation and covalent aggregation in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1046-50.
- [35] Amici A., Levine R. L., Tsai L., Stadtman E. R., Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3341-6.
- [36] Requena J. R., Chao C. C., Levine R. L., Stadtman E. R., Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, *98*, 69-74.
- [37] Hawkins C. L., Davies M. J., Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation, *Biochem. J.* **1999**, *340*, 539-48.
- [38] Uchida K., Kato Y., Kawakishi S., A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *169*, 265-71.
- [39] Creeth J. M., Cooper B., Donald A. S. R., Clemp J. R., Studies of the limited degradation of mucous glycoproteins, *Biochem. J.* **1983**, *211*, 323-32.
- [40] van der Werf P., Meister A., The metabolic formation and utilization of 5-oxo-L-proline (L-pyrroglutamate, L-pyrrolidone carboxylate), *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1975**, *43*, 519-56.
- [41] Taborsky G., Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous ion and air. Effect of ionic constituents of the reaction medium on the nature of the oxidation products, *Biochemistry* **1973**, *12*, 1341-8.
- [42] Uchida K., Kawakishi S., 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins, *FEBS Lett.* **1993**, *332*, 208-10.
- [43] Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillère-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen A. T., Zingraff J., Jungers P., Descamps-Latscha B., Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1304-13.
- [44] Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V., Nguyen-Khoa T., Nguyen A. T., Gausson V., Mothu N., London G. M., Jungers P., Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients, *Am. J. Kidney Dis.* **2005**, *45*, 39-47.

- [45] Himmelfarb J., McMenamin M. E., Loseto G., Heinecke J. W., Myeloperoxidase-catalyzed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients, *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1163-9.
- [46] Mitrogianni Z., Barbouti A., Galaris D., Siamopoulos K. C., Tyrosine nitration in plasma proteins from patients undergoing hemodialysis, *Am. J. Kidney Dis.* **2004**, *44*, 286-92.
- [47] Feigelson P., On the role of free radicals in tryptophan pyrrolase catalysis, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *92*, 187-90.
- [48] Criado S., Marioli J. M., Allegretti P. E., Furlong J., Rodríguez Nieto F. J., Mártire D. O., García N. A., Oxidation of di- and tripeptides of tyrosine and valine mediated by singlet molecular oxygen, phosphate radicals and sulfate radicals, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *65*, 74-84.
- [49] Fu S. L., Dean R. T., Structural characterization of the products of hydroxyl-radical damage to leucine and their detection on proteins, *Biochem. J.* **1997**, *324*, 41-8.
- [50] Miller R. H., Harper A. E., Regulation of valine and alpha-ketoisocaproate metabolism in rat kidney mitochondria, *Am. J. Physiol.* **1988**, *255*, 475-81.
- [51] BCC, Protein drugs: Global markets and manufacturing technologies, BCC Press Room, **2008**.
- [52] Stephens B. W., Murray J., Diabetes Action Now: A initiative of the World Health Organization and the International Diabetes Federation, WHO library cataloguing, **2004**.
- [53] Fink W., Haidinger G., Die Häufigkeit von Gesundheitsstörungen in 10 Jahren Allgemeinpraxis, *Z. Allg. Med.* **2007**, *83*, 102-8.
- [54] Hense H.-W., Risk factor scoring for coronary heart disease, *BMJ* **2003**, *327*, 1238-9.
- [55] Feldmann M., Maini R. N., Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 163-96.
- [56] Doggrell S. A., Is natalizumab a breakthrough in the treatment of multiple sclerosis?, *Expert. Opin. Pharmacother.* **2003**, *4*, 999-1001.
- [57] Krueger G. G., Langley R. G., Leonardi C., Yeilding N., Guzzo C., Wang Y., Dooley L. T., Lebwohl M., A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis, *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 580-92.

- [58] Vogel C., Cobleigh M., Tripathy D., Gutheil J., Harris L., Fehrenbacher L., Slamon D., Murphy M., Novotny W., Burchmore M., Shak S., Stewart S., First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer, *Oncology* **2001**, *61*, 37-42.
- [59] Richtlinie 2001/83/EG der europäischen Union: Gemeinschaftskodex für Humanarzneimittel.
- [60] Deutsches Arzneimittelgesetz (AMG), § 4 Abs. 15.
- [61] Deutsches Arzneimittelgesetz (AMG), § 4 Abs. 23.
- [62] Holtzhauer M., Methoden in der Proteinanalytik, 1. Aufl., Springer Verlag, Berlin, **1996**.
- [63] Eppert G. J., Flüssigchromatographie: HPLC – Theorie und Praxis, Vieweg Verlag, Braunschweig, **1997**.
- [64] Porath J., Flodin P., Gel filtration: A method for desalting and group separation, *Nature* **1959**, *183*, 1657-9.
- [65] Eith C., Kolb M., Seubert A., Viehweger K. H., Praktikum der Ionenchromatographie Version 12, *Metrohm Monographie 8.792.2001 d*, **2000**.
- [66] Hyun M. H., Han S. C., Lipshutz B. H., Shin Y.J., Welch C. J., New chiral crown ether stationary phase for the liquid chromatographic resolution of alpha-amino acid enantiomers, *J. Chromatogr. A* **2001**, *910*, 359-65.
- [67] Steffek R. J., Zelechonok Y., Gahm K. H., Enantioselective separation of racemic secondary amines on a chiral crown ether-based liquid chromatography stationary phase, *J. Chromatogr. A* **2002**, *947*, 301-5.
- [68] Bailon P., Ehrlich G. K., Fung W.-J., Berthold W., An Overview of Affinity Chromatography, *Humana Press* **2000**.
- [69] Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B., Selective enzyme purification by affinity chromatography, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1968**, *61*, 636-43.
- [70] Meyer V. R., Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern, 2. erw. Aufl., Wiley-VHC, Weinheim, **1999**.
- [71] Lottspeich F., Zorbas H., Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.

- [72] Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., Biochemie, 3. erw. überarb. Aufl., Springer Verlag, Berlin, **2009**.
- [73] Drenth J., Principles of Protein X-ray Crystallography, Springer Verlag, Berlin, **2002**.
- [74] Allen R. C., Budowle B., Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids: Selected Techniques, de Gruyter Verlag, Berlin, **1994**.
- [75] Michov B., Elektrophorese. Theorie und Praxis, deGruyter Verlag, Berlin, **1995**.
- [76] Schägger H., von Jagow G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368-79.
- [77] O'Farrell P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007-21
- [78] Berth M., Moser F. M., Kolbe M., The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 1223-43.
- [79] Edman P., A method for the determination of amino acid sequence in peptides, *Arch. Biochem.* **1949**, *22*, 475-6.
- [80] Thomson J. J., Rays of Positive Electricity, *Phil. Mag.* **1910**, *20*, 752-67
- [81] Thompson J. J., Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis, Longmans, Green and Co. Ltd., London, **1913**.
- [82] Dempster A. J., A new method of positive ray analysis, *Phys. Rev.* **1917**, *11*, 316-25.
- [83] Aston F. W., A Positive Ray Spectrograph, *Phil. Mag.* **1919**, *38*, 707-15.
- [84] Aston F. W., The Mass-Spectra of Chemical Elements, *Phil. Mag.* **1920**, *39*, 611-25.
- [85] Aston F. W., Isotopes and Atomic Weights, *Nature* **1920**, *105*, 617-9.
- [86] Smith L. P., Parkins W. E., Forrester A. T., On the Separation of Isotopes in Quantity by Electromagnetic Means, *Phys. Rev.* **1947**, *72*, 989-1002.
- [87] Beynon J. H., The use of the mass spectrometer for the identification of organic compounds, *Mikrochim. Acta* **1956**, *44*, 437-453.

-
- [88] Biemann K., Cone C., Webster B. R., Arsenault G. P., Determination of the amino acid sequence in oligopeptides by computer interpretation of their high-resolution mass spectra, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5598-606.
- [89] Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B., Molecular beams of macroions, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240-9.
- [90] 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.
- [91] Fenn J. B., Elektrospray: Molekulare Elefanten lernen das Fliegen, Nobelvortrag, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3999-4024
- [92] Budzikiewicz H., Schäfer M., Massenspektrometrie – Eine Einführung. Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [93] Hübschmann H.-J., Handbuch der GC/MS, Grundlagen und Anwendung, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- [94] Lehmann W. D., Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [95] Paul W., Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen, Nobelvortrag., *Phys. Blätter* **1990**, *46*, 227-36.
- [96] Fenn J. B., Review: Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How it all began., *J. Biomol. Tech.* **2002**, *13*, 101-18
- [97] Stafford G. C., Kelley P. A., Syka J. E., Reynolds W. E., Todd J. F., Recent improvements in analytical applications of advanced ion trap technology, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process* **1984**, *60*, 85-98.
- [98] Taubert D., Pflanzliche Ernährung – Rotwein – Kardiovaskuläre Erkrankungen, Dissertation, Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln, Köln, **2002**.
- [99] Latscha K., Analytische Chemie, Springer Verlag, Berlin, **1995**.
- [100] Janeway C. A., Travers P., Immunologie, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1997**.
- [101] Bradford M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-54.

- [102] Froelich J. M., Reid G. E., Mechanisms for the proton mobility-dependent gas-phase fragmentation reactions of S-alkyl cysteine sulfoxide-containing peptide ions, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2007**, *18*, 1690-705.
- [103] Nagahara N., Katayama A., Post-translational regulation of mercaptopyruvate sulfur-transferase via a low redox potential cysteine-sulfenate in the maintenance of redox homeostasis, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34569-76.
- [104] Hanson G. T., Aggeler R., Oglesbee D., Cannon M., Capaldi R. A., Tsien R. Y., Remington S. J., Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13044-53.
- [105] Jones D. P., Go Y. M., Anderson C. L., Ziegler T. R., Kinkade J. M. Jr., Kirilin W. G., Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control, *FASEB J.* **2004**, *18*, 1246-8.
- [106] Ciorba M. A., Heinemann S. H., Weissbach H., Brot N., Hoshi T., Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1997**, *94*, 9932-7.
- [107] Kim H. Y., Gladyshev V. N., Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases, *PLoS. Biol.* **2005**, *3*, e375.
- [108] Hoshi T., Heinemann S., Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction, *J. Physiol.* **2001**, *531*, 1-11
- [109] Moskovitz J., Weissbach H., Brot N., Cloning the expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1996**, *93*, 2095-9.
- [110] Chang T. S., Jeong W., Woo H. A., Lee S. M., Park S., Rhee S. G., Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50994-1001.
- [111] Carballal S., Alvarez B., Turell L., Botti H., Freeman B. A., Radi R., Sulfenic acid in human serum albumin, *Amino Acids* **2007**, *32*, 543-51.
- [112] Shetty V., Spellman D. S., Neubert T. A., Characterization by tandem mass spectrometry of stable cysteine sulfenic acid in a cysteine switch peptide of matrix metalloproteinases, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2007**, *18*, 1544-51.

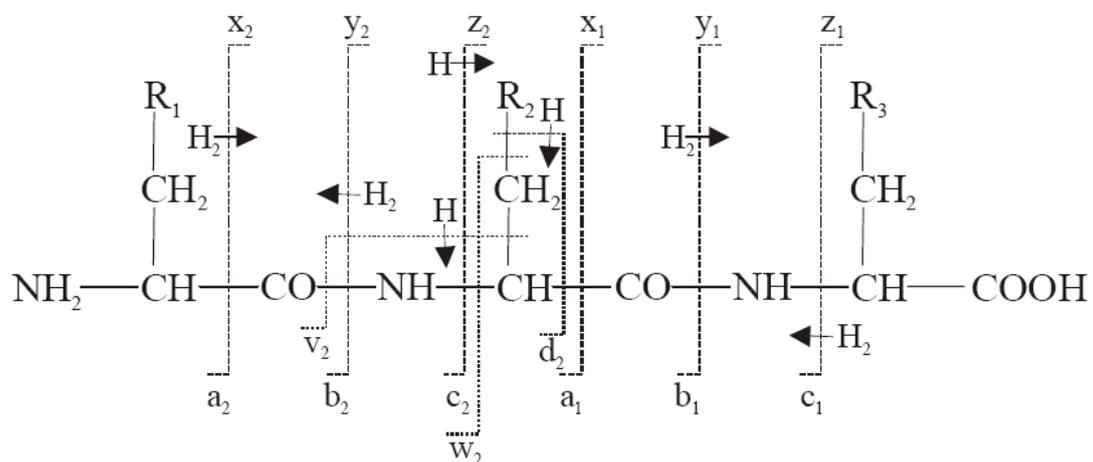
- [113] Claiborne A., Yeh J. I., Mallett T. C., Luba J., Crane E. J. 3rd, Charrier V., Parsonage D., Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation, *Biochemistry* **1999**, 38,15407-16.
- [114] Kingsbury C. A. and Cram D. J., Studies in Stereochemistry. XXXII. Mechanism of Elimination of Sulfoxides, *J. Am. Soc.* **1960**, 82, 1810-9.
- [115] Walling C. and Bollyky L., The Addition of Dimethyl Sulfoxide Anion to Olefins and the Pyrolysis of Sulfoxides, *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2699 – 701.
- [116] Afzali-Ardakani A. and Rapoport H., L-Vinylglycine, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 4817-20.
- [117] Griesbeck A. G., Hirt J., A Photochemical Route to Vinylglycine and a Vinylglycine Dipeptide, *Liebigs Ann. Chem.* **1995**, 11, 1957-61.
- [118] Griesbeck A. G., Heckroth H., Photofragmentation of C,N-protected α -amino acids: comparing tert-leucine with sulfur-containing amino acids methionine and cysteine, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 1130-3
- [119] Görner H. and Nikogosyan D. N., Indirect 248 nm 20 ns photolysis of aliphatic amino acids in aqueous solution, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, 39, 84-9.
- [120] Birch D., Coyle J. D., Hill R. R., Jeffs G. E., Photoinduced Electron Transfer in Aliphatic Peptides, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 4, 293-5.
- [121] DMS, Documentation of Molecular Spectroscopy: UV Atlas of organic compounds, Butterworth, London, **1970**.
- [122] Hirayama K., Handbook of UV & visible absorption spectra of organic compounds, Plenum Press, **1967**.
- [123] Sadtler, Handbook of UV spectra, Heyden, London, **1979**.
- [124] Adam W., Haas W., Lohray B. B., Thianthrene 5-oxide as a mechanistic probe for assessing the electronic character of oxygen-transfer agents, *J. Am. Soc.* **1991**, 113, 6202-8.
- [125] Udilova N., Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen, Dissertation, Institut für Physik der Humboldt Universität Berlin, Berlin, **1999**.

- [126] Trevithick J. R. and Dzialoszynski T., A new technique for enhancing luminol luminescent detection of free radicals and reactive oxygen species, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, *33*, 1179-90.
- [127] Sanders S. A., Eisenthal R., Harrison R., NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 541-8.
- [128] Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A. F. , The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1499-503.
- [129] Barbieri F., Pattarozzi A., Gatti M., Porcile C., Bajetto A., Ferrari A., Culler M. D., Florio T., Somatostatin receptors 1, 2, and 5 cooperate in the somatostatin inhibition of C6 glioma cell proliferation in vitro, via a PTP{eta}-dependent inhibition of ERK1/2, *Endocrinology* **2008**, *149*, 4736-46.
- [130] Lazdunski M., Apamin, a neurotoxin specific for one class of Ca²⁺-dependent K⁺ channels, *Cell Calcium* **1983**, *4*, 421-8.
- [131] Jekel P. A., Weijer W. J., Beintema J. J., Use of endoproteinase Lys-C from *Lysobacter* enzymogenes in protein sequence analysis, *Anal. Biochem.* **1983**, *134*, 347-54.
- [132] Sun Y., Smith D. L., Identification of disulfide-containing peptides by performic acid oxidation and mass spectrometry, *Anal. Biochem.* **1988**, *172*, 130-8.
- [133] Curci R., Giovine A., Modena G., Oxidation of organic sulphides - XVI: Rate of alkaline and acidic oxidation of p-tolyl methyl sulphoside with substituted peroxybenzoic acids, *Tetrahedron* **1966**, *22*, 1235-9.
- [134] Ravikumar K. S., Zhang Y. M., Begue J.-P., Role of Hexafluoro-2-propanol in Selective Oxidation of Sulfide to Sulfoxide: Efficient Preparation of Glycosyl Sulfoxides, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2937-40.
- [135] Jeyakumar K., Chand D. K., Selective oxidation of sulfides to sulfoxides and sulfones at room temperature using H₂O₂ and a Mo(VI) salt as catalyst, *Tett. Lett.* **2006**, *47*, 4573-6.
- [136] Finehout E. J., Cantor J. R., Lee K. H., Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin, *Proteomics* **2005**, *5*, 2319-21.
- [137] Houmard J., Drapeau G.R., Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1972**, *69*, 3506-9.
- [138] Prileschajew N., Oxydation ungesättigter Verbindungen mittels organischer Super-oxyde, *Ber.* **1909**, *42*, 4811-5.

[139] Renz M., Meunier B., 100 Years of Baeyer-Villiger Oxidations, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1999, 737 - 50.

[140] Craig C. J., Purushothaman K. K., Improved preparation of tertiary amine N-oxides, *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 1721-2.

7.2 Nomenklatur der Peptidfragmentierung



7.3 Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	3-Letter-Code	1-Letter-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Axel G. Griesbeck betreut worden.

(Davor Turkovic)

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Davor Turkovic
Geburtsdatum: 19.05. 1982
Geburtsort: Nürnberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg:

09/1988 - 09/1992: Holzgarten-Grundschule, Nürnberg
10/1982 - 06/2001: Martin-Behaim-Gymnasium, Nürnberg
06/2001: Abitur; Abschlussnote: 1,9
10/2001 - 09/2004: Freie Universität Berlin; Diplom-Studiengang Chemie (6 Fachsemester)
10/2003: Vordiplom in Chemie; Freie Universität Berlin; Abschlussnote: 1,0
10/2004 - 02/2006: Universität zu Köln; Fortsetzung des Chemiestudiums; (3 Fachsemester); Studienschwerpunkt: Pharmakologie
02/2006 - 09/2006: Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln; Thema der Arbeit:
„Untersuchungen zur Spezifität von Dihydrorhodamin 123 bei der Oxidation mit reaktiven Sauerstoffspezies“
09/2006: Diplom in Chemie; Abschlussnote: 1,1
11/2006 - 07/2009: Promotion in organischer Chemie; Experimentelle Arbeiten durchgeführt bei A&M STABTEST, Bergheim