



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Massenspektrometrische Strukturaufklärung
cysteinreicher Peptide aus der Beere von
Sambucus nigra L. (Sambucaceae)

verfasst von

Anne Jilg

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl: A 449

Studienrichtung: Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin: Ao. Univ.-Prof. Sabine Glasl-Tazreite

Danksagung

Ich danke Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch und Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie und der ganzen Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme ins Team.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martin Zehl für die Vergabe des Themas und für die gute Betreuung und Anleitung während der Arbeit von der ich so vielseitig profitieren durfte.

Meinen Eltern Gabriele und Herbert Jilg möchte ich besonders für ihre Unterstützung und ihre wertvollen Hilfestellungen während meines gesamten Studiums danken.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
1.1	HOLUNDERBEEREN	5
1.1.1	HOLUNDERBEEREN IN DER PHYTOTHERAPIE	5
1.1.2	PHYTOCHEMIE DER HOLUNDERBEEREN	7
1.2	LC-MS ANALYTIK VON PEPTIDEN	9
1.2.1	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIE – HPLC)	10
1.2.2	MASSENSPEKTROMETRIE	11
1.2.2.1	Elektrosprayionisation (ESI)	12
1.2.2.2	Ionenfallen – Massenspektrometer	14
1.2.3	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE VON PEPTIDEN	18
1.3	ENZYMATISCHER VERDAU	25
1.3.1	STRATEGIE DER ENZYMATISCHEN FRAGMENTIERUNG	25
1.3.2	REDUKTION UND ALKYLIERUNG VON PEPTIDEN	26
1.4	VORKENNTNISSE AUS VORANGEGANGENEN DIPLOMARBEITEN UND ZIELSETZUNG	27
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	30
2.1	PFLANZENMATERIAL VON FRUCTUS SAMBUCI NIGRAE	30
2.2	PROBENEXTRAKTION	30
2.2.1	PROBENEXTRAKTION FÜR MS-EXPERIMENTE	30
2.2.2	PROBENEXTRAKTION FÜR HITZESTABILITÄTSTEST	31
2.3	FESTPHASENEXTRAKTION (SPE) DER EXTRAKTE AUS FRUCTUS SAMBUCI NIGRAE	31
2.4	SYSTEMATISCHE BENENNUNG DER FRAKTIONEN	33
2.5	SPALTUNG DER PEPTIDINTERNEN CYSTEINBRÜCKEN – REDUKTION UND ALKYLIERUNG	34
2.6	FESTPHASENEXTRAKTION (SPE) ZUR AUFREINIGUNG DER ALKYLIIERTEN PEPTIDE	35
2.7	ENZYMVERDAU	36
2.8	LC-MS METHODEN	37
2.8.1	HPLC METHODEN	37
2.8.2	MS-METHODE	39
3	<u>ERGEBNISSE</u>	41
3.1	VOREXPERIMENTE FÜR DIE BIOLOGISCHE TESTUNG DER PEPTIDE	41
3.1.1	LÖSLICHKEIT	41

3.1.2	HITZESTABILITÄT	43
3.2	SEQUENZIERUNG DER PEPTIDE	44
3.2.1	FRAKTIONIERUNG DER PEPTIDE MITTELS FESTPHASENEXTRAKTION	44
3.2.2	FSN_35.3.	45
3.2.2.1	Enzymatischer Verdau	46
3.2.2.2	Sequenzierung der Peptide P2 und P3	49
3.2.2.3	Interpretation weiterer Spektren	56
3.2.3	FSN_39.2.	57
3.2.3.1	Enzymatischer Verdau	58
3.2.3.2	Sequenzierung des Peptids P4	60
3.2.4	FSN_31.4.	65
3.2.4.1	Enzymatischer Verdau	68
3.2.4.2	Sequenzierung des Peptids P1	71
3.2.5	FSN_39.4.-43.4.	80
3.2.5.1	Enzymatischer Verdau	82
3.2.5.2	Interpretation der MS-Spektren	88
4	DISKUSSION	95
4.1	AMINOSÄURESEQUENZEN DER IDENTIFIZIERTEN PEPTIDE IM VERGLEICH	95
4.2	ANTIVIRALE WIRKUNG	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	ABSTRACT	102
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	103
8	LITERATURVERZEICHNIS	104
9	CURRICULUM VITAE	109
10	ANHANG	110

1 Einleitung

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit den Beeren des schwarzen Holunders (*Sambucus nigra* L., Sambucaceae) und ist ein Folgeprojekt zweier vorrangegangener Diplomarbeiten, in welchen verschiedenste in der traditionellen Medizin genutzten Pflanzen und Pflanzenteile auf ihren Peptidgehalt getestet und Aufreinigungsmethoden für ausgewählte Pflanzenpeptide etabliert wurden (Semper, 2012; Hellmayr, 2012). Mittels LC-MS („liquid chromatography – mass spectrometry“) soll die Primärstruktur der Hauptpeptide aufgeklärt werden.

1.1 Holunderbeeren

Nach der Exkursionsflora für Österreich, Lichtenstein und Südtirol (Fischer et al., 2008) gehört der Schwarze Holunder (*Sambucus nigra* L.) der Familie der Sambucaceae und der Gattung *Sambucus* an (Wenigmann, 1999). Es finden sich jedoch auch Taxonomien in welchen *Sambucus nigra* der Familie der Caprifoliaceae oder der Adoxaceae zugeordnet wird. Charakteristisch ist der buschartige Wuchs des Baumes, so wie die doldenförmigen Blütenstände mit kleinen weiß-gelblichen fünfzähligen Blüten, die einen unverwechselbaren Geruch verströmen und zu schwarz-violett schimmernden Steinfrüchten heranreifen (siehe Abbildung 1, S.6). Diese gemeinhin als Beeren bezeichneten Früchte sind im botanischen Sinne sogenannte Steinbeeren und zählen zu den Steinfrüchten (Fischer et al., 2008).

1.1.1 Holunderbeeren in der Phytotherapie

Sowohl die Blüten als auch die Beeren des schwarzen Holunders werden schon lange in der mitteleuropäischen Volksmedizin bei Fieber und Erkältungen eingesetzt.

Ebenso sind sie fester Bestandteil der traditionellen einheimischen Küche, in der sowohl die Blüten in Form von Sirup und Gebäck als auch die Beeren als Saft oder auch Suppe zubereitet werden. Die Hitzebehandlung der Beeren vor dem Verzehr ist hierbei zu beachten, da es sonst zu Übelkeit und Erbrechen kommen kann. Diese heftige Reaktion lässt sich nur bedingt auf die im Samen enthaltenen Blausäureglykoside zurückführen,

vielmehr vermutet man die Ursache in noch unbekanntenen Inhaltsstoffen (Vlachoianis et al., 2010).



Abbildung 1: Darstellung von *Sambucus nigra* aus Atlas des plantes de France (aus Masclef, 1891).

Bereits in der Antike wurde *Sambucus nigra* als Diuretikum und Laxans eingesetzt. Die Blätter wurden zur besseren Heilung bei kleinen Verletzungen und Blutergüssen als Umschläge verwendet. Als Teezubereitung wird die Blüte wegen ihrer schweißtreibenden Wirkung bei fiebrigen Erkrankungen angewendet, und sie ist auch der einzige Pflanzenteil der officinell ist. Aber auch die Beere des schwarzen Holunders wird schon lange volksmedizinisch, wohl auch wegen ihres hohen Vitamin C Gehaltes, bei grippalen Infekten eingesetzt (Hemgesberg, 1998). Wie aus Studien hervorgeht, ist die Wirkung allerdings nicht nur auf den hohen Vitamingehalt zurückzuführen. Vielmehr zeigt der Extrakt der Holunderbeere auch eine immunstimulierende und antivirale Wirkung (Atkinson und Atkinson, 2002; Barak et al., 2001; Vlachoianis et al., 2010; Zakay-Rones et al., 2004).

1.1.2 Phytochemie der Holunderbeeren

Trotz des vielfältigen Einsatzes der Holunderbeeren in der traditionellen europäischen Medizin, wurden sie bislang – wohl aus Mangel an klinischen Studien – nicht monographiert. Nur Sambuci flos, der Blüte des schwarzen Holunders, wurde Ende des letzten Jahrhunderts eine Monographie im Europäischen Arzneibuch gewidmet (Blumenthal, 1998). Allerdings gibt es auch deutliche Hinweise auf die Wirksamkeit der Holunderbeeren.

Bioaktive Komponenten, die in Holunderbeeren identifiziert wurden, sind Flavonoide wie Hyperosid, Isoquercitrin und Rutosid, Anthocyane wie Chrysanthemmin (Cyanidin-3-O-glukosid), Cyanidin-3,5-di-O-glukosid, Cyanidin-3-O-sambubiosid, Sambucin (Cyanidin-3-O-rhamnoglucosid), Sambucyanin (Cyanidin-3-O-xyloglukosid), aber auch Spuren von ätherischem Öl. Die frische Beere enthält wichtige Vitamine wie Vitamin-B₂ und C, Folsäure, Biotin, Nicotinsäureamid, β -Carotin, Vitamin B₆ und Pantothersäure (Anonym, 1994). Im Rahmen eines Screenings konnte eine hohe Konzentration an cysteinreichen Abwehrpeptiden in Holunderbeeren nachgewiesen werden (Semper, 2012).

In-vitro Experimente zeigten, dass die Frucht des Holunders antioxidative, antivirale, anti-*Helicobacter pylori*-, und antiinflammatorische Effekte aufweist, allerdings sind diese Daten noch nicht zuverlässig bestätigt (Vlachojannis et al., 2010). Es konnte festgestellt werden, dass alle Fraktionen, die mit einer toxischen Wirkung in Verbindung gebracht wurden, Lektine (Anonym, 1994) und cyanogene Glykoside wie Sambunigrin enthielten. Die cyanogenen Glykoside werden im gastrointestinalen Trakt zu freiem Cyanid hydrolysiert. Ein allergisches Potenzial des Lektins Ribosom-inaktivierendes Protein konnte in einer Studie an 3668 Patienten (1% positiv) festgestellt werden. Typ-2-Ribosom-inaktivierendes Protein ist das Hauptprotein in Fructus Sambuci nigrae. Lektine wie Agglutinin aus *Sambucus nigra* induzieren die Freisetzung von IL-4, IL-13 und Histamin aus menschlichen basophilen Granulozyten (Haas et al., 1999). Die toxischen und allergenen Lektine scheinen eine Rolle bei der antiviralen (Chen et al., 2002; Vandenbussche et al., 2004) und antiproliferierenden Aktivität (Citores et al., 2002) von Fructus Sambuci nigrae zu spielen. Es fehlt bislang jedoch ein ausreichend gutes Verständnis sowohl der antiviralen als auch der allergenen Wirkung, um das therapeutische Potential beurteilen zu können (Vlachojannis et al., 2010).

Anthocyane sind verantwortlich für die tief schwarz-blaue Farbe der Holunderbeere und gehören zu den wichtigsten wasserlöslichen Pigmenten der Pflanzen. Ungefähr 14 verschiedene Anthocyane wurden in der Holunderbeere nachgewiesen. Cyanidin-3-glykoside haben dabei das höchste antioxidative Potential – ca. 3,5 mal höher als Vitamin E Analoga – und sind maßgeblich beteiligt an bzw. verantwortlich für die antioxidative Wirkung der Beeren (Wang et al., 1997).

In einer Studie mit dem sprühgetrockneten Saft der Beere konnte eine Verminderung der Oxidation von LDL (low density lipoprotein) gezeigt werden, die auf die antioxidative Wirkung der Anthocyane zurückgeführt wurde. Der sprühgetrocknete Saft könnte somit einen potentiellen Schutz vor Atherosklerose und damit assoziierten Erkrankungen darstellen. Allerdings konnte dieser Effekt in einer nachfolgenden klinischen Studie in vivo nicht bestätigt werden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, dass die Glukoseaufnahme in Muskelzellen, sowie die Insulinausschüttung durch das wässrige Extrakt von Holunderblüten erhöht wird (Atkinson und Atkinson, 2002; Vlachoianis et al., 2010).

In in-vitro Versuchen mit Sambucol[®]¹ konnte eine erhöhte Cytokinproduktion in Monozyten, besonders von TNF- α , dessen Konzentration bis um ein 45-faches anstieg, erzielt werden. TNF- α ist ein Mediator der zellulären Immunantwort, der bei lokalen und systemischen Entzündungsprozessen eine wichtige regulatorische Rolle spielt. TNF- α kann sowohl die Ausschüttung anderer Zytokine in Immunzellen anregen, so wie deren Proliferation und Differenzierung. Er kann aber auch Rezeptor-vermittelt die Apoptose in Zellen einleiten (Barak et al., 2001). Eine externe Stimulation könnte besonders bei PatientInnen mit einem geschwächten Immunsystem, wie bei einer Chemotherapie oder bei HIV-Infektionen, zum Einsatz kommen (Barak et al., 2001).

Des Weiteren konnte in Versuchen an verschiedenen Virus Stämmen, wie z.B. H1N1, eine reproduktionshemmende Wirkung nachgewiesen werden (Vlachoianis et al., 2010). In einer Patientenstudie mit Influenza-A- oder B-erkrankten Versuchspersonen, die mit Sambucol[®] behandelt wurden, konnte Symptomfreiheit bereits nach vier Tagen mit Therapie erzielt werden, ohne Behandlung erst nach acht Tagen (siehe Abbildung 2, S.9), (Zakay-Rones et al., 2004).

¹ Sambucol[®] ist ein Nahrungsergänzungsmittel, welches ein Extrakt der schwarzen Holunderbeere enthält.

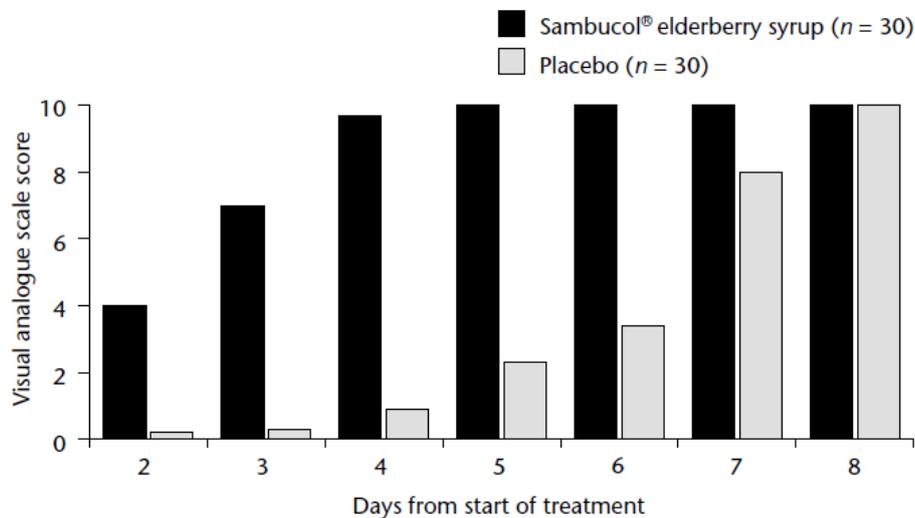


Abbildung 2: Statistische Darstellung der Studienergebnisse von einer Studie mit Sambucol® an Influenza infizierten Patienten. Der auf der y-Achse aufgetragene Visual analogue scale score ist ein Maß für das subjektive Wohlbefinden seitens der Patienten, wobei 10 Beschwerdefreiheit beschreibt. Auf der x-Achse sind die Tage bis zur vollständigen subjektiven Beschwerdefreiheit der Patienten aufgetragen mit Sambucol® - bzw. Placebothherapie (aus Zakay-Rones et al., 2004).

Eine in *Sambucus nigra* ebenfalls enthaltene Substanzklasse sind extrazelluläre cysteinreiche Peptide, welchen in anderen Pflanzen und Organismen eine Abwehrfunktion gegen Pathogene wie Pilze, Bakterien und Viren zukommt (Farrokhi et al., 2008; vgl. Hellmayr, 2012). Auch diese Substanzklasse könnte potenziell mitverantwortlich für die antivirale Wirkung der Holunderbeere sein. Sie stellt das zentrale Thema der vorliegenden Diplomarbeit dar (siehe Kap. 1.4, S.27).

1.2 LC-MS Analytik von Peptiden

„Liquid chromatography – mass spectrometry“ ist ein gekoppeltes Verfahren aus Flüssigchromatographie – meist HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) – zur Auftrennung und Massenspektrometrie zur Detektion der Komponenten der zu analysierenden Probe.

1.2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatographie – HPLC)

Die HPLC ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren, das zur Trennung von Substanzgemischen aber auch zur Identifizierung und Quantifizierung von Substanzen verwendet wird. Die Trennleistung einer HPLC basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der Probenkomponenten zwischen einer flüssigen und einer festen Phase. Hierfür wird die zu analysierende Probe über eine mobile Phase in die Trennsäule – welche die stationäre Phase enthält – eingebracht.

Es wird zwischen verschiedenen Trennprinzipien unterschieden: Normalphasen- (NP) bzw. Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC), Umkehrphasen- (RP), Ionenaustausch- (IEC) und Größenausschlusschromatographie (SEC) sowie Enantiomerentrennung. Je nach Prinzip wirken unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und Probenkomponenten. Die Stärke der Wechselwirkungen bestimmt die Stärke der Adsorption. Die Retentionszeit bei der eine Substanz des Analysats eluiert wird, ist abhängig von der jeweiligen Adsorption der Substanz an der stationären Phase und der Elutionskraft der mobilen Phase.

In der Bioanalytik ist zur Auftrennung bzw. Aufreinigung und Isolierung von Substanzen die Flüssigchromatographie eine der am häufigsten angewandten Methoden. Da sich Peptide in ihrer Größe, Form, Ladung und Polarität bzw. biologischer Affinität meist unterscheiden, können diese unterschiedlichen Eigenschaften zur chromatographischen Trennungen herangezogen werden (Kastner, 2000).

Bei der Umkehrphasenchromatographie oder Reversed-Phase Chromatography (RPC), die im Rahmen der Diplomarbeit angewendet wurde, wirken hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der unpolaren stationären Phase. Als apolare Komponente der mobilen Phase wird aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften bei RPC Acetonitril bevorzugt verwendet. Als polare Komponente wird meist Wasser eingesetzt.

Das stationäre Phasenmaterial besteht meist aus alkyliertem Kieselgel oder aus hydrophoben organischen Polymeren. Der mobilen Phase werden häufig polare Säuren wie Phosphorsäure oder Ameisensäure zugesetzt, um sekundäre Wechselwirkungen der Analysensubstanzen mit den Restsilanolgruppen der Kieselgel-basierten stationären

Phase zu vermeiden (Thevenon und Regnier, 1989). Die Retention der Analyten unter diesen Bedingungen basiert auf solvophoben Wechselwirkungen (Horvath et al., 1976; vgl. Vatansever, 2007).

Zur optimalen Auftrennung der Probe wird die Zusammensetzung und somit die Polarität der mobilen Phase im zeitlichen Verlauf häufig graduell verändert. Je nach Polarität und Stärke der Wechselwirkungen werden die Substanzen bei definierter Polarität der mobilen Phase eluiert. Dieser Gradient und auch die Dauer einer HPLC-Methode müssen individuell an eine Probe angepasst werden, um eine optimale Trennleistung zu gewährleisten. Ist die mobile Phase, wie in dieser Arbeit, ein Gemisch aus 0,1%-iger Ameisensäure und Acetonitril, wird deren Mischungsverhältnis im Rahmen eines HPLC-Laufes graduell zugunsten des apolareren Acetonitrils verändert. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit angewendete Methode wurde bereits von Birgit Semper in einer vorangegangenen Arbeit etabliert (Semper, 2012).

1.2.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Analyseverfahren zur Messung von molekularen Massen gasförmiger Ionen. Es ist ein sehr empfindliches Verfahren, welches Informationen über das Molekulargewicht und das Fragmentierungsverhalten der Analyten liefert. Die Massenspektrometrie wird zur Identifizierung oder Quantifizierung von bekannten Substanzen auch in komplexen Gemischen und zur Strukturanalyse unbekannter Substanzen eingesetzt.

Ein Massenspektrometer ist aus den drei Grundkomponenten aufgebaut: Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor. Die einzelnen Komponenten können jedoch auf verschiedenen Methodiken basieren. Abhängig von der Ionenquelle wird die Probe im gasförmigen, flüssigen oder festen Zustand eingebracht. Flüssigkeiten oder Feststoffe werden vor oder bei Ionisierung ebenfalls in die Gasphase übergeführt. Die Ionen werden dann nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) im Massenanalysator aufgetrennt und anschließend detektiert.

In der Peptid- und Proteinanalytik wird meist in Lösung gearbeitet. Die häufigsten verwendeten Ionisationsmethoden sind hierbei die Elektrosprayionisation (ESI) und die

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

Im Folgenden wird allerdings nur auf die verwendeten Techniken der Elektrosprayionisation als Ionisierungsverfahren und auf die Ionenfalle als Massenanalysator eingegangen. Als Detektor wurde ein Daly-Detektor verwendet.

1.2.2.1 Elektrosprayionisation (ESI)

Die Elektrosprayionisation ist ein sehr schonendes Ionisationsverfahren, das Anfang der 70er Jahre von Dole et al. entwickelt wurde (Dole et al., 1968a; Dole et al., 1968b; Mack et al., 1970), aber erst seit Mitte der 80er in der Massenspektrometrie eingesetzt wird (Yamashita und Fenn, 1984a; Yamashita und Fenn, 1984b; Alexandrov et al., 1984).

In der Bioanalytik wird ESI bevorzugt eingesetzt, da es die beste Ionisationsleistung für große und polare Moleküle in Lösungen zeigt. Der große Vorteil dabei ist, dass sie dadurch direkt mit HPLC-Systemen bzw. flüssigchromatographischen Methoden gekoppelt werden kann, welche eben in diesem Feld große Anwendung finden (Vatansever, 2007).

Die Probe sollte in einem Lösungsmittel gelöst sein, welches sowohl polar als auch gut verdampfbar ist. Dafür werden meist Lösungsmittelgemische aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, wie Acetonitril verwendet. Die gelöste Probe wird über eine Kapillare geleitet, zwischen deren Ende und dem Eingang zum Massenspektrometer ein starkes elektrisches Feld angelegt ist (meist 1-5 kV). Durch den Einfluss des elektrischen Feldes wandern Ionen elektrophoretisch zur Gegenelektrode und bilden an der Kapillarspitze den so genannte Taylor-Kegel. Die Probenflüssigkeit dringt durch den HPLC-Strom und das elektrische Feld aus der Kapillarspitze (siehe Abbildung 3, S.13) und wird unter Einfluss des elektrischen Feldes und eines an der Außenseite der Kapillare vorbei strömenden inerten Gases (meist N₂) zu einem Nebel kleiner geladener Tröpfchen versprüht (siehe Abbildung 4, S.13), (Schmelzer, 2007).

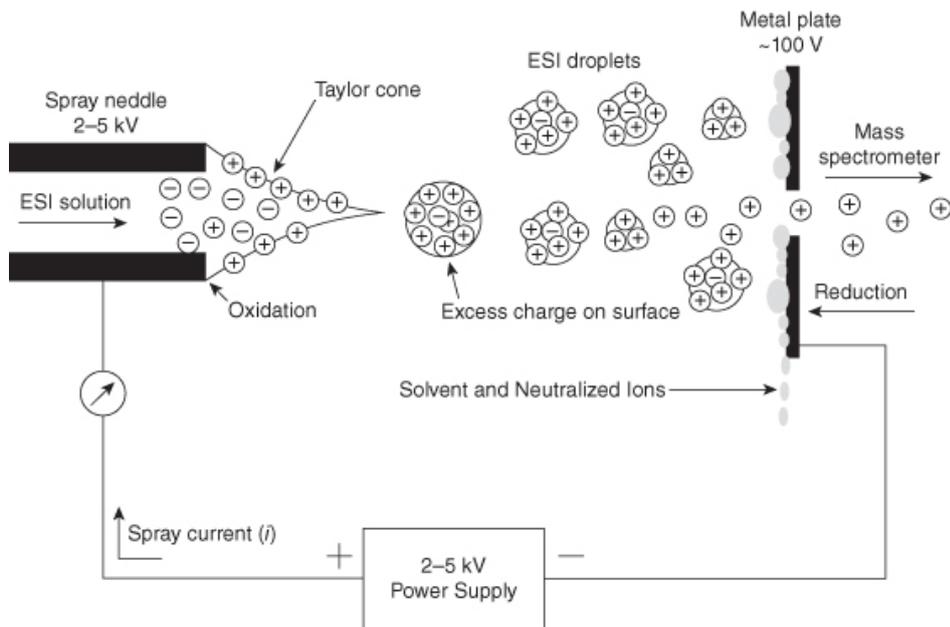


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Vernebelung und Ionenbildung nach dem Ion Evaporation Model (adaptiert von Kebarle und Tang, 1993).

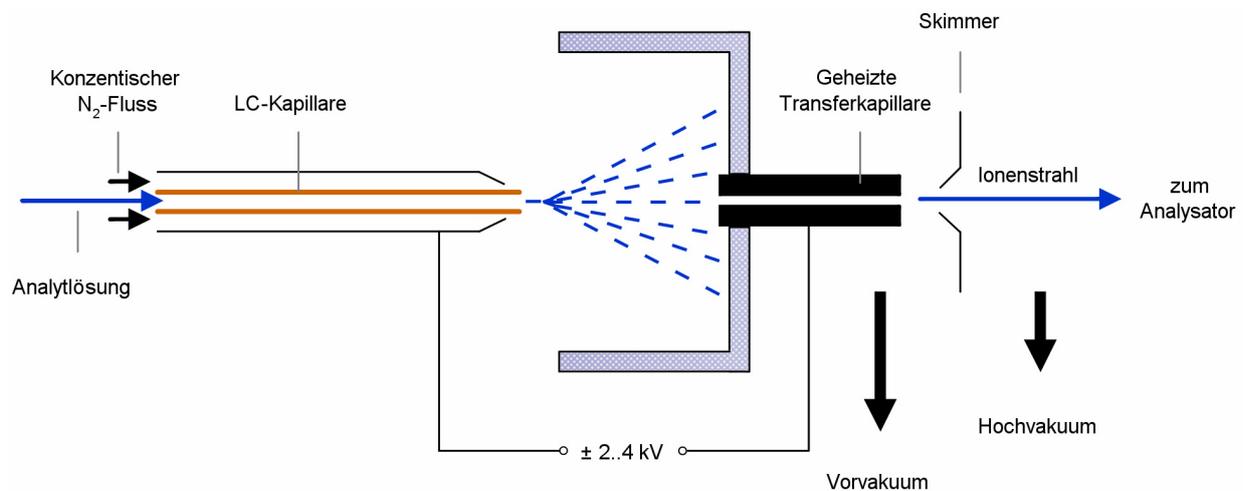


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Elektrosprayquelle (aus Schmelzer, 2007).

Die Ladungsdichte an der Oberfläche der geladenen Tröpfchen nimmt mit Verdampfen des Lösungsmittels kontinuierlich zu, bis sich ein Überschuss gegenseitig abstoßender, gleichartig geladener Ionen an der Oberfläche befindet. Der Abstoßungseffekt aufgrund der stetig zunehmenden Ladungsdichte führt zu einer explosionsartigen Zerstäubung der Flüssigkeitstropfen (Coulomb-Explosionen), (Schmelzer, 2007). Dieser Vorgang wiederholt sich unter Abnahme der Tropfengröße so lange, bis sämtliches

Lösungsmittel verdampft ist und desolvatisierte, geladene Analytmoleküle zur massenspektrometrischen Analyse vorliegen (siehe Abbildung 3, S.13). Der genaue Ionisationsprozess ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es existieren verschiedene Modelle, wie das Charged Residue Modell, das von kleinsten Tropfen ausgeht, die nur noch ein geladenes Molekül enthalten (Mack, 1970). Ein weiteres Modell, das Ionenemissionsmodell von Iribarne und Thomson, postuliert, dass bereits bei einem größeren Tropfenvolumen Ionen in die Gasphase übergehen. Die Solvatationsenergie der Analytmoleküle kann hier aufgrund der starken Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche überwunden werden. Dies ermöglicht, dass die geladenen Analytmoleküle als freie Ionen in die Gasphase übergehen (Iribarne und Thomson, 1976; Kebarle und Tang, 1993).

Organische Moleküle sind häufig protonierbare und/oder deprotonierbare Strukturen, abhängig von ihrem pK_b bzw. pK_a . Basen lassen sich am besten im Positiv-Modus und Säuren im Negativ-Modus messen. Abhängig von der Polarität der angelegten Spannung entstehen dabei sogenannte $[M+H]^+$ - bzw. $[M-H]^-$ -Quasimolekül-Ionen. Die Bildung von Adduktionen (z.B. $[M+Na]^+$) und mehrfachgeladenen Ionen (z.B. $[M+nH]^{n+}$) bei größeren Molekülen sind ebenfalls typische Produkte, die bei ESI entstehen können (Schmelzer, 2007).

1.2.2.2 Ionenfallen – Massenspektrometer

Die Massenspektrometrie ist, wie oben bereits erwähnt, ein Verfahren zur Bestimmung der Molekülmasse. Über ein Ionisationsverfahren, wie oben beschrieben, werden die Analyten ionisiert und die geladenen Moleküle mittels eines elektrischen oder magnetischen Feldes beschleunigt. Die Auftrennung der Ionen erfolgt in einem Massenanalysator. Die gasförmigen Analytionen werden im Vakuum durch ein statisches elektrisches Feld beschleunigt und über ein System von elektrischen und dynamischen Linsen fokussiert (Vatansever, 2007).

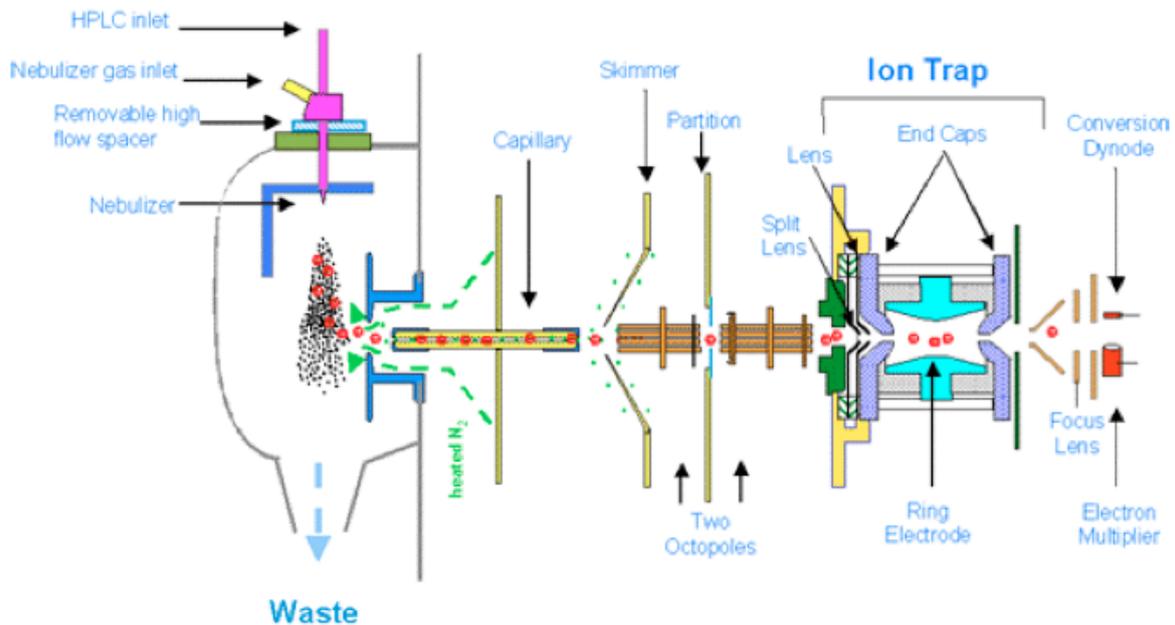


Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer Ionenfalle (aus Bruker Daltonics, 2008).

Im Quadrupol werden die Ionen im Wechselfeld, das zwischen vier parallel angeordneten Stabelektroden angelegt wird, nach m/z selektiert, so dass nur Ionen mit einem definiertem m/z -Verhältnis das Feld überwinden können. In dieser Arbeit wurde ESI in Verbindung mit einer Quadrupol-Ionenfalle eingesetzt (siehe Abbildung 5).

Die Ionenfalle basiert auf der theoretischen Grundlage des Quadrupol-Massenfilters. Hierbei werden Ionen in einem Quadrupolfeld, das durch Endkappenelektroden und Ringelektrode erzeugt wird, gefangen gehalten. Im Gegensatz zu anderen Massenspektrometern wie Quadrupol-MS und Sektorfeld-MS arbeitet die Ionenfalle diskontinuierlich. Die Ionisation läuft hierbei kontinuierlich ab; der Analysator arbeitet jedoch diskontinuierlich.

Abhängig von der Art des einwirkendes Feldes können Ionen von nur einem bestimmten m/z -Wert entweder selektiv in der Ionenfalle zurückgehalten werden, oder aber Ionen eines stabilisierten m/z -Bereiches verbleiben dort und durch eine geeignete Veränderung der Felder verlassen nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert die Falle. Die Ionenfalle kann nicht das gesamte Spektrum an m/z -Werten erfassen, sondern nur Ionen in einem bestimmte m/z -Bereich stabilisieren (Bruker Daltonics, 2008).

Die Analyten werden nach der Ionisation und Desolvatation mittels eines Linsensystems fokussiert. Beim Eintritt der Ionen in die Falle liegt an der Ringelektrode eine variable Hochfrequenzspannung an. Die Endkappenelektroden sind geerdet. Um die kinetische

Energie der eintretenden Ionen abzufangen und diese in der Falle leichter einzufangen, wird die Falle mit Heliumgas mit 10^{-5} mbar gefüllt. Die eingefangenen Ionen zirkulieren dort in stabilen dreidimensionalen Bahnen in einem Quadrupolfeld. Zur Detektion wird an den Endkappenelektroden eine zusätzliche Resonanz-Hochfrequenz-Wechselspannung angelegt. Durch eine gezielte Veränderung der Amplitude werden die Analytionen abhängig vom m/z -Verhältnis destabilisiert, über das Feld beschleunigt und gelangen so über eine Öffnung in den Detektor.

In einem Messzyklus werden jeweils für wenige Millisekunden Ionen in der Falle angereichert. Anschließend wird durch Änderung des anliegenden Potentials der Eintritt weiterer Ionen verhindert. Einerseits um eine zu hohe Ladungsdichte in der Falle zu vermeiden, da dies zur gegenseitigen Abstoßung der Ionen und so zu einer Beeinträchtigung der Messergebnisse führen würde. Andererseits wird auf diese Weise das Eintreten nachfolgender Ionen während eines laufenden MS-Experiments verhindert. Anschließend folgt die Detektion.

Wie oben bereits kurz beschrieben, werden über die Veränderung der an der Ringelektrode und den Endkappen anliegenden Wechsel- und Gleichspannung die stabilen dreidimensionalen Bahnen der Ionen durch Resonanzanregung destabilisiert und die Ionen mit steigendem m/z -Verhältnis aus der Falle geschleudert. Dort werden sie über einen Detektor nachgewiesen. Bei dem hier verwendeten Detektor handelt es sich um einen Daly-Detektor. Die beschleunigten Ionen treffen hierbei auf einen Metallknopf, aus welchem dabei Sekundärelektronen gelöst werden. Diese werden wiederum durch das Auftreffen auf einem Phosphorschirm in ein Photonensignal umgewandelt. Über einen Photoelektronenvervielfacher wird dieses schlussendlich in ein elektronisches Signal transformiert, welches von einem Computer in einem Massenspektrum dargestellt werden kann. Dadurch, dass die Signalübertragung über ein Lichtsignal funktioniert, kann der Photoelektronenvervielfacher durch eine Glasplatte vom Rest des Detektors, der sich im Hochvakuumbereich befindet, getrennt werden. Diese schützt den Photoelektronenvervielfacher vor Kontamination durch Analyten.

Ein großer Vorteil der Ionenfalle ist die Möglichkeit MS^n -Experimente durchführen zu können, die in ihrer Anzahl (n) lediglich von der mit jeder Stufe abnehmenden Signalintensität beschränkt sind (Vatansever, 2007; Lohninger et al., 2010; Pfeiffer Vakuum GmbH, 2005).

Bei Mehrstufen (MS^n)-Experimenten werden gezielt intakte bzw. bereits Fragmentionen eines definierten m/z -Werts zur weiteren Fragmentierung bestimmt. Dafür werden zunächst die zu analysierenden Ionen isoliert. Dies wird, wie beschrieben, durch Anlegen einer Hochfrequenz-Wechselspannung an den Endkappen durchgeführt, wodurch ein zusätzliches dipolares Feld erzeugt wird. Im Endeffekt werden alle, bis auf das zu isolierende Ion, destabilisiert. Die isolierten Ionen werden in der Falle mit inerten Heliumatomen zur Kollision gebracht. Durch die Kollision kommt es zu einer Umwandlung der kinetischen Energie der Moleküle in innere Energie. Dabei wird solange innere Energie aufgebaut, bis die schwächsten Bindungen der Analytmoleküle brechen und Fragmentionen entstehen, von denen nun wiederum selektiv ein Fragment mit einem bestimmten m/z -Wert zur weiteren Fragmentierung isoliert und angeregt werden kann. Dieses Verfahren kann wiederholt werden, so lang das gewählte Fragment eine genügend hohe Konzentration aufweist. Dabei spricht man von Mehrstufen- oder MS^n -Experimenten (Abbildung 6).

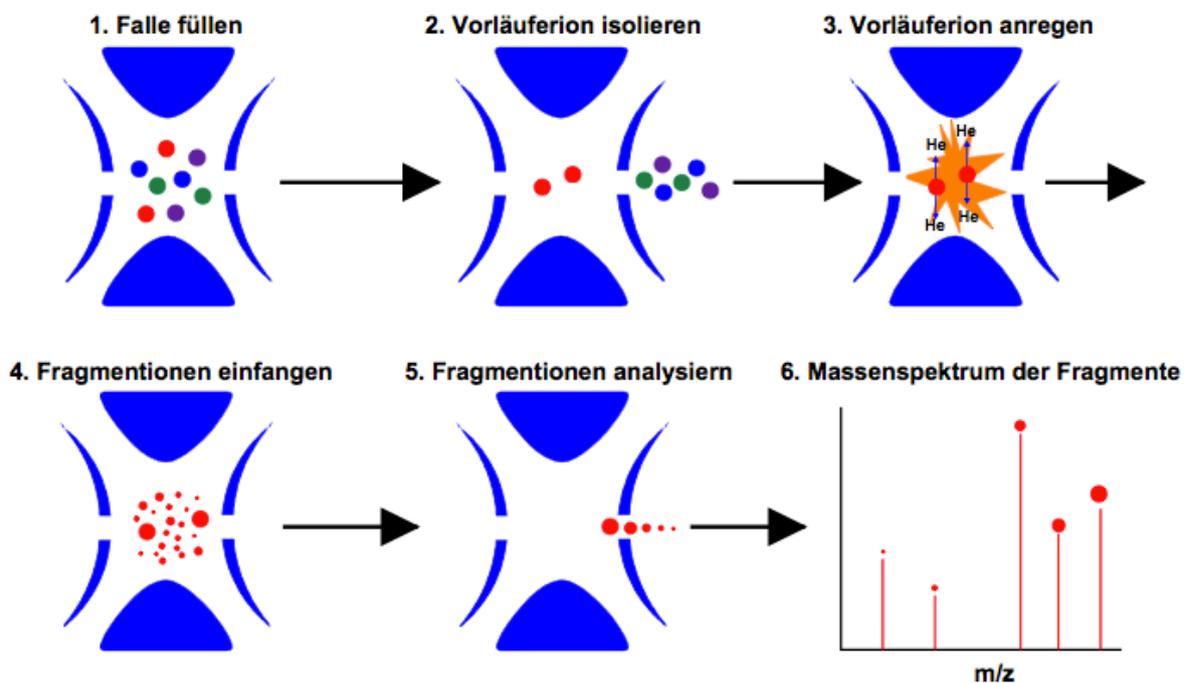


Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Erzeugung von Fragmentionen mittels eines Ionenfallen-Massenspektrometers (aus Vatansever, 2007).

Diese MS^n -Experimente werden dann durchgeführt, wenn die Aussagekraft des Fragmentionenspektrums des ersten Fragmentierungsschritts ungenügend ist. Bei der Analyse von Peptiden kommt es bei Fragmentierungsexperimenten hauptsächlich zu

Brüchen der Peptidbindungen, wobei verschiedene Fragmentationen entstehen können (siehe Kap. 1.2.3, S.18).

In der Bioanalytik handelt es sich meist um kohlenstoffreiche Analytmoleküle. Massenspektren kohlenstoffreicher Substanzen, wie von Proteinen und Peptiden, weisen aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung des Kohlenstoffes mehrere Signale für das gleiche Molekül auf. Dadurch wird eine Substanz nicht nur durch einen definierten Massenpeak im MS-Spektrum, sondern durch mehrere Massenpeaks, dargestellt. Da die Isotopenwahrscheinlichkeit pro Kohlenstoffatom für ^{13}C 1,11 % ist, steigt die Wahrscheinlichkeit für ein ^{13}C im gesamten Molekül mit jedem weiteren C-Atom bzw. mit der Größe des Moleküls (Lehmann, 2010). Durch den Einbau eines ^{13}C in das Molekül nimmt das Molekulargewicht um 1 Da zu. Es besteht allerdings auch die Wahrscheinlichkeit, dass mehr als ein ^{13}C eingebaut wird, wodurch sich das charakteristische Isotopenmuster von Peptiden ergibt (siehe Abbildung 7), die besonders kohlenstoffreiche Biomoleküle sind (Budzikiewicz und Schäfer, 2005).

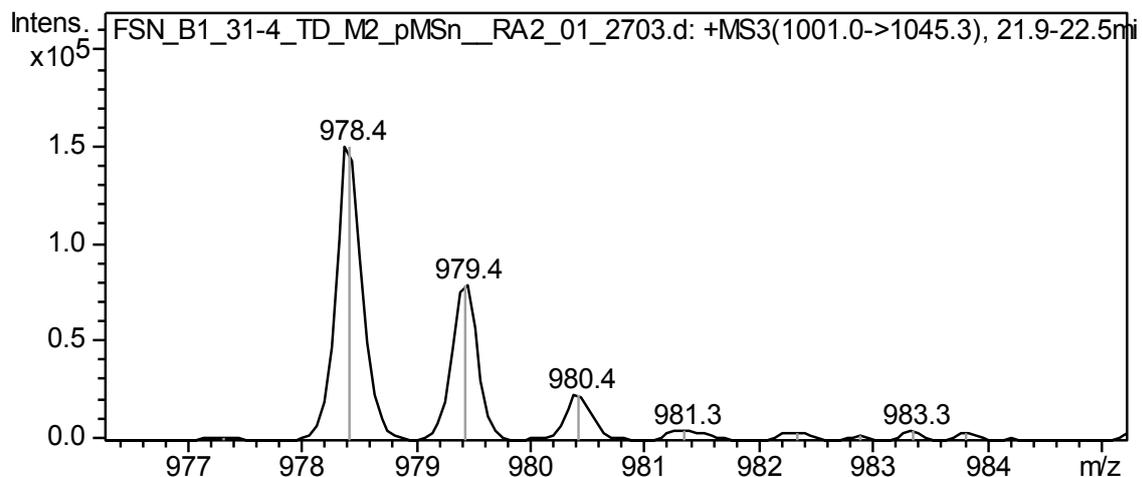


Abbildung 7: Darstellung der Isotopenverteilung anhand des Massenpeaks von m/z 1001,0->1045,3.

1.2.3 Massenspektrometrische Analyse von Peptiden

Zur Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen und Peptiden wird in der Bioanalytik häufig der Peptidmassen-Fingerprint (PMF) eingesetzt. Dabei werden Proteine bzw. Peptide mit spezifischen Endopeptidasen, wie Trypsin und Pepsin, gespalten. Diese Enzyme besitzen eine relativ spezifische proteolytische Aktivität, so

dass protein- bzw. peptidspezifische Verdauprodukte entstehen. Das Massenspektrum der Verdauprodukte weist ein spezifisches Muster auf: den Peptidmassen-Fingerprint. Dadurch kann im Abgleich mit Datenbanken ein Protein bzw. Peptid identifiziert werden – vorausgesetzt es ist bekannt. Ist dies nicht der Fall, so liefert der PMF keine ausreichenden Informationen zur Charakterisierung oder Identifizierung des Peptids.

Gezielte Fragmentierungsexperimente (MS²-Experimente) mit einzelnen Verdauprodukten und weitere Experimente (MS³-Experimente) mit den aus den Verdauprodukten entstandenen Fragmenten können jedoch Aufschluss über deren Primärstruktur geben. Fragmentierungsexperimente sind deshalb in der Peptidanalytik von besonderer Bedeutung.

Um ein aussagekräftiges Massenspektrum mit einer Ionenfalle zu erhalten, darf das zu analysierende Molekül eine gewisse Größe nicht übersteigen, da zu viele Massenpeaks die Zuordnung der einzelnen Peaks schwierig gestalten.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde der enzymatische Verdau genutzt, um das intakte Peptid in kürzere Peptidketten zu spalten, die mittels LC-MS sequenziert und anschließend über die definierten Schnittstellen, an denen die Enzyme angreifen, rechnerisch wieder zusammengesetzt werden konnten. Zur Absicherung der Schnittstellen wurden dafür zwei identische Proben, wie in Kap. 1.3, S.25, erwähnt, mit zwei unterschiedlichen Enzymen parallel verdaut und die gewonnen Informationen abgeglichen.

Auf diese Weise lässt sich die Aminosäuresequenz des intakten Peptids aus den Spektren der Verdauprodukte (Spaltpeptide) rekonstruieren. Die Vorgehensweise bei der Sequenzierung wird im Folgenden näher erklärt.

Peptide fragmentieren hauptsächlich an ihren Peptidbindungen entlang des Peptidrückgrats. Die möglichen dabei entstehenden Fragmente sind in Abbildung 8, S.20, dargestellt.

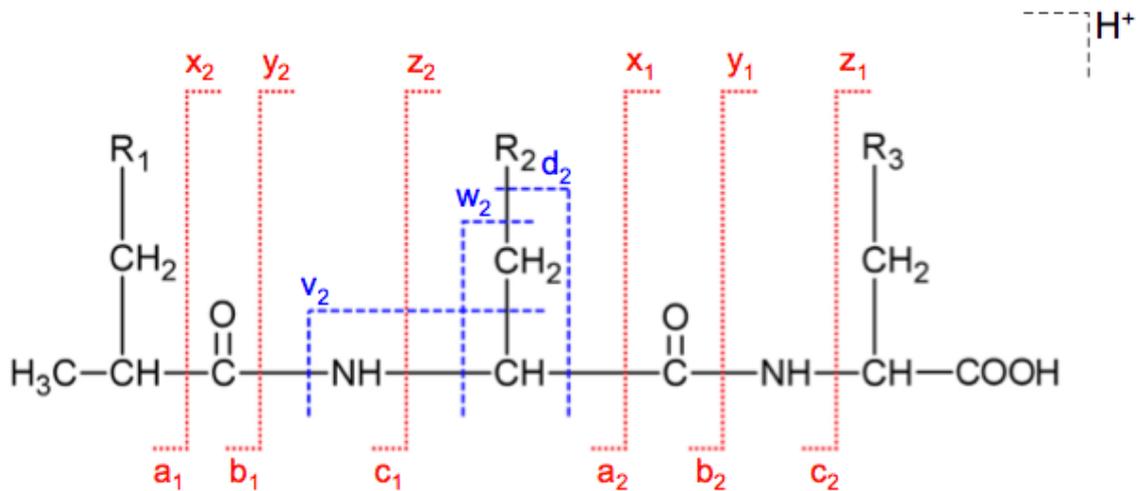


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bildung von Fragmenten eines Tripeptids – Bei der Fragmentierung entstehen vom N-Terminus ausgehend a_i -, b_i - und c_i -Ionen und vom C-Terminus ausgehend die dazu komplementären x_i -, y_i - und z_i - Fragmentionen. Fragmentionen der Aminosäureseitenketten werden als v_i -, w_i - und d_i - bezeichnet. Der Index-i gibt dabei die Zahl der im Fragment enthaltenen Aminosäurereste an (aus Schmelzer, 2002).

An den Peptidbindungen können drei verschiedene Arten von Fragmentierungsreaktionen ablaufen. Dabei entstehen abhängig von der Reaktion vom N-Terminus ausgehend a_i -, b_i - und c_i -Ionen und vom C-Terminus ausgehend die dazu komplementären x_i -, y_i - und z_i -Fragmentionen. Die Fragmentionen welcher Ionenserie bevorzugt entstehen, ist vom Verbleib der Ladung abhängig. Darüber hinaus können Fragmentionen der Aminosäureseitenketten entstehen. Die als v_i -, w_i - und d_i - bezeichneten Ionen können zusätzliche Strukturinformationen liefern. Roepstorff und Fohlman sowie später Biemann (Roepstorff und Fohlman, 1984; Biemann, 1992) haben diese Nomenklatur etabliert (vgl. Schmelzer, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sequenzinformationen ausschließlich mit Hilfe von b - und y -Ionen gewonnen. Diese Serien entstehen durch Spaltung der Amidbindung zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff. Diese Reaktion läuft bevorzugt bei der kollisionsinduzierten Dissoziation von Peptiden ab. Die dadurch entstehenden Fragmentionen erzeugen daher meist signifikante Peaks im Massenspektrum. Mit Hilfe von Analyseprogrammen (Compass Data Analysis, Bruker) können die Peaks mit dem jeweils folgenden Peak des gleichen Ionentyps verbunden werden. Dieser wird durch den Bruch an der nächstfolgenden Aminosäure erzeugt. Dabei spricht man von Serien einer Ionenart, die über Peptidleitern miteinander verbunden werden (siehe Abbildung 9, S.21).

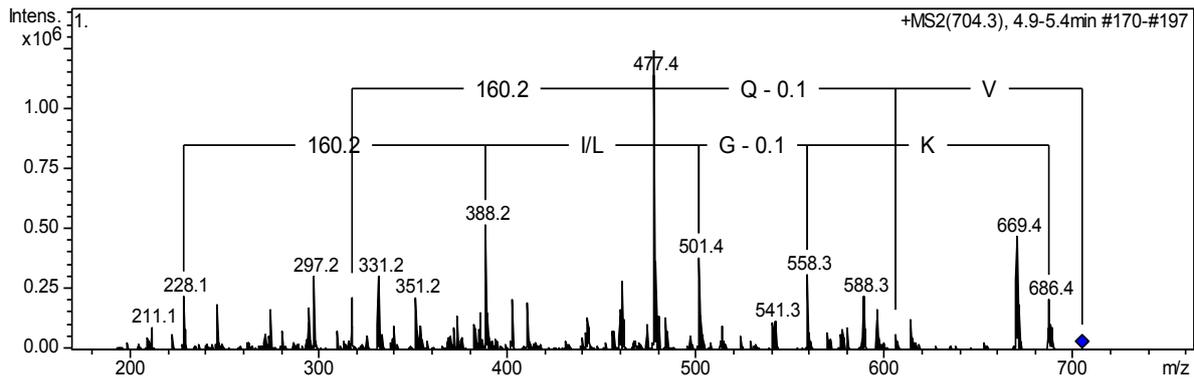


Abbildung 9: Beispiel einer Peptidleiter anhand des Trypsin Spaltpeptids 703,3 Da (m/z 704,3 $[M+H]^+$) (siehe Tabelle 1, S.24).

Die Peaks einer bestimmten Serie unterscheiden sich jeweils vom Folgenden in der Masse einer Aminosäure (residue mass²). In dem die Massenpeaks einer Serie miteinander verbunden werden, kann die Aminosäuresequenz des Fragments bzw. Spaltpeptids bestimmt werden. Die Ermittlung der Sequenz eines unbekanntes Peptids ausschließlich durch Auswertung von MS-Spektren wird als de-novo-Sequenzierung bezeichnet. Die Methode ist schon lange bekannt, findet aber erst seit der Entwicklung leistungsfähiger Softwarealgorithmen vermehrt Anwendung in der Analytik.

Wie bereits erwähnt, sind die y- und die b-Ionenserien in Massenspektren von Peptiden meist am besten zu erkennen. Da die Amidbindung besonders labil ist, stellt sie eine bevorzugte Bruchstelle dar. Im Rahmen eines Fragmentierungsexperiments entsteht pro Analytion meist ein Kettenbruch des Aminosäurerückgrats. In der Ionenpopulation des Analytions entstehen jedoch die zahlreichen möglichen Fragmente mit unterschiedlicher Häufigkeit und erzeugen damit Peaks mit unterschiedlichen Intensitäten. Dies hat zur Folge, dass manche Fragmente selten und andere vermehrt gebildet werden.

² „Residue mass“ bezeichnet die Masse, die entsteht wenn eine Aminosäure aus einer Peptidkette gespalten wird. Diese ist die eigentliche Aminosäuremasse, die um 18 Da reduziert ist. Das entspricht dem Verlust eines Wassermoleküls, das bei der Bildung der Peptidbindung abgespalten wird.

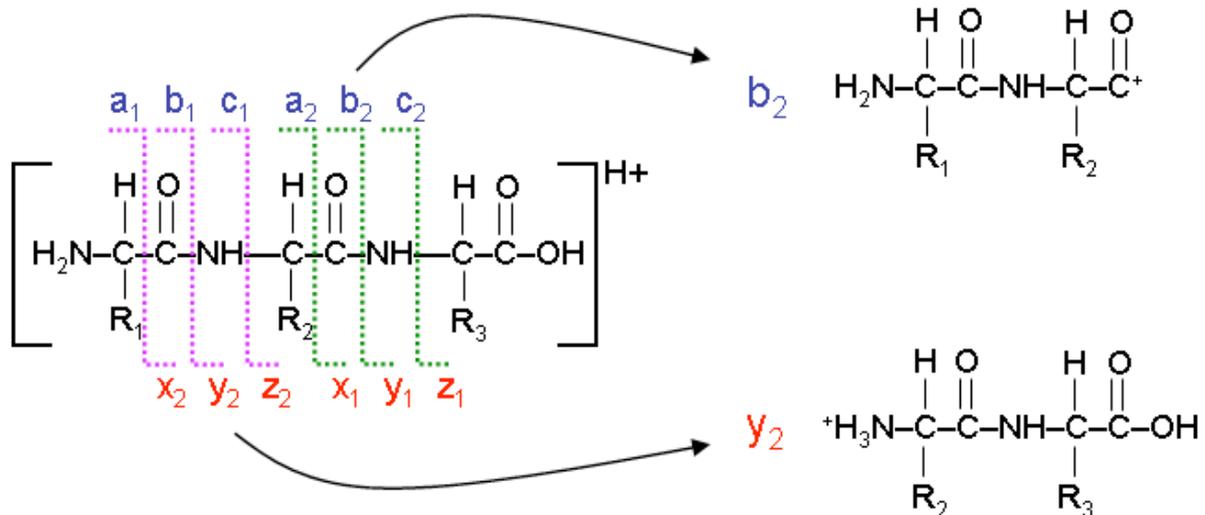


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Fragmentationenserie von b- und y-Ionen (aus Monroe, 2013).

Durch die Fragmentierung eines Peptids an einer Amidbindung entstehen zwei Teilfragmente, das b-Ion und das y-Ion (sofern beide Teilfragmente auch geladen vorliegen). Da es sich bei der Fragmentierung eines Peptids nicht um eine Hydrolyse handelt, entsteht durch die Spaltung nur ein Fragment, das sowohl einen intakten N-, als auch einen intakten C-Terminus besitzt: das y-Ion. Das andere Teilfragment, das b-Ion, beinhaltet den N-Terminus des Vorläuferions. Der durch den Bruch neu entstandene C-Terminus des b-Ions ist dehydratisiert (vgl. Abbildung 10). Somit ist die Masse eines b-Fragmentations um 18 Da im Vergleich zur Masse der „intakten Peptidkette“³ reduziert. Die y-Ionenserie ist hingegen von der intakten Masse des Analytens ausgehend zu sequenzieren. Sie beschreibt die durch die Fragmentierung entstandenen Teilfragmente, die den intakten N-Terminus besitzen. Da eine Peptidkette an allen Peptidbindungen fragmentieren kann, entstehen verschiedene Fragmente, die sich jeweils vom nächst Schwereren oder Leichterem in der „residue mass“ der (in der Sequenz) folgenden Aminosäure unterscheiden. Die dadurch im Massenspektrum erhaltenen Signale können dann mit Hilfe einer Software verbunden und die Aminosäureabfolge ausgelesen werden. Dies kann analog für die Signale der b-Ionenserie durchgeführt werden, nur dass dabei beachtet werden muss, dass die C-terminale Aminosäure mit intakter COOH-Gruppe abgespalten wird und die Massendifferenz zwischen dem $[M+H]^+$ -Ion und dem b_{n-1} -Ion somit nicht der „residue mass“ sondern der Masse der freien Aminosäuren

³ Hier ist die Peptidsequenz des Spaltfragments mit nicht dehydratisiertem C-Terminus gemeint.

entspricht. Da bei der Sequenzierung in dieser Arbeit nur mit den „residue masses“ der Aminosäuren gearbeitet wurde (siehe Tabelle 1, S.24), beginnt die b-Ionenserie 18 Da zur y-Ionenserie im Spektrum verschoben (siehe Abbildung 9, S.21). Das hat den Vorteil, dass die Peaks häufig eindeutig den Serien zugeordnet werden können und die „Leserichtung“ der Sequenz somit vorgeben ist.

Ein Nachteil der Peptidsequenzierung mittels Massenspektrometrie ist, dass zwischen manchen Aminosäuren nur schwer oder gar nicht unterschieden werden kann. Dazu gehören Glutamin (Q) und Lysin (K), die aufgrund ihrer sehr ähnlichen Molekulargewichte nur durch Verwendung besonders hochauflösender Massenspektrometer oder durch einen spezifischen tryptischen Verdau unterschieden werden können. Bei letzterem wird selektiv nach basischen Aminosäuren wie Lysin gespalten. Die Isomere Isoleucin und Leucin können hingegen nur durch zusätzliche LC-MS-Experimente, z.B. mit synthetisierten Vergleichspeptiden unterschieden werden.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	Residue-Mass (Da)
Alanin	Ala	A	71,0371
Arginin	Arg	R	156,1011
Asparagin	Asn	N	114,0429
Asparaginsäure	Asp	D	115,0269
Cystein	Cys	C	103,0092
Glutamin	Gln	Q	128,0586
Glutaminsäure	Glu	E	129,0426
Glycin	Gly	G	57,0215
Histidin	His	H	137,0589
Isoleucin	Iso	I	113,0841
Leucin	Leu	L	113,0841
Lysin	Lys	K	128,0950
Methionin	Met	M	131,0405
Phenylalanin	Phe	F	147,0684
Prolin	Pro	P	97,0528
Serin	Ser	S	87,0320
Threonin	Thr	T	101,0477
Tryptophan	Trp	W	186,0793
Tyrosin	Tyr	Y	163,0633
Valin	Val	V	99,0684

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der Aminosäuren mit Drei- und Einbuchstabencode und ihrer „residue mass“.

1.3 Enzymatischer Verdau

Der spezifische enzymatische Verdau wird routinemäßig bei der Sequenzierung von Peptiden und Proteinen in der Massenspektrometrie eingesetzt. Durch die Aminosäurespezifität der Enzyme können die zu analysierenden Makromoleküle in kürzere und leichter zu sequenzierende Spaltpeptide gespalten werden. Diese können anschließend rechnerisch wieder zum intakten Peptid zusammengesetzt werden. Beim Verdau entsteht ein peptidsequenzspezifisches Spaltpeptidmuster, das sich je nach verwendetem Enzym unterscheidet. Dies ist der oben bereits erwähnte Peptidmassen-Fingerprint (PMF), der zur Identifizierung von Peptiden im Abgleich mit Datenbanken und auch als Hilfsmittel zur Sequenzierung von unbekanntem Peptiden verwendet wird (Schmelzer, 2007).

1.3.1 Strategie der enzymatischen Fragmentierung

Um dabei eine bessere Abdeckung der Sequenzen zu erhalten, werden oftmals parallel zwei oder mehrere Probenaliquote mit verschiedenen Endoproteinasen bzw. Endopeptidasen, die unterschiedliche Selektivität besitzen, gespalten. Dabei entstehen abhängig vom jeweiligen Enzym spezifische Spaltpeptide. Aus den zusammengesetzten Peptiden zweier oder mehrerer Peptidverdau ergeben sich gegenseitig überlappende Spaltpeptidmuster, die miteinander abgeglichen werden. Gewonnene Sequenzinformationen können sich dabei gegenseitig ergänzen (siehe Abbildung 11).

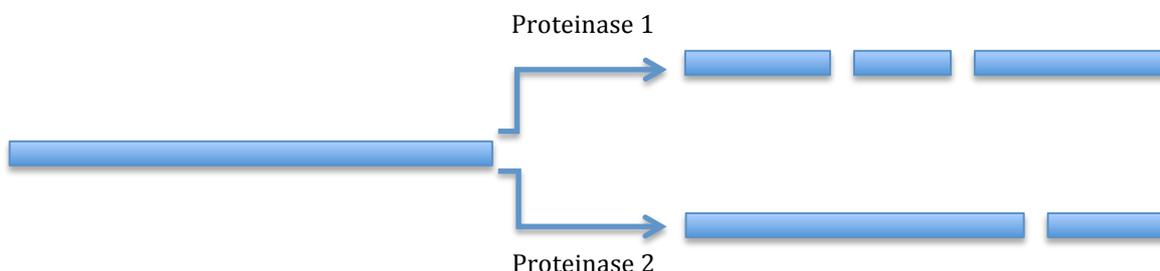


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Verdau eines Peptids mit zwei unterschiedlichen Endopeptidasen und das jeweils entstehende Spaltpeptidmuster.

Diese Methode wurde auch im Rahmen der Diplomarbeit verwendet. Die Peptidfraktionen wurden jeweils einmal mit Pepsin und einmal mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Spaltpeptide wurden anschließend mittels LS-MS analysiert und die Peptidsequenz, wie oben beschrieben, rekonstruiert.

Das Verdauungsenzym Pepsin ist eine saure Peptidase, die ihre höchste proteolytische Aktivität bei pH 1,5-3 entfaltet. Trypsin wird über autoproteolytische Spaltung aus der inaktiven Vorstufe unter Einfluss von HCl im Organismus gebildet. Im Gegensatz zu Trypsin ist Pepsin in seiner Sequenzspezifität etwas unselektiver. Pepsin spaltet bevorzugt nach hydrophoben bzw. aromatischen Aminosäuren wie Leucin (L) oder Phenylalanin (F) (Worthington Biochemical Corporation, 2014a). Die Serinprotease Trypsin spaltet hingegen selektiv nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin und arbeitet optimal bei einem pH 7-8 (Worthington Biochemical Corporation, 2014b).

Enzyme, die für den proteolytischen Verdau von Peptiden eingesetzt werden, sind meist für eine oder mehrere Aminosäure spezifisch. Da Endopeptidasen jedoch selbst eine Peptidstruktur besitzen, ist zu beobachten, dass es beim Verdau zur Autoproteolyse der Enzyme – sprich zum Selbstverdau – kommen kann. Eine Strategie, um dies zu vermeiden, ist der Einsatz von an Polymermatrix gebundenen Enzymen, so dass kein gegenseitiger Kontakt der Enzyme durch Diffusion zustande kommt. Dadurch können höhere Enzymkonzentrationen eingesetzt werden und somit die Verdauzeit erheblich verkürzt werden. Der Pepsinverdau wurde mit an Harzkügelchen immobilisiertem Pepsin durchgeführt. Wird ein enzymatischer Verdau hingegen in Lösung durchgeführt, wie es beim Trypsinverdau der Fall war, so muss sichergestellt werden, dass keine autoproteolytischen Spaltprodukte in der Probe enthalten sind bzw. diese als solche identifiziert werden können. Dazu wurde parallel ein Kontrollexperiment ohne Peptidprobe angesetzt, und die Daten anschließend abgeglichen.

1.3.2 Reduktion und Alkylierung von Peptiden

Peptide können über Cysteinbrücken quervernetzt sein. Dadurch werden enzymatische Spaltstellen in der Aminosäuresequenz eines Peptids für Verdauenzyme sterisch oftmals schwer zugänglich, oder es wird die Trennung zweier Spaltpeptide nach der

enzymatischen Spaltung verhindert. Deshalb wurden die Disulfidbrücken im Vorfeld durch Reduktion und Alkylierung gespalten und so hingehend modifiziert, dass sie sich nicht wieder unter Einfluss von O₂ neu ausbilden können.

Die Reduktion der Disulfidbrücken wird mit Hilfe von Reduktionsmitteln wie hier Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Dabei wird die Disulfidbrücke, die zwischen den Schwefelatomen zweier Cysteinen besteht, getrennt.

Durch die anschließende Alkylierung wird die Reduktion irreversibel. Die freien SH-Gruppen der Cysteine, die bei der Reduktion entstehen, werden dabei modifiziert, um die unerwünschte Neubildung von Disulfidbrücken zu vermeiden (siehe Abbildung 12). Hierfür werden Alkylierungsreagenzien wie Iodacetamid eingesetzt. Bei der Sequenzierung der Aminosäuresequenz muss berücksichtigt werden, dass sich durch die Modifikation das Molekulargewicht des Cysteins um 57 Da erhöht – dementsprechend ergibt sich eine „residue mass“ von 160 Da für ein Cystein (Vatansever, 2007).

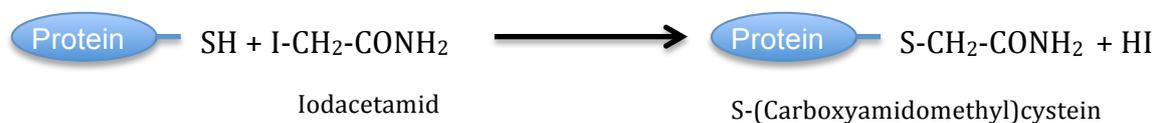


Abbildung 12: Reaktion der freien SH-Gruppe eines Cysteins mit Iodacetamid zu S-(Carboxyamidomethyl)cystein.

1.4 Vorkenntnisse aus vorangegangenen Diplomarbeiten und Zielsetzung

Die Diplomarbeiten von Birgit Semper und Johanna Hellmayr haben bereits im Vorfeld den Grundstein für diese Diplomarbeit gelegt, indem sie die verwendeten Aufreinigungsverfahren und das Fraktionierungsschema, sowie die HPLC-Methoden entwickelten und etablierten (Semper, 2012; Hellmayr, 2012).

Birgit Semper konnte im Rahmen eines Pflanzenscreenings feststellen, dass *Fructus Sambuci nigrae* eine besonders hohe Konzentration von Peptiden aufweist.

Pflanzenpeptide werden in verschiedene Gruppen eingeteilt: Glutathionderivate, Proteaseinhibitoren und cysteinreiche Abwehrpeptide. Ein Sonderfall stellen die Cyclotide dar. Diese sind zwar auch cysteinreiche Abwehrpeptide, allerdings ist ihr Peptidrückgrad durch die Amidbindung zwischen erster und letzter Aminosäure der Sequenz zu einem Ring geschlossen. Johanna Hellmayr konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass es sich bei den in Fructus Sambuci nigrae enthaltenen Peptide um cysteinreiche Peptide handelt, die jedoch linear sind. Die lineare Peptidstruktur ist über drei peptidinterne Cysteinbrücken zyklisiert (Hellmayr, 2012). Cysteinbrücken stabilisieren im Allgemeinen Peptide und Proteine und machen sie so für externe Einflüsse unempfindlicher (Farrokhi et al., 2008). Die Klassifizierung von Peptiden erfolgt meist über Sequenzähnlichkeit charakteristischer konservierter Regionen, die strukturelle Ähnlichkeit der Untergruppe ableiten lassen (vgl. Hellmayr, 2012).

Im Rahmen der Arbeit von Johanna Hellmayr wurden bereits einzelne Teilsequenzen ermittelt. Diese konnten jedoch weder bestätigt noch zu einer vollständigen Peptidsequenz zusammengesetzt werden.

Cysteinreiche Abwehrpeptide, wie Defensine, sind in unterschiedlichsten Lebensformen als Teil einer humoralen Abwehrstrategie zu finden. Neben ihren strukturellen Ähnlichkeiten erfüllen sie meist auch eine ähnliche Funktion in den Organismen, die mit der organismuseigenen Abwehr gegen exogene Schädigungen assoziiert ist – z.B. eine antimikrobielle Wirkung. Durch die Infektion mit Pathogenen kommt es in Pflanzen zu einer gesteigerten Expression von Peptiden, die eben diese antimikrobielle Wirkung besitzen. Um Peptide als Abwehrpeptide zu kategorisieren, muss ein direkter Zusammenhang zwischen der Genexpression der Peptide und der Abwehrreaktion des Organismus gegen die Pathogene bewiesen werden. Die Gruppe der Abwehrpeptide kann in zwei Untergruppen unterteilt werden: Während die eine Gruppe ubiquitär im Organismus vorhanden ist, wird die zweite Gruppe nur auf pathogene Reize hin exprimiert. Beide Untergruppen sind in tierischen Organismen, so auch beim Menschen und in höheren Pflanzen zu finden und werden in Körperflüssigkeiten und an Schleimhaut- und Körperoberflächen sezerniert. Sie dienen dort als Abwehr gegen Bakterien, Pilze und Viren (Hellmayr, 2012). Cyclotide konnte eine hämolytische, cytotoxische und auch eine anti-HIV Wirkung nachgewiesen werden (Gruber und O'Brien, 2011).

Da auch in den Beeren von *Sambucus nigra* eine hohe Konzentration an cysteinreichen Peptiden nachgewiesen werden konnte (Semper, 2012 und Hellmayr, 2012), liegt die Vermutung nahe, dass diese potenziell mitverantwortlich für die antivirale Wirkung der Holunderbeere sind, die aus Studien mit dem Nahrungsergänzungsmittel Sambucol® hervorgeht (Zakay-Rones et al., 2004). Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die Primärstruktur der Hauptpeptide, die in Holunderbeeren enthalten sind, mittels LC-MS-Analytik aufzuklären. Parallel dazu, werden in Kooperation mit Arbeitsgruppen am Universitätsklinikum Freiburg und der Universität Tübingen Peptidfraktionen aus der Holunderbeere auf ihre immunmodulatorische und antivirale (Influenza-Virus-A) Wirkung getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial von Fructus Sambuci nigrae

Für die Versuche wurde Pflanzenmaterial der toto Droge Fructus Sambuci nigrae (von Mag. Kottas Heilkräuter; Charge: W10201493) verwendet. Dabei wurden zur Gewinnung der Peptide die ganzen getrockneten unzerkleinerten Beeren eingesetzt.

2.2 Probenextraktion

2.2.1 Probenextraktion für MS-Experimente

Zur Isolierung der Inhaltsstoffe wurden insgesamt 30 g Drogenmaterial von Fructus Sambuci nigrae toto mit 300 mL eines Gemisches (1:1) aus Acetonitril und 2%-iger Ameisensäure (AMS) versetzt und 30 min lang mit Hilfe eines Ultraschallbades extrahiert. Anschließend wurde die gewonnene Probe über einen Faltenfilter abfiltriert und dann in einem Rotationsevaporator zur Trocknung gebracht. Von dem schwarz-violetten, karamellartigen Acetonitrilextrakt wurden 2,5 g eingewogen und in 15 mL eines Gemisches (1:9) aus Acetonitril und 1%-iger Ameisensäure gelöst. Die Probe wurde anschließend, wie unter Kapitel 2.3, S.31, beschrieben, mittels Festphasenextraktion (SPE) weiter aufgereinigt.

Diese Extraktion wurde zweimal durchgeführt. Zum einen wurde für die LC-MS Analytik die erhaltene Probe in Einzelfraktionen aufgetrennt (siehe Tabelle 2, S.32) und zum anderen wurde ein Gesamtpeptidextrakt (FSN_31.3-FSN_43.4) für Zelltests gesammelt.

Das Gesamtpeptidextrakt wurde dabei wie folgt weiterverarbeitet: das Lösungsmittel wurde entfernt, die Gesamtausbeute von 23,0 mg bestimmt, und die Probe erneut in zweimal 5 mL Acetonitril/1%-ige Ameisensäure 4:1 (v/v) gelöst. Diese Lösung wurde auf 20 Eppendorfgefäße voluminaliquot aufgeteilt und erneut zur Trocknung gebracht. Die so erhaltene Probe wird auch im Folgenden als Gesamtpeptidfraktion bezeichnet. Um zu überprüfen, ob die Aliquote tatsächlich die gleiche Stoffmenge beinhalten, wurde exemplarisch das Füllgewicht von vier Eppendorfgefäßen bestimmt (1,11-1,24 mg). Die

Aliquote wurden für weitere Tests auf antimikrobielle, antivirale und immunmodulatorische Wirkung an die Kooperationspartner am Universitätsklinikum Freiburg (Dr. Carsten Gründemann; Uni-Zentrum Naturheilkunde; Arbeitsgruppe Präklinik) und an der Eberhard Karls Universität Tübingen (Prof. Oliver Planz; interfakultäres Institut für Zellbiologie; Abteilung Immunologie) geschickt.

2.2.2 Probenextraktion für Hitzestabilitätstest

Die Durchführung erfolgte auf Grundlage eines Kochrezeptes für Holunderbeerensaft (Anonym, 2009). Hierfür wurden 10 g Droge in 100 mL bidest. Wasser eine Stunde lang quellen gelassen und anschließend 30 Minuten lang gekocht. Das erhaltene Produkt wurde filtriert, allerdings konnten nur weniger als 50 mL Filtrat gewonnen werden. 2,5 mL davon wurden zu je 750 µL aliquotiert. Diese wurden über eine 96-well-SPE aufgereinigt, die, wie unter Kapitel 2.6, S.35, beschrieben, durchgeführt wurde. Die so erhaltene Probe wird im Folgenden als Gesamtwasserextrakt bezeichnet.

2.3 Festphasenextraktion (SPE) der Extrakte aus Fructus Sambuci nigrae

Durch Festphasenextraktion, die zur Auftrennung der Inhaltsstoffe der extrahierten Probe aus Fructus Sambuci nigrae (Kap. 2.2, S.30) bereits im Vorfeld von Birgit Semper etabliert wurde (Semper, 2012), konnten die zu isolierenden Peptide in verschiedene Fraktionen aufgetrennt, sowie andere Inhaltsstoffe und Verunreinigungen abgetrennt werden. Hierfür wurde eine Reversed-Phase C-18 SPE von Agilent Technologies (Mega Bond Elut C-18; 10 g; 60 mL) verwendet. Die Auftrennung der Peptide (Gesamtpeptidfraktion) erfolgt durch die stufenweise Absenkung der Polarität des Elutionsmittels. Dafür wurden sechs verschiedene Mischungsverhältnisse von Acetonitril und 1%-iger wässriger Ameisensäure verwendet (27%-ig, 31 %-ig, 35%-ig, 39%-ig, 43%-ig und 47%-ig). Die Fraktionen, die bei 31-47%-igem Acetonitril eluieren, wurden in je vier Unterfraktionen unterteilt. Die SPE wurde wie folgt durchgeführt: 2,5 g des Acetonitrilextrakts (Kap. 2.2.1 und, S.30) wurden in 15 mL einer Mischung (1:9) aus 10%-igem Acetonitril und 1%-iger Ameisensäure gelöst. Die Säule wurde, wie in der folgenden Tabelle 2 beschrieben, mit MeOH gewaschen und mit 1%-iger

Ameisensäure equilibriert. Anschließend wurde das Acetonitrilextrakt (siehe Kap. 2.2.1, S.30) aufgetragen und die einzelnen Fraktionen mit steigendem Acetonitril Gradienten eluiert und aufgereinigt.

Volumina	Elutionsmittel	
Waschen		
3-4 Reservoirvolumina	Methanol redest.	
Equilibrieren		
3-4 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1%	
Auftragen		
15 ml	Extrakt (Kap. 2.2.1, S.30): ca. 2,5 g gelöst in 15 mL wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 9:1 (v/v)	
Elution (verworfen)		
3 Säulenvolumina	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 9:1 (v/v)	
Elution (gesammelte Fraktionen)	pro Säulenvolumina 4 Fraktionen à 15 mL	Frakt.-Bez.
1 Säulenvolumen	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 73:27 (v/v)	FSN_27.
1 Säulenvolumen	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 69:31 (v/v)	FSN_31.1-31.4.
1 Säulenvolumen	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 65:35 (v/v)	FSN_35.1-35.4.
1 Säulenvolumen	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 61:39 (v/v)	FSN_39.1-39.4.
1 Säulenvolumen	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 57:43 (v/v)	FSN_43.1-43.4.
1 Säulenvolumen	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 53:47 (v/v)	FSN_47.1-47.4.

Tabelle 2: SPE-Schema an C-18 Material (10 g, 60 mL) zur Aufreinigung und Auftrennung der Peptide von Fructus Sambuci nigrae aus dem Acetonitrilextrakt (Kap. 2.2.1, S.30; vgl. Kap. 2.4, S.33).

Das Eluat der drei Säulenvolumina mit 10%-igem Acetonitril wurde verworfen. Die mit 27%-igem Acetonitril eluierten Fraktionen wurden gemeinsam aufgefangen, aber nicht weiter bearbeitet.

Die restlichen Konzentrationen wurden in je vier unterschiedlichen Gefäßen zu je 15 mL aufgefangen und anschließend in der Vakuumzentrifuge zur Trockene gebracht.

2.4 Systematische Benennung der Fraktionen

Zur Differenzierung der unter Kapitel 2.3, S.31 (bzw. Kap. 2.2, S.30), gewonnenen Fraktionen wurden diese zunächst systematisch nach ihrer Ursprungsdroge Fructus Sambuci nigrae (FSN_) benannt. Für Zelltests wurde ein Gesamtpeptidextrakt hergestellt, das auch im Weiteren als solche bezeichnet wird (siehe Kap. 2.2.1, S.30). Das wässrige Extrakt das für den Test der Peptide auf Hitzestabilität hergestellt wurde, wird im Folgenden als Gesamtwasserextrakt bezeichnet (siehe Kap. 2.2.2, S.31).

Die Bezeichnung der Einzelfraktionen für die Sequenzanalytik wurden mit der Acetonitrilkonzentration ergänzt, mit der die jeweilige SPE-Fraktion eluiert, und die entsprechende Unterfraktion angefügt (z.B. FSN_31.1., das entspricht der ersten Subfraktion, die mit 31%-igem Acetonitril eluiert wurde).

Die systematische Fraktionsbezeichnung wurde anschließend mit dem jeweiligen verwendeten Verdauungsenzym Trypsin (TD) bzw. Pepsin (PD) ergänzt (z.B. FSN_31.1._TD).

Zur Darstellung der Sequenzierungsergebnisse (der MS-Spektren) in einer nachvollziehbare Struktur, wurden zwei Darstellungsformen gewählt. Aus dieser kann sowohl die ausgelesene Teilsequenz, als auch deren Lokalisation in der Sequenz des intakten Peptids bzw. Spaltpeptids entnommen werden. Folgende zwei Darstellungsformen wurden gewählt:

GlpCWGK GCAPWSPCQSGCTCVG**VGG{K/Q}[I/L]GACTGP I/L** (=intaktes Peptid)

GCAPWSPCQSGCTCVG**VGG{K/Q}[I/L]GACTGP I/L** (=Spaltpeptid)

Dabei gehören alle farblich einheitlichen Sequenzbereiche zu dem gleichen Spaltpeptid. Der Bereich, der direkt aus dem jeweils beschriebenen Spektrum sequenziert wurde, wird durch die hervorgehobene Schrift **fett** gekennzeichnet. Der ausgegraute Bereich ist der Sequenzteil, der das Spaltpeptid zur Gesamtsequenz des intakten Peptids vervollständigt. Werden im Folgenden MS³-Spektren beschrieben, so werden die abgespaltenen Teilsequenzen in einem ähnlichen abgeschwächten Farbton zurückgesetzt dargestellt.

Im Fließtext gibt es unterschiedliche Darstellungsformen. Es werden Spaltpeptidsequenzen isoliert dargestellt. Dabei werden zum einen Sequenzbereiche,

die direkt aus einem Spektrum sequenziert wurden, **fett** dargestellt und zum anderen kann sich die hervorgehobene Sequenz auch auf Sequenzbereiche beziehen auf die der Text bzw. die Diskussion Bezug nimmt.

2.5 Spaltung der peptidinternen Cysteinbrücken - Reduktion und Alkylierung

Fraktion	Gewicht in mg	0,1 M NH ₄ HCO ₃ in µL	0,1 M DTT in µL	0,3 M Iodacetamid in µL	Acetonitril in µL
31.1.	3,58	358	179	179	78,8
31.2.	4,39	439	220	220	96,8
31.3.	2,80	560	280	280	123,2
31.4.	1,94	388	194	194	85,4
35.1.	2,75	550	270	270	118,8
35.2.	3,35	670	335	335	147,4
35.3.	2,44	488	244	244	107,4
35.4.	1,51	302	151	151	66,4
39.1.	1,35	270	135	135	59,4
39.2.	1,28	256	128	128	56,3
39.3.	1,05	210	105	105	46,2
39.4.	0,87	174	87	87	38,3
43.1.	1,09	218	109	109	48,0
43.2.	0,81	162	81	81	35,6
43.3.	0,68	136	68	68	29,9
43.4.	0,43	86	43	43	18,9
47.1.	0,42	82	42	42	18,5
47.2.	0,24	48	24	24	10,6
47.3.	0,32	64	32	32	14,1
47.4.	0,47	94	47	47	20,7

Tabelle 3: Pipettierschema der eingesetzten Reagenzien NH₄HCO₃, DTT zur Reduktion der Disulfidbrücken und Iodacetamid zur Alkylierung der freien SH-Gruppen, jeweils bezogen auf die Peptidmenge der einzelnen Fraktionen.

Die getrockneten SPE-Fraktionen (vgl. Tabelle 2, S.32) wurden in zwei Schritten jeweils in 250 µL 47%-igem Acetonitril (1%-iger Ameisensäure) gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Daraufhin wurden die Fraktionen wieder getrocknet und die Ausbeute per Differenzwägung bestimmt (siehe Tabelle 3).

Für die Reduktions- und Alkylierungsreaktionen wurden die Proben zunächst mit je 200 µL 0,1 M NH₄HCO₃ pro mg Ausbeute versetzt und gelöst. Lediglich bei den Proben FSN_31.1 und FSN_31.2. wurde mit 100 µL 0,1 M NH₄HCO₃ pro mg Ausbeute gearbeitet,

da hier eine eher geringere Peptidkonzentration im Vergleich zu den übrigen Fraktionen zu erwarten war (siehe Hellmayr, 2012).

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Proben mit je 100 μL pro mg Ausbeute 0,1 M DTT Lösung versetzt und 30 min bei 60 °C im Heizblock inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben auf Eiswasser gekühlt. Für die anschließende Alkylierung der freien SH-Gruppen wurden den Proben je 100 μL pro mg Ausbeute 0,3 M Iodacetamid als Alkylierungsreagenz zugegeben und diese 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Volumenverhältnis war dabei 2:1:1 und das Konzentrationsverhältnis 2:1:3. Die exakt eingesetzten Volumina können der Tabelle 3, S.34, entnommen werden. Im letzten Schritt wurden die Acetonitrilkonzentration der Proben jeweils auf 10% ergänzt. Dadurch kann die Löslichkeit auch für hydrophobe Peptide gewährleistet werden.

2.6 Festphasenextraktion (SPE) zur Aufreinigung der alkylierten Peptide

Zur Aufreinigung der alkylierten Peptidfraktionen wurden die Proben auf je eine 96-well SPE-Säule (RP 18-SPE von Supelco® Analytical, Discovery® DSC-18 SPE_96-Plate; 100 mg; Produktnr.: 3266701) aufgetragen. Die Fraktionen wurden mit bidest. H_2O und 10%-igem Acetonitril gewaschen und dann mit 80%-igem Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde zur Weiterverarbeitung aufgefangen. Die genaue Durchführung kann Tabelle 4, S.36, entnommen werden.

Von den gewonnenen Proben (4 mL) wurden je 200 μL für eine LC-MS Analyse entnommen. Das übrige Volumen wurde in 4 Eppendorfgefäße zu jeweils ungefähr 950 μL aliquotiert, getrocknet und die Aliquote bei -18 °C tiefgefroren. Die LC-MS Proben wurden nach der Trocknung wieder in 50 μL 10%-igem Acetonitril (1%-iger Ameisensäure) gelöst, abzentrifugiert und in Probenvials übergeführt.

Volumina	Elutionsmittel
Waschen (Säule)	
3-4 Reservoirvolumina	Methanol redest.
Equilibrieren	
3-4 Reservoirvolumina	bidest. H ₂ O
Auftragen	
siehe Tabelle 3	Proben
Waschen (Proben)	
1 Reservoirvolumen	bidest. H ₂ O
2 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 9:1 (v/v)
Elution (gesammelt)	
2 Säulenvolumina	wässrige Ameisensäure 1%: Acetonitril 2:8 (v/v)

Tabelle 4: SPE-Schema an C-18 Material (96-Well, 100 mg) zur Aufreinigung der reduzierten und alkylierten Peptidfraktionen.

2.7 Enzymverdau

Nach Auswertung der LC-MS Daten der alkylierten Peptidfraktionen wurden ausgewählte Fraktionen mit ausreichender Peptidkonzentration zur weiteren Analyse herangezogen. Diese wurden zur massenspektrometrischen Analyse der Peptidsequenz mit zwei unterschiedlichen Endopeptidasen, Trypsin (Trypsin, TPCK behandelt, aus Rinderpankreas; Sigma-Aldrich; Produktnr.: T1426-100mg) und Pepsin (immobilisierte Pepsin Agarose von Thermo Scientific; Produktnr.: 20343), in kleinere Spaltpeptide gespalten.

Für den tryptischen Verdau wurde die Probe in 50 µL 0,1 M NH₄HCO₃ für 10 min mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst. Es wurde parallel eine Blindprobe hergestellt. Durch den Abgleich der erhaltenen LC-MS Daten mit der Blindprobe können Spaltpeptide, die durch den Selbstverdau des Trypsins entstehen können, in den Daten der Proben als

solche identifiziert werden. Jeder Probe wurden 5 μL Trypsin (1 mg pro 10 mL 10 mM HCl) zugesetzt. Nach ca. 8 h bei 37°C im Wasserbad wurden die Proben mit 55 μL 1%-iger Ameisensäure und 12 μL purem Acetonitril versetzt, um den Verdau zu stoppen und anschließend bei 12000 UpM 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Probenvial überführt und die Proben mittels LC-MS vermessen. Für den peptischen Verdau wurde ein Aliquot jeder Fraktion (siehe Kap. 2.6, S.35) in 100 μL 0,01%-iger Ameisensäure für 10 min mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst. 40 μL immobilisiertes Pepsin wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal mit 200 μL 0,01%-iger Ameisensäure gewaschen. Die gelöste Probe wurde in das Gefäß mit dem gewaschenen Pepsingel überführt und 100 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch regelmäßiges Resuspendieren konnte eine gleichmäßige Durchmischung und somit ein vollständiger Verdau gewährleistet werden. Nach 100 min wurde das Pepsingel abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser wurde nochmals bei 12000 UpM für 10 min abzentrifugiert und zur LC-MS Analyse in ein geeignetes Probenvial überführt.

2.8 LC-MS Methoden

Um die molekularen Massen der intakten Peptide (reduziert und alkyliert) und deren Spaltpeptide zu bestimmen, sowie zur Sequenzierung wurden LC-MS Analysen auf einem Ultimate 3000 RSLC-Series System (Dionex), das an ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics) gekoppelt ist, durchgeführt.

2.8.1 HPLC Methoden

Für die LC-MS Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene HPLC-Methoden verwendet. Diese wurden von Birgit Semper (Semper, 2012) etabliert. Die Proben wurden, wie unter den Kapiteln 2.6, S.35, und 2.7, S.36, beschrieben, für die LC-MS Analyse vorbereitet, und die HPLC-Trennung auf einer Acclaim 120, C-18, 3 μm , 2.1 x 150 mm Analysensäule (Dionex) bei 25 °C durchgeführt. Als mobile Phase A wurde

dabei 0,1%-ige Ameisensäure und als mobile Phase B Acetonitril verwendet; die Flussrate betrug dabei stets 0,5 mL/min.

Die HPLC-Screeningmethode (*pepscr_lcms*, Tabelle 5, S.38) wurde zur Erfassung der Massen der reduzierten und alkylierten intakten Peptide, sowie für die Vergleichsanalysen, in denen die Peptide auf Hitzestabilität und auf Löslichkeit in PBS-Puffer getestet wurden, verwendet. Der Gradient wurde dabei nach folgendem Schema aufgebaut.

Für die LC-MS Analysen der enzymatischen Spaltpeptide, die Grundlage für die Sequenzanalyse der Peptide waren, wurde die HPLC-Methode Plantpeptidomics-Methode 1 (*digest_M01*) eingesetzt. Diese Methode wurde speziell für die Analyse der in *Fructus Sambuci nigrae* enthaltenen Peptide optimiert. Im Laufe der Arbeit wurde die Plantpeptidomics-Methode 1 noch zur HPLC-Methode Plantpeptidomics-Methode 2 (*digest_M02*) verkürzt. Die Gradienten wurden dabei wie folgt aufgebaut (Tabelle 6, S.39 und Tabelle 7, S.24).

Screeningmethode (<i>pepscr_lcms</i>)	
Minuten	Acetonitril Anteil in %
00.0 – 02.0	10%
02.0 – 52.0	10 → 60%
52.0 – 53.0	60→95%
53.0 – 63.0	95%
63.0 – 64.0	95→10%
64.0 – 75.0	10%

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung des Gradienten der HPLC-Methode *pepscr_lcms*, die für die Analyse der intakten Peptide herangezogen wurde.

Plantpeptidomics-Methode 1 (<i>digest_M01</i>)	
Minuten	Acetonitril Anteil in %
00.0 – 02.0	5%
02.0 – 37.0	5 → 40%
37.0 – 38.0	40→95%
38.0 – 48.0	95%
48.0 – 49.0	95→5%
49.0 – 59.0	5%

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung des Gradienten der HPLC Methode *digest_M01*, die für die Analyse der Spaltpeptide optimiert wurde.

Plantpeptidomics-Methode 2 (<i>digest_M02</i>)	
Minuten	Acetonitril Anteil in %
00.0 – 02.0	5%
02.0 – 27.0	5 → 30%
27.0 – 28.0	30→95%
28.0 – 38.0	95%
38.0 – 39.0	95→5%
39.0 – 49.0	5%

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung des Gradienten der HPLC Methode *digest_M02*, die für die Sequenzanalyse optimiert wurde.

2.8.2 MS-Methode

Die zweite Komponente der LC-MS ist ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer, das mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics) gekoppelt ist. Dabei wurde der Eluentenfluss ca. 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet, die mit folgenden Einstellungen betrieben wurde: Kapillarspannung: -3,7 kV, Vernebelungsgas: 26 psi (N₂), Fluss des Trockengases: 9,0 L/min (N₂), Trockengastemperatur: 340°C. Wie für die HPLC wurden auch hier verschiedene Methoden für die Analytik verwendet.

Im Rahmen der Arbeit wurden drei verschiedene Arten von Experimenten durchgeführt, für die jeweils gesondert eine Methode entworfen wurde. Für alle verwendeten MS-Methoden wurden jedoch einige Parameter fixiert: So wurde stets im Positiv-Ionen-Modus gemessen, ein Messbereich von m/z 80-2500 festgelegt und als Kollisionsgas wurde He verwendet.

Zur Detektion der intakten (reduzierten und alkylierten) Peptide wurde eine Methode gewählt, bei welcher ausschließlich MS¹-Spektren der Peptide aufgenommen wurden, um deren intakte Massen zu bestimmen.

Zur Charakterisierung der enzymatischen Spaltpeptide wurde zunächst eine Methode gewählt bei der zusätzlich eine automatische Fragmentierung der Spaltpeptide durchgeführt wurde (Auto-MSⁿ), wenn deren Signal eine bestimmte Intensität überstieg. Dabei spricht man von dem Data Dependent Acquisition- bzw. DDA-Modus.

Basierend auf den im DDA-Modus erzielten Resultaten wurden individuelle Methoden geschrieben, um gezielt Ionen zu fragmentieren, die für die Analytik der Peptide relevant erschienen. Dabei wurde eine LC-MS Methode in bestimmte Zeitfenster eingeteilt und genau festgelegt, in welchem Zeitfenster welches Spaltpeptid mit einem bestimmten m/z-Wert isoliert und fragmentiert werden sollte; individuell für den detektierten m/z-Wert der Spaltpeptide wurde jeweils der Scan-Bereich festgelegt. Neben gezielten MS²-Experimenten wurden hier auch MS³-Experimente durchgeführt, bei welchen Fragmente aus einem MS²-Spektrum der Spaltpeptide ausgewählt wurden, die in einem Mehrstufenexperiment dann weiter fragmentiert wurden. Durch manuell geschriebenen MS-Methoden bzw. durch eine gezielte Fragmentierung der Spaltpeptide kann eine bessere Spektrenqualität gewährleistet werden. Diese Spektren waren Grundlage der Peptidsequenzanalyse, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Zur Auswertung der Spektren wurde das Analyseprogramm Compass Data Analysis (Bruker) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Vorexperimente für die biologische Testung der Peptide

Da für die meisten bekannten therapeutischen Anwendungen von Holunderbeeren wässrige Abkochungen verwendet werden, ist für eine potenzielle medizinische Wirkung der untersuchten Peptide deren Hitzestabilität und Wasserlöslichkeit von entscheidender Bedeutung. Um überprüfen zu können, ob die in den Beeren enthaltenen Peptide für die medizinische Wirkung der Wasserextrakte verantwortlich sein können, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt.

3.1.1 Löslichkeit

Um das Gesamtpeptidfraktion (Kap. 2.2.1, S.30) auf antibakterielle, antivirale und immunmodulierende Wirkung testen zu lassen (Dr. Carsten Gründemann; Uni-Zentrum Naturheilkunde; Universitätsklinikum Freiburg und Prof. Oliver Planz; interfakultäres Institut für Zellbiologie; Universität Tübingen), wurde die Löslichkeit der Peptide in PBS-Puffer getestet. Durch die organische Extraktionsmittelkomponente Acetonitril konnte von den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Analysen nicht direkt auf eine Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Wasser (oder wässrigen Puffersystemen) geschlossen werden. Diese ist allerdings Voraussetzung für eine potentielle Wirkung im Rahmen der traditionellen, medizinischen Anwendung, da dabei meist wässrige Zubereitungen verwendet werden. Ebenso muss eine Löslichkeit der Probe im physiologischen Medium für die Zelltests gegeben sein.

Zur Testung der Löslichkeit wurden 30 g Droge mit 300 mL eines Gemisches (1:1) aus Acetonitril und 2%-iger Ameisensäure extrahiert, über eine SPE aufgereinigt (wobei nur die Fraktionen FSN_31.3.-43.4. gesammelt wurden) und das Lösungsmittel entfernt (siehe Kap. 2.2.1, S.30).

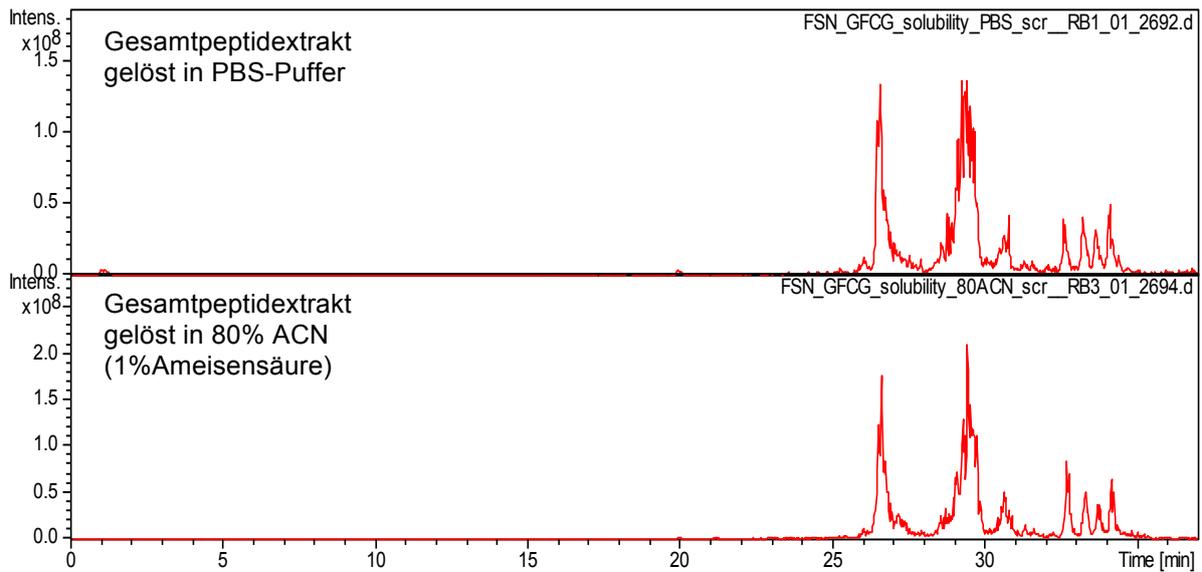


Abbildung 13: Löslichkeitsvergleich der gereinigten Gesamtpeptidfraktion (Kap. 2.2.1, S.30) von *Fructus Sambucus nigra* in PBS-Puffer und 80%-igem Acetonitril mittels LC-MS (HPLC-Screeningmethode vgl. Tabelle 5, S.38). Das obere Basispeakchromatogramm zeigt das Peptidmuster der in PBS-Puffer gelösten Peptidgesamtfraktion. Das untere Spektrum zeigt die in 80%-igem (1%-ige Ameisensäure) Acetonitril gelösten Peptide.

Die LC-MS Daten, die die Gesamtpeptidfraktion in PBS-Puffer und in 80%-igem Acetonitril gelöst zeigen, weisen im Vergleich ein nahezu identisches Peptidmuster und ähnliche Signalintensitäten auf. Das belegt, dass die extrahierten Peptide in reiner Form und in annähernd gleichen Mengen sowohl in 80%-igem Acetonitril als auch in PBS-Puffer löslich sind (siehe Abbildung 13).

Dieses Ergebnis ist die Grundlage für in-vitro Versuche an Bakterien und Virenkulturen (Influenza-A-Viren). Erste Ergebnisse dieser Versuche der Arbeitsgruppe von Prof. Oliver Planz (an der Eberhard Karls Universität Tübingen) zeigten, dass die Peptide, die im Rahmen dieser Diplomarbeit sequenziert wurden, eine antivirale Wirkung aufweisen. Da nur eine Gesamtpeptidfraktion untersucht wurde, kann keine weitere Eingrenzung auf einzelne Peptide gemacht werden. Zusätzlich konnte eine immunmodulierende Wirkung der Peptide von der Arbeitsgruppe von Dr. Carsten Gründemann (Universitätsklinikum Freiburg) gezeigt werden.

Im Folgenden werden die Hauptpeptide, die in den einzelnen Fraktionen enthalten sind, identifiziert und ihre Sequenz bestimmt.

3.1.2 Hitzestabilität

Um die Stabilität der Peptide gegenüber Hitzeeinwirkung zu überprüfen, wurde ein Gesamtwasserextrakt (Kap. 2.2.2, S.31), das über 30 min abgekocht wurde, anhand eines Kochrezepts für Holunderbeerensaft (Anonym, 2009) hergestellt.

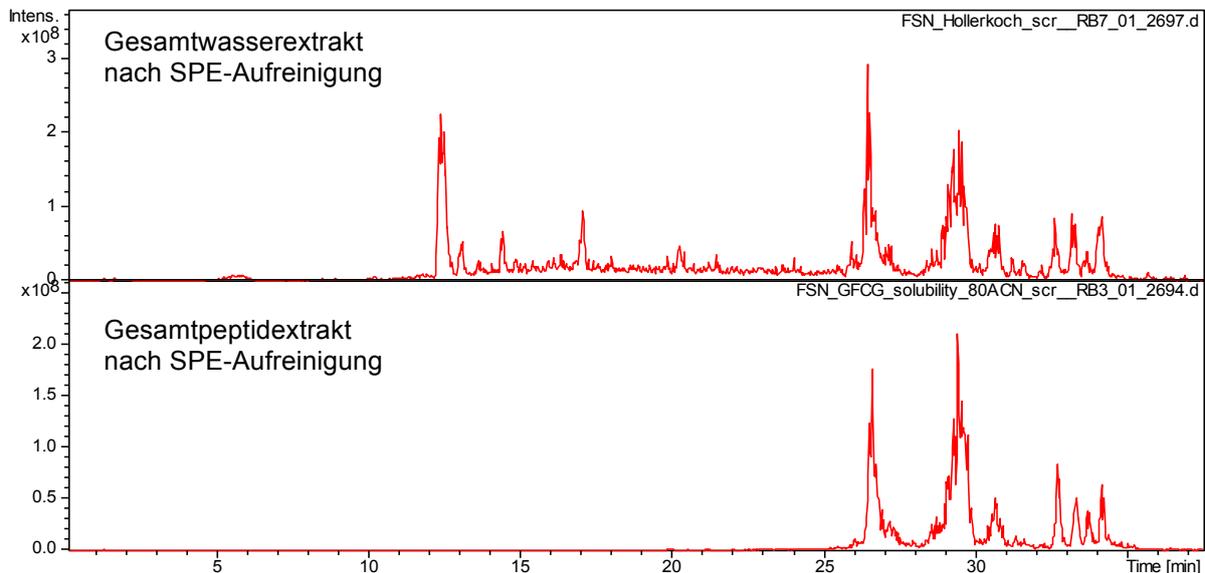


Abbildung 14: Vergleich des Peptidmusters des Gesamtwasserextrakts (Basispeakchromatogramme, HPLC-Methode, siehe Tabelle 5, S.38), das nach 30 minütigem Kochen von Holunderbeeren im destillierten Wasser (oben) entsteht (siehe Kap. 2.2.2, S.31) mit dem Peptidmuster der Gesamtpeptidfraktion (siehe Kap. 2.2.1, S.30), das durch Extraktion mit 80%-igem Acetonitril (unten) erhalten wird. Da die Gesamtpeptidfraktion (bei der Fraktionierung mittels SPE) erst ab einer Acetonitrilkonzentration von 31% gesammelt wurden (vorigen Fraktionen verworfen), sind im unteren Chromatogramm die nicht-peptidischen Komponenten, die innerhalb der ersten 25 min eluieren, nicht enthalten.

Bei der Vergleichsauswertung der erhaltenen LC-MS Daten des Gesamtwasserextrakts mit denen der Gesamtpeptidfraktion (siehe Kap.2.2.1, S.30) zeigte sich, dass das Peptidmuster, das nach 30 minütigem Kochen erhalten wurde, mit dem der Gesamtpeptidfraktion identisch ist (siehe Abbildung 14). Trotz der starken Hitzebelastung, der die Peptide oftmals bei medizinischen Zubereitungen ausgesetzt sind, wird das Peptidmuster in der Zusammensetzung, wenn überhaupt, nur marginal beeinflusst. Die absolute Konzentration der Peptide in den Extrakten wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht gemessen, allerdings zeigen die Daten, dass die Peptide auch in Wasser gut löslich sind und deren Konzentration in den Abkochungen durchaus relevant ist. Dadurch könnte eine therapeutische Wirkung theoretisch mit den enthaltenen Peptiden in Zusammenhang stehen. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die hier untersuchten Peptide thermostabil sind.

3.2 Sequenzierung der Peptide

3.2.1 Fraktionierung der Peptide mittels Festphasenextraktion

Wie in Tabelle 2, S.32, beschrieben, wurde der Extrakt über eine SPE nach sinkender Polarität (Elutionsmittel: 27-47%-iges Acetonitril-(1%-ige)-Ameisensäure-Gemisch) in Einzelfraktionen aufgetrennt. Die im Rahmen der Arbeit isolierten Peptide besitzen eine über Disulfidbrücken quervernetzte Primärstruktur. Durch Reduktion der Disulfidbrücken entstehen freie SH-Gruppen. Diese wurden anschließend alkyliert und dabei so hingehend modifiziert, dass sich keine neuen Cysteinbrücken mehr bilden konnten. Auf diese Weise konnte eine linear nicht quervernetzte Struktur der Peptide gewährleistet werden (siehe Kap. 2.5, S.34; vgl. Kap. 1.3.2, S.26), welche eine wichtige Voraussetzung für die anschließende massenspektrometrische Sequenzierung der Peptide und deren Spaltpeptide darstellte.

Von den erhaltenen Fraktionen wurden anschließend einzeln LC-MS Daten aufgenommen. Die LC-MS Daten der erhaltenen Einzelfraktionen wurden ausgewertet, um das Molekulargewicht der enthaltenen Peptide tabellarisch festzuhalten. Diese Tabelle bildet die Grundlage der weiteren Arbeit (siehe Anhang Tabelle B 1, S. 111).

Zur näheren Analyse und Identifizierung der Peptide und ihrer Sequenz wurden jedoch nur die Fraktionen FSN_31.4., FSN_35.3., FSN_39.2 und die Fraktionen FSN_39.4-43.3. herangezogen. Da die Fraktionen FSN_31.1. sowie FSN_43.4.-47.4. nur eine geringe Peptidkonzentration aufwiesen, wurden diese für die weitere Analyse nicht herangezogen (vgl. Anhang Abbildung B 1, S.112 und Abbildung B 4, S.116). Die Fraktion FSN_39.3. wurde ebenfalls nicht für die Sequenzierung der Peptide herangezogen, da sie eine komplexe Mischung der Peptide aus den Fraktionen FSN_31.4-35.3. und der nachfolgenden Fraktion FSN_39.4. enthielt (vgl. Anhang Abbildung B 3, S.114). Aus diesem Grund wurde auf eine Auswertung verzichtet, da diese keine zusätzliche Information geliefert hätte und mit Zunahme der Komplexität einer Mischung die Zuordnung der Verdauprodukte erheblich erschwert wird.

Von den Fraktionen FSN_31.4., FSN_35.3., FSN_39.2 und FSN_39.4-43.3. wurde jeweils eine Probe mit Pepsin und eine mit Trypsin verdaut (siehe Kap. 2.7, S.36) und zur

weiteren Analyse LC-MS Daten der Proben aufgenommen. Über Teilsequenzen, die aus den Verdauungsprodukten und deren Fragmenten ausgelesen werden können, kann wie in der unter Kapitel 1.3, S.25, beschrieben, die Aminosäuresequenz der intakten Peptide rekonstruiert werden. Auf diese Weise konnten im Rahmen der Arbeit insgesamt vier Peptide sequenziert werden, für mindestens ein weiteres Peptid liegen zwar Sequenzinformationen aber keine vollständige Sequenz vor.

Im Folgenden wird die ermittelte Aminosäuresequenz der identifizierten Peptide anhand von MS²- und MS³-Spektren der Spaltpeptide belegt.

3.2.2 FSN_35.3.

Die Fraktion FSN_35.3. ist, wie Tabelle 2, S.32, zu entnehmen ist, gewonnen worden. Sie ist die dritte Fraktion, die über eine SPE (siehe Kap. 2.3, S.31) mit 35%-igem Acetonitril eluiert wurde.

Im Folgenden wird exemplarisch die detaillierte Vorgehensweise bei der Sequenzanalyse anhand dieser Fraktion illustriert.

Bei der Fraktion FSN_35.3. handelt es sich um ein Peptidgemisch aus mehreren Komponenten (siehe Abbildung 15, S.45 und Tabelle 8, S.20), wobei im Rahmen der Arbeit aus dieser Fraktion zwei Peptide, P2 und P3 genannt, sequenziert wurden, die beide ein Molekulargewicht von 3535 Da besitzen und mit der Screeningmethode (*pepscr_lcms*) bei 19,9 min und 20,4 min eluierten. Die Peptide (P1 und Isoformen), die zwischen 17-18 min eluierten konnten durch die Daten, die aus Fraktion FSN_31.4. gewonnen wurden, aufgeklärt werden (vgl. Kap. 3.2.4, S.65).

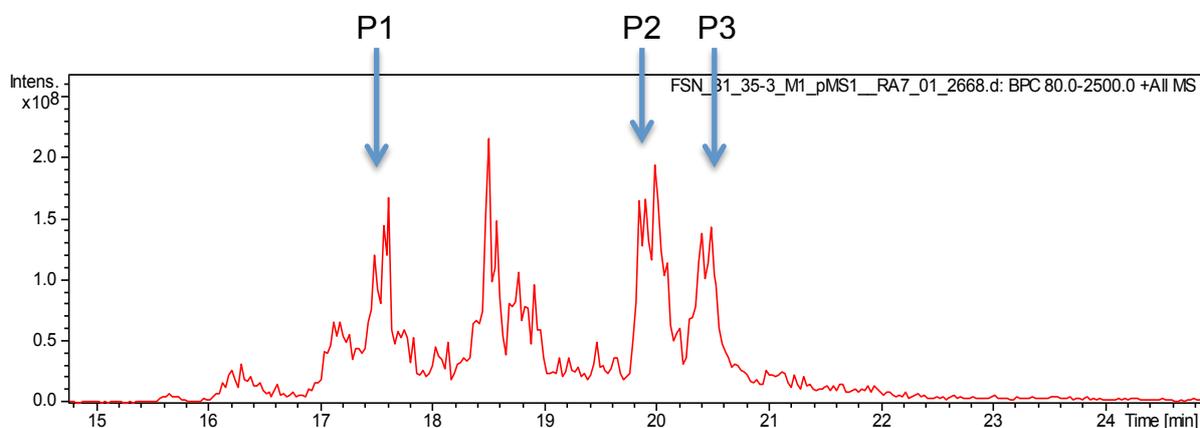


Abbildung 15: Basispeakchromatogramm der reduzierten und alkylierten Peptidfraktion FSN_35.3. (Tabelle 2, S.32) mit den drei Hauptpeptide P1, P2 und P3 (HPLC-Methode siehe Tabelle 5, S.38).

Neben den oben genannten Peptiden P1, P2 und P3 waren noch weitere Peptide in der Fraktion FSN_35.3. vorhanden. Die wesentlichen Peptide dieser Fraktion sind der Tabelle 8 aufgelistet. Desweiteren waren die Peptide der Fraktion FSN_35.3. auch in den Fraktionen FSN_35.4.-39.2 in anderen Intensitäten enthalten (vgl. Tabelle 8).

	MW	Peptid	Modifikation	35.3.	35.4.	39.1.	39.2.
1229,0	3684,0	P1	+Hexose	xxx	x	x	x
1283,0	3846,0	P1	+2Hexose	xx	(x)	(x)	(x)
974,0	3892,0		+46 Da	x	(x)	(x)	
1244,4	3730,2		+46 Da	xx	x	(x)	(x)
893,2	2676,6			x	x	x	
929,0	3712,0			x	x		
969,3	3873,2			x	x		
1179,4	3535,2	P2		xxx	xxx	xx	(x)
1179,3	3534,9	P3		xxx	xxx	xxx	(x)

Tabelle 8: Ergebnisse der semi-quantitativen Massenauswertung der reduzierten und alkylierten Peptide der Fraktionen FSN_35.3.-39.2.. Die Tabelle ist auf die Massen der wesentlichen in den Fraktionen vorkommenden Peptide reduziert. Sie beinhaltet zusätzlich zu den hier sequenzierten Peptiden P2 und P3 die Peptidvarianten des Peptids P1(siehe Kap. 3.2.4, S.65), die hier zwischen 17-18 min eluieren. Die vollständige Tabelle ist im Anhang zu finden.

3.2.2.1 Enzymatischer Verdau

Um die massenspektrometrische Analyse der Peptidfraktionen zu erleichtern, wurden die enthaltenen Peptide mit Endopeptidasen in kürzere Peptidketten gespalten. Dafür wurden die Enzyme Trypsin und Pepsin verwendet (vgl. Kap. 1.3, S.25). Im Folgenden wird zunächst nur auf das Peptid P2 eingegangen.

Abhängig von dem eingesetzten Enzym ergaben sich unterschiedliche Spaltpeptide. Aus den jeweils erhaltenen Spaltpeptiden (Tabelle 9, S.48 und Tabelle 10, S.48) ließ sich das Peptid P2 mit der Masse 3535 Da auf zwei unterschiedliche Arten und Weisen rekonstruieren (vgl. Abbildung 16, S.47 und Abbildung 17, S.47).

Pepsin Spaltpeptidmuster

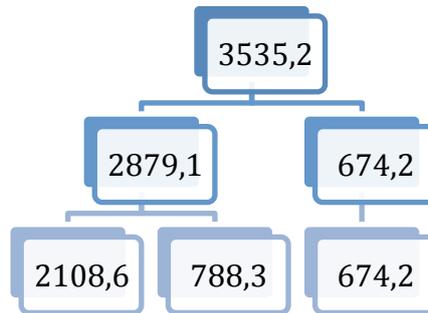


Abbildung 16: Theoretische Rekonstruktion von P2 und P3 aus den Spaltpeptiden des Pepsinverdaus der Fraktion FSN_35.3..

Trypsin Spaltpeptidmuster

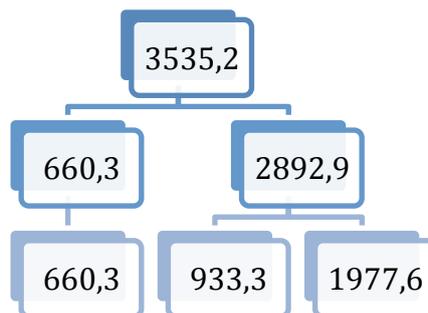


Abbildung 17: Theoretische Rekonstruktion von P2 und P3 aus den Spaltpeptiden des Trypsinverdaus der Fraktion FSN_35.3..

Hierbei zeigte der peptische Verdau zwei Hauptprodukte mit den Massen 2879,1 Da und 674,2 Da, welche zu dem intakten Peptid zusammengesetzt werden konnten. Daraus ergab sich die sequenzspezifische Spaltstelle des Pepsins an Position 26 der Peptidkette. Durch die ermittelte Peptidsequenz konnte diese als ein Isoleucin (I) oder Leucin (L), die mittels LC-MS alleine nicht zu differenzieren sind, identifiziert und somit die spezifische Spaltstelle bestätigt werden.

2879,1 674,3
GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

m/z	MG	Aminosäuresequenz
547,2	546,2	CTGP[I/L]
618,2	617,2	ACTCP[I/L] (P2)
675,2	674,2	GACTGP[I/L] (P2)
618,2	617,2	ACTGP[I/L] (P3)
675,3	674,3	GACTGP[I/L] (P3)
789,3	788,3	CVGVGGQ[I/L]
890,4	889,4	TCVGVGGQ[I/L]
1050,4	1049,4	CTCVGVGGQ[I/L]
864,3	863,3	TCFPSPVG(ohne Hexose)
924,8	1847,6	GlpCWGKGCAPWSPCQSG
1004,8	2007,6	GlpCWGKGCAPWSPCQSGC
1055,3	2108,6	GlpCWGKGCAPWSPCQSGCT
960,7	2879,1	GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]
1179,4	3535,2	GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

Tabelle 9: Reduzierte Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Pepsinverdaus von FSN_35.3. (FSN_35.3_PD) (vollständige Tabelle siehe Anhang Tabelle B 4, S.117). Die schwarz bzw. grau gekennzeichneten Spaltpeptide konnten P2 und P3 zugeordnet werden. Eine spezifische Spaltstelle von Pepsin (siehe Kap. 1.3, S.25) ist hier an Position 26 [I/L] vorhanden; alle weiteren Fragmentierungen des Peptids sind unspezifischen Ursprungs. Das weiß gekennzeichnete Fragment mit 864,3 Da ist eine Variante, die wahrscheinlich einem anderen Peptid dieser Fraktion angehört.

660,3 2892,9
GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

m/z	MG	Aminosäuresequenz
588,2	587,2	GlpC[I/L]GK
661,3	660,3	GlpCWGK
934,3	933,3	GCAPWSPC
892,8	1783,6	GCTCFPSPVGACYK*
989,8	1977,6	QSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]
965,3	2892,9	GCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L] (P2)
965,3	2892,9	GCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L] (P3)

Tabelle 10: Reduzierte Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Trypsinverdaus von FSN_35.3. (FSN_35.3_TD) (vollständige Tabelle siehe Anhang Tabelle B 5, S.118). Die schwarz bzw. grau gekennzeichneten Spaltpeptide konnten P2 und P3 zugeordnet werden. Die spezifische Spaltstelle von Trypsin ist nach dem basischen Lysin an Position fünf der Sequenz, die weitere Fragmentierung des Peptids ist unspezifischen Ursprungs. Die beiden weiß gekennzeichneten Fragmente 1783,6 Da und 587,2 Da sind Varianten, die wahrscheinlich anderen Peptiden dieser Fraktion angehören.

Im tryptischen Verdau ließ sich das gesamte Peptid aus den zwei Hauptprodukten mit 660,3 Da und 2892,9 Da rekonstruieren. Die spezifische Spaltstelle des Trypsins befindet sich in der Peptidsequenz nach Position 5 und konnte im Folgenden als ein Lysin (K) bestimmt werden.

Sowohl der peptische als auch der tryptische Verdau zeigten eine Reihe von weiteren Peptidfragmenten, die nicht durch spezifische enzymatische Spaltung entstanden sind. Auffällig war hierbei, dass diese unspezifischen Fragmentierungen häufig in den umgebenden Sequenzbereichen der modifizierten Cysteine stattfanden.

3.2.2.2 Sequenzierung der Peptide P2 und P3

Zur Bestimmung der Peptidsequenz wurden die Spaltpeptide der Fraktion FSN_35.3 mittels LC-MS analysiert und die Fragmentationenspektren der Spaltpeptide, die dem Peptid P2 zugeordnet wurden, genauer interpretiert. Im Folgenden wird bei der Interpretation ausschließlich auf das Peptid P2 eingegangen, die Sequenz ist aber ebenso repräsentativ für die Sequenz von P3, worauf am Ende dieses Kapitels noch genauer Bezug genommen wird.

Zunächst wird anhand der N-terminalen Sequenz des Peptids P2 die Vorgehensweise bei der Interpretation der Spektren exemplarisch erläutert.

Glp**CW**KG**K**GCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[**I**/L]GACTGP[**I**/L]

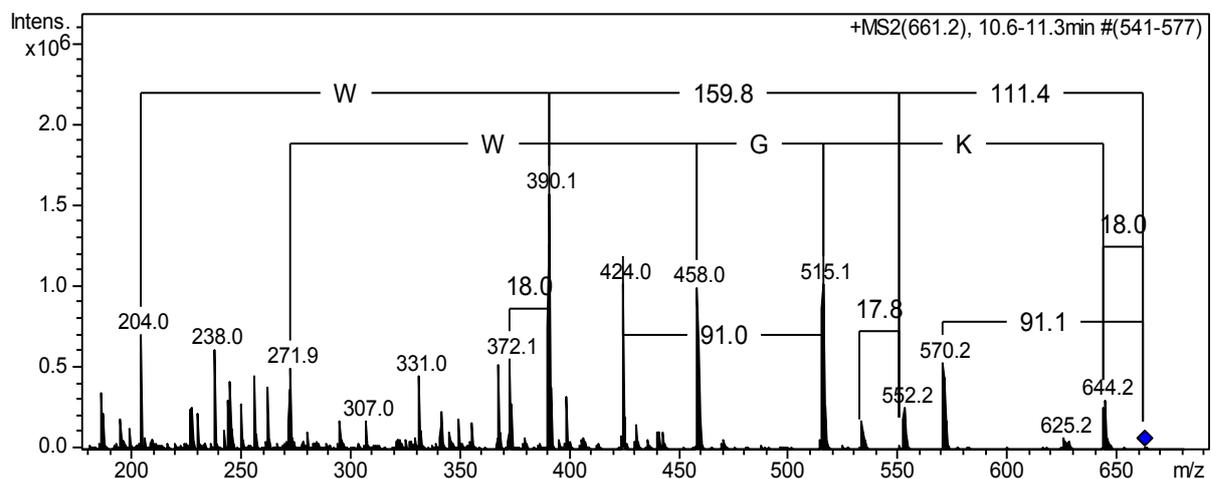


Abbildung 18: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids bei m/z 661,2 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 10, S.48).

Das MS²-Spektrum des tryptischen Fragments m/z 661,2 zeigt vor allem im höheren m/z-Bereich sehr klar zuordenbar Massenpeaks, aus welchen zunächst über die b-Ionenserie und anschließend über die y-Ionenserie vom C- zum N-Terminus die Aminosäuresequenz ausgelesen wurde.

Die blaue Markierung im Spektrum (vgl. Abbildung 18, S.49) stellt die Ionenmasse des intakten $[M+H]^+$ -Ions dar. Durch einen Wasserverlust (-18 Da) des C-Terminus ergibt sich ein Peak bei m/z 643,2. Von diesem Peak ausgehend, zeigt das Spektrum den C-terminalen Verlust eines Lysins (K; $\Delta m=128$ Da) zu dem Peak m/z 515,1. Diese Interpretation wurde durch die Tatsache bestätigt, dass es sich dabei um die tryptische Spaltstelle handelt und Trypsin eben nur nach den basischen Aminosäuren Lysin oder Arginin spaltet. Der nächste Massenpeak im Spektrum bei m/z 458,0 zeigt deutlich die Abspaltung eines Glycins (G; $\Delta m=57$ Da). Daraus ergab sich für die C-terminale Sequenz zunächst, die Abfolge GK. Die weitere sinnvolle Interpretation des Spektrums ließ ein Tryptophan (W; $\Delta m=186$ Da) vermuten, woraus sich der Massenpeak bei m/z 271,9 erklärt. Diese Annahme konnte zusätzlich durch die Gegenionenserie, die bei m/z 204,0 beginnt, im Spektrum und auch rechnerisch bestätigt werden. Auf Grund des „low mass cut off“ wurde die Sequenzierung in der y-Ionenserie weitergeführt. Die Gegenionen zu den oben beschriebenen b_2 (m/z 271,9) und b_3 (m/z 390,1) Ionen sind in der y-Ionenserie bei m/z 204,0 und m/z 390,1 zu finden. Darauf folgend konnte in der y-Serie ein modifiziertes Cystein (160 Da) aus der Massendifferenz zu dem Peak m/z 550,1 identifiziert werden. Zur Vervollständigung der Peptidsequenz des Spaltpeptids wurde die Differenz aus der Gesamtmasse des Spaltpeptids und der Summe der bis dato sequenzierten Aminosäuren CWGK gebildet. Daraus ergab sich eine N-terminale Aminosäure mit einer Masse von 111 Da; das entspricht einer Pyroglutaminsäure (Glp). Dadurch erhielt man die gesamte Aminosäureabfolge des Spaltpeptids mit 660,2 Da: GlpCWGK.

Die Zyklisierung einer N-ständigen Glutaminsäure (E) oder eines N-ständigen Glutamins (Q) ist nicht unüblich und in der Literatur häufig beschrieben.

GlpCWGK**GCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]**

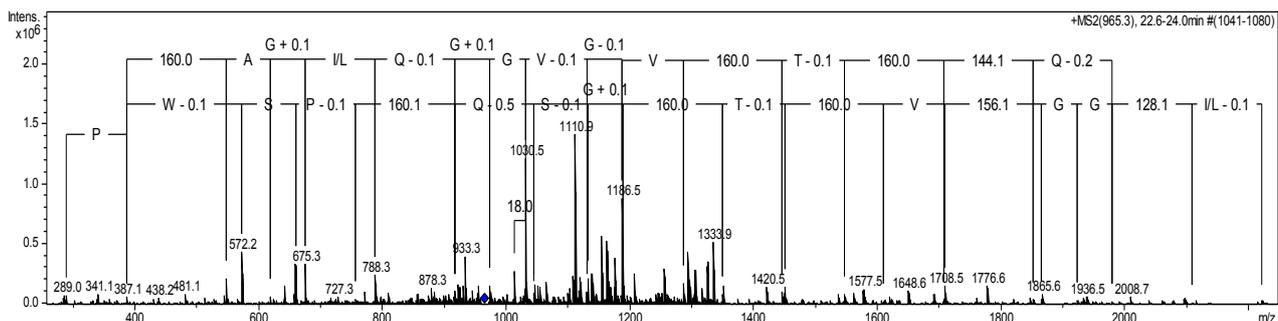


Abbildung 19: Das MS²-Spektrum des $[M+3H]^{3+}$ -Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 965,3 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 10, S.48).

GlpCWGKGCAPWSPCQSGTCTCVG**GGQ**[I/L]GACTGP[I/L]

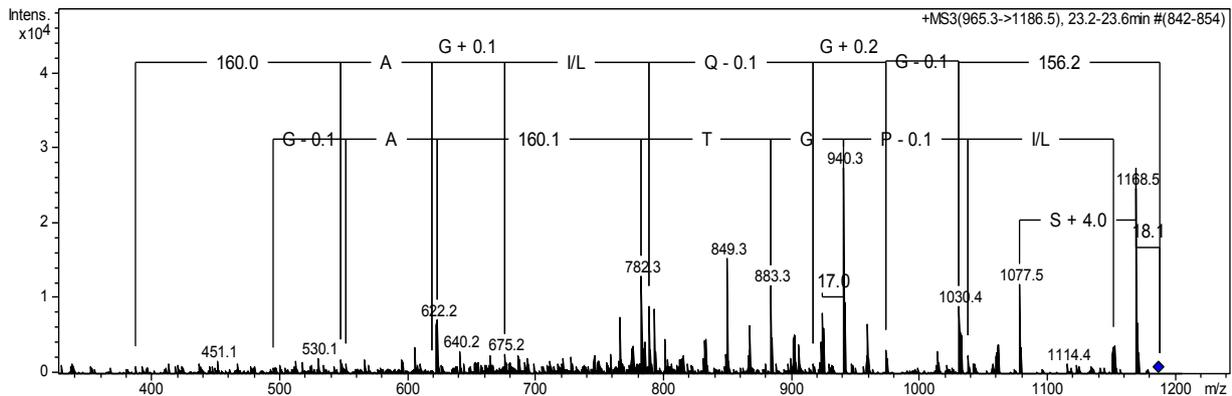


Abbildung 20: Das MS³-Spektrum (m/z 965,3->1186,5) ausgehend von dem [M+3H]³⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids mit der Masse 2892,9 Da aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 10, S.48).

GlpCWGKGCAPWSPC**QSGTCTCVG**GGQ[I/L]GACTGP[I/L]

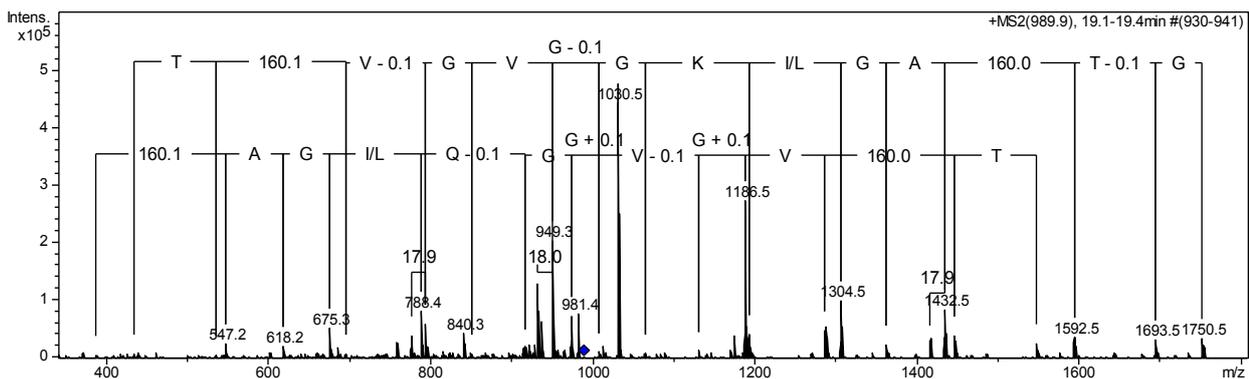


Abbildung 21: Das MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 989,9 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 10, S.48).

Das komplementäre Spaltpeptid zur oben beschriebenen N-terminalen Sequenz GlpCWGK ist das Spaltpeptid m/z 965,3 (2892,9 Da). Es repräsentiert den gesamten Rest der Sequenz, das P2 zum intakten Peptid vervollständigt. Aufgrund der Größe dieses Peptids konnte die Sequenz nur zum Teil aus dem MS²-Spektrum ausgelesen werden. (vgl. Abbildung 19, S.50). Aus dem MS³-Spektrum m/z 965,3->1186,5 konnte allerdings die C-terminale Sequenz des Peptids sequenziert werden (vgl. Abbildung 19, S.50 und Abbildung 20, S.51). Zur Bestätigung der ermittelten Sequenz wurden einerseits die Spektren sequenzüberlappender Spaltpeptide miteinander abgeglichen (Tabelle 10, S.48) und andererseits die Sequenzinformationen aus den Spaltpeptiden des peptischen Verdau herangezogen (vgl. Tabelle 9, S.48).

Die gesamte Sequenz konnte auch durch die beiden peptischen Spaltpeptide mit den Massen 2879,1 Da und 674,2 Da abgedeckt werden (Abbildung 22, S.52 und Abbildung 27, S.54).

Aus dem N-terminalen Verdauprodukt 2879,1 Da konnte die Aminosäurefolge GlpCWGK**GCAPWSPCQSG**CTCVGVGGQ[I/L] sequenziert werden. Dadurch konnte die kleine Sequenzlücke (Position 6-8) geschlossen werden, die nach der Analyse der tryptischen Spaltpeptide noch offen war.

Gl**pCWGKGCAPWSPCQSG**CTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

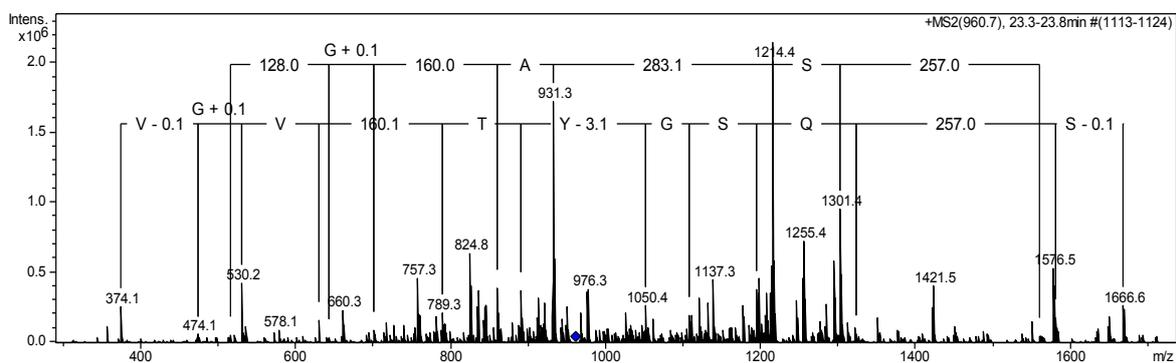


Abbildung 22: Das MS²-Spektrum des [M+3H]³⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 960,7 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 9, S.48).

Durch unspezifische Spaltung im Bereich zweier modifizierter Cysteine an den Positionen 17 und 19 entstanden aus dem Verdauprodukt 2879,1 Da die beiden Spaltpeptide 2108,6 Da und 788,3 Da. Durch das MS²-Spektrum und das MS³-Spektrum des Spaltpeptids 2108,6 Da (m/z 1055,3), (Abbildung 23, S.53 und Abbildung 24, S.53) konnte die Sequenz GlpCWGK**GCAPWSPCQSG**CTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L] (Position 6-8), die aus der Interpretation des Spektrums m/z 960,7 schon bekannt war, nochmals bestätigt werden.

GIpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

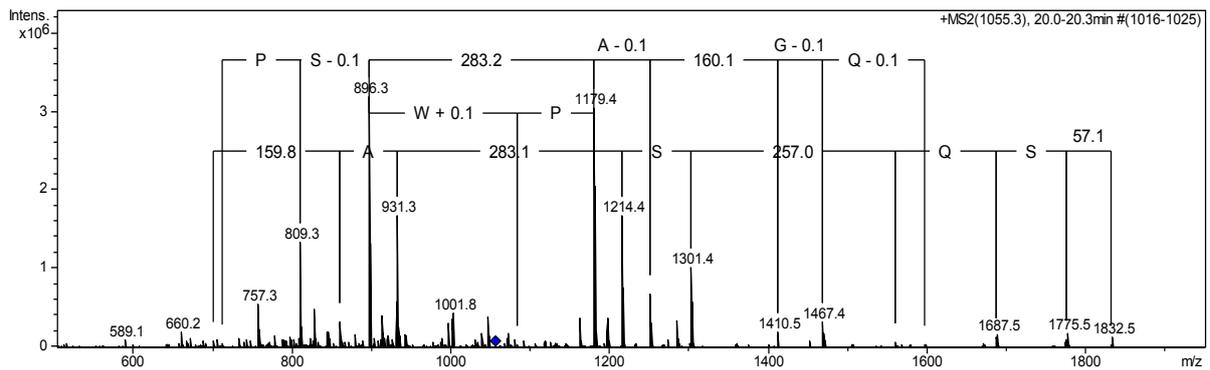


Abbildung 23: Das MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 1055,3 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 9, S.48).

GIpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

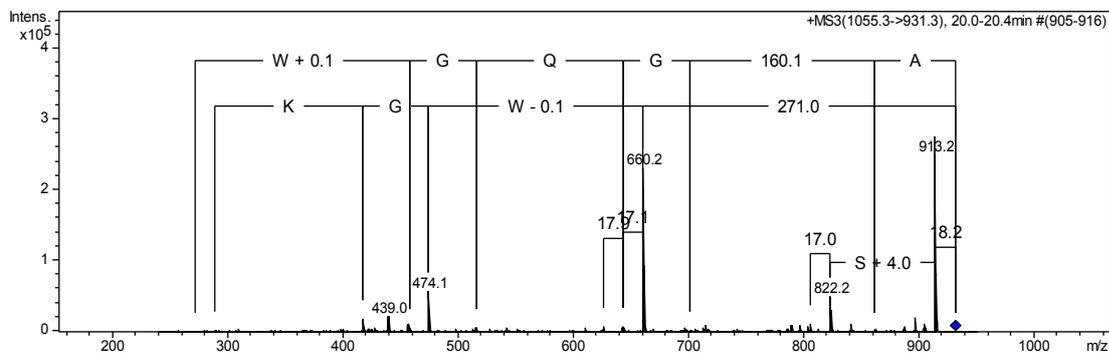


Abbildung 24: Das MS³-Spektrum (m/z 1055,3->931,3) ausgehend von dem [M+2H]²⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids mit der Masse 2108,6 Da aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 9, S.48).

GIpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

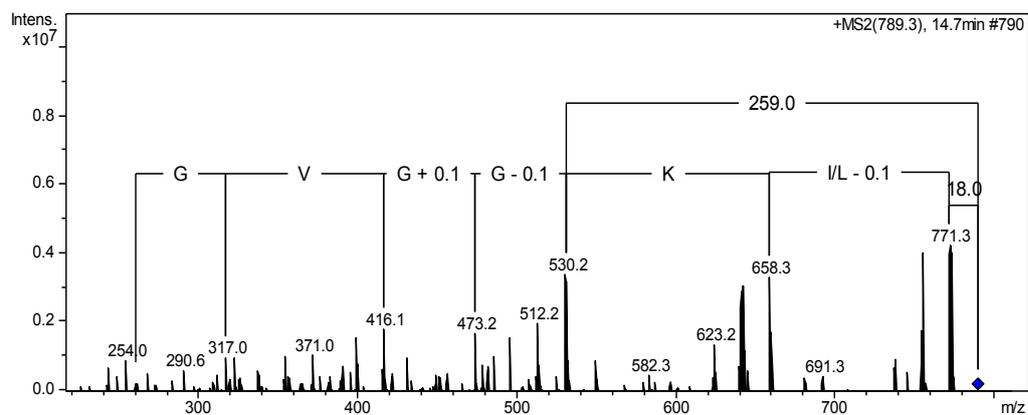


Abbildung 25: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 789,3 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 9, S.48).

GIpCWGKGCAPWSPCQSGCT**CVGVGGQ**[I/L]GACTGP I/L

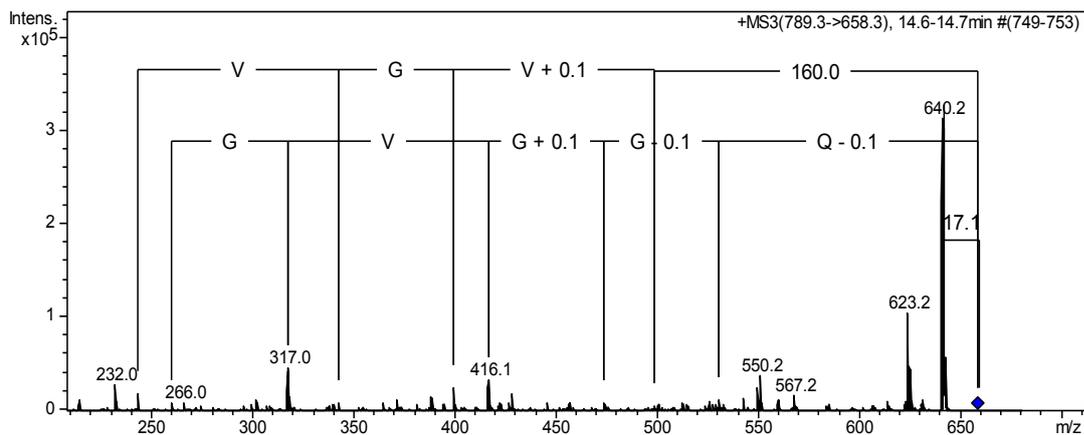


Abbildung 26: Das MS³-Spektrum (m/z 789,3->658,3) ausgehend von dem [M+H]⁺-Ion des Pepsin Spaltpeptids mit der Masse 788,3 Da aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 9, S.48).

Die C-terminale Sequenz konnte durch die Interpretation des Spektrums des peptischen Spaltpeptids mit 674,4 Da sequenziert werden. Die aus dem tryptischen Verdau bereits bekannte Sequenz GACTGP[I/L] konnte somit nochmals eindeutig bestätigt werden.

GIpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]**GACTGP**[I/L]

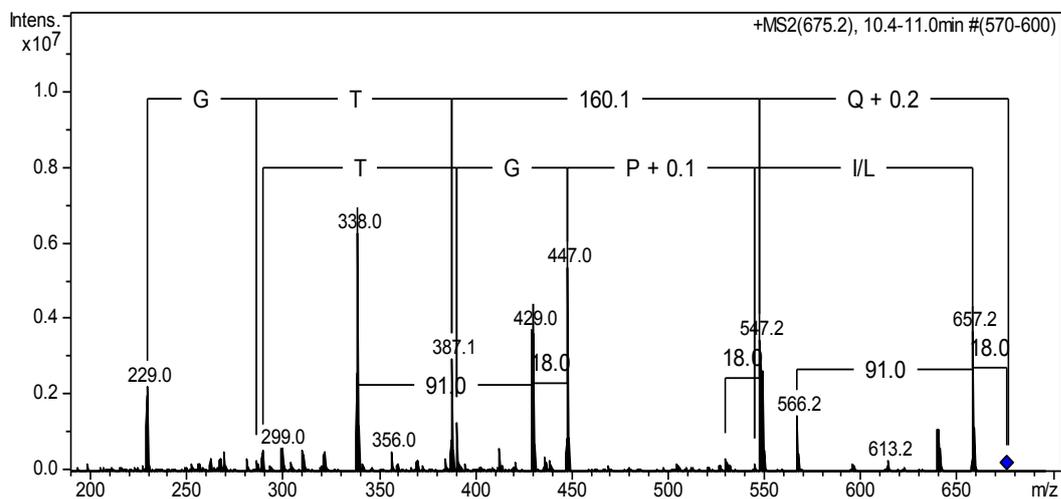


Abbildung 27: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 675,2 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 9, S.48). Diese Variante wurde dem früher eluierenden Peptid P2 zugeordnet.

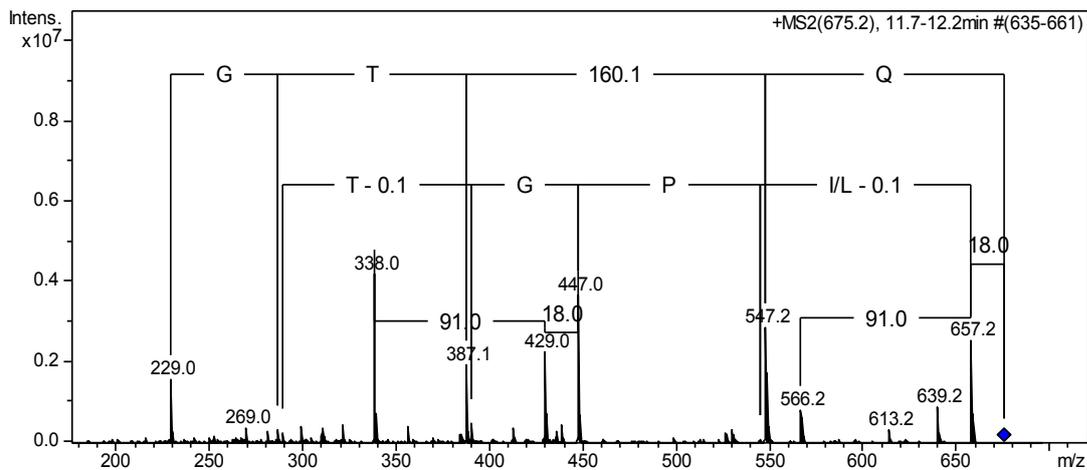


Abbildung 28: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 675,2 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 9, S.48). Diese Variante wurde dem später eluierenden Peptid P3 zugeordnet.

Auf Grund der Tatsache, dass alle Fragmente, welche die C-terminale Sequenz enthielten, je zweimal zu unterschiedlichen Retentionszeiten erscheinen, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem beschriebenen Peptid um ein Isomerenpaar handelt. Zu den C-terminalen Sequenzen gehören das tryptische Spaltpeptid mit 2892,9 Da, sowie das peptische Spaltpeptid mit 674,4 Da. Auch das intakte Peptid mit der Masse 3535,2 Da erschien im Basispeakchromatogramm bei 19,9 min und 20,1 min zweimal (vgl. Abbildung 15, S.45 und Tabelle 8, S.20). Um exemplarisch zu beweisen, dass es sich bei den Spaltpeptiden tatsächlich um mittels MS nicht zu unterscheidende Sequenzen handelt, sind in Abbildung 27, S.54 und Abbildung 28, S.55, die Spektren der C-terminalen Spaltpeptide m/z 675,4 aus dem peptischen Verdau, die bei 10,4-11,0 min und 11,7-12,2 min eluieren, dargestellt.

Da die Retentionsverschiebung auch bei kleinsten Fragmenten des C-Terminus wie bei 617,2 Da festzustellen war, konnte der Bereich in dem die isomere Aminosäure lokalisiert ist auf die Sequenz: ACTGP[I/L] eingeschränkt werden.

Die Aminosäuren Isoleucin (I) und Leucin (L) sind Isomere (C₆H₁₃NO₂) mit exakt dem selbe Molekulargewicht, die im Massenspektrum somit nicht durch eine Massendifferenz zu unterscheiden sind. Aufgrund dessen ließ sich vermuten, dass der isomere Unterschied, der zu der Retentionszeitverschiebung zwischen den beiden Peptidvarianten führt, in einem Austausch von Isoleucin (I) und Leucin (L) an Position 33 begründet ist.

Um diese Hypothese beweisen zu können, müssen künftig noch Vergleichsexperimente mit synthetisierten Peptiden durchgeführt werden, die bereits in Planung sind.

Die Peptidsequenz der Isomere P2 und P3 beinhaltet sechs Cysteine, die drei Disulfidbrücken ausbilden (siehe Kap. 4.1, S.95).

Auffällig war, dass die unspezifische Spaltung der Peptidketten vor allem an den modifizierten Cysteinen im mittleren Sequenzbereich stattfand.

Zusätzlich bleibt zu erwähnen, dass nicht alle erhaltenen Spaltpeptide in den hier aufgeführten Tabellen, Tabelle 9, S.48 und Tabelle 10, S.48, enthalten sind. Vollständigere Tabellen sind im Anhang zu finden. Einige Spaltpeptide, die von anderen intakten Peptiden stammen und auch teilweise in anderen Fraktionen sequenziert wurden, sind hier nicht aufgelistet.

3.2.2.3 Interpretation weiterer Spektren

Viele der intensiven Spaltpeptide aus dem tryptischen- und peptischen Verdau von FSN_35.3. ließen sich auf die spezifische und unspezifische Proteolyse von P2 und P3 zurückführen (vgl. Tabelle 9, S.48 und Tabelle 10, S.48).

Ausnahmen waren das peptische Spaltpeptid 863,3 Da und die tryptischen Spaltpeptide 1783,6 Da und 587,2 Da. Ersteres konnte einer Variante (ohne Hexose) des Peptids P1 zugeordnet werden, das aus der Fraktion FSN_31.4. sequenziert wurde (siehe Kap. 3.2.4, S.65). Bei dem tryptischen Spaltpeptid mit der Masse 1783,6 Da handelte es sich ebenfalls um eine Variation von P1, bei welchem die C-terminale Aminosäure nicht eindeutig zugeordnet werden konnte (vgl. Tabelle 10, S. 48). Da das Spektrum sonst gut zu interpretieren war, lässt sich eine nicht weiter geklärte Modifikation vermuten.

Das Fragment 587,2 Da, das eindeutig als GlpC[I/L]GK sequenziert werden konnte (Abbildung 29, S.57), ist dem N-Terminus GlpCWGK sehr ähnlich und konnte als alternative N-terminale Sequenz in FSN_35.3_TD (siehe Kap. 2.4, S.33) identifiziert werden. Das Spaltpeptid ist auch der N-terminalen Sequenz des Peptids aus FSN_31.4. (VQC[I/L]GK) sehr ähnlich und stellt die um eine Aminosäure verkürzte und zyklisierte Variante dar. Die richtige Zuordnung der Termini zu den Peptiden erfolgte zum einen über semi-quantitative Abschätzung der Spaltpeptide – d.h. ein potentieller N-Terminus eines hoch konzentrierten Peptids muss ebenfalls eine hohe Konzentration aufweisen. Bestätigt wurde es rechnerisch durch die Rekonstruktion des intakten Peptids aus den

Spaltpeptiden. Dadurch konnte die Variante GlpCWGK als N-Terminus der hier sequenzierten Peptide P2 und P3 identifiziert werden. Eine Zuordnung der Sequenz GlpC[I/L]GK als N-Terminus eines bestimmten Peptids konnte im Rahmen der Arbeit nicht gemacht werden.

GlpC[I/L]GK

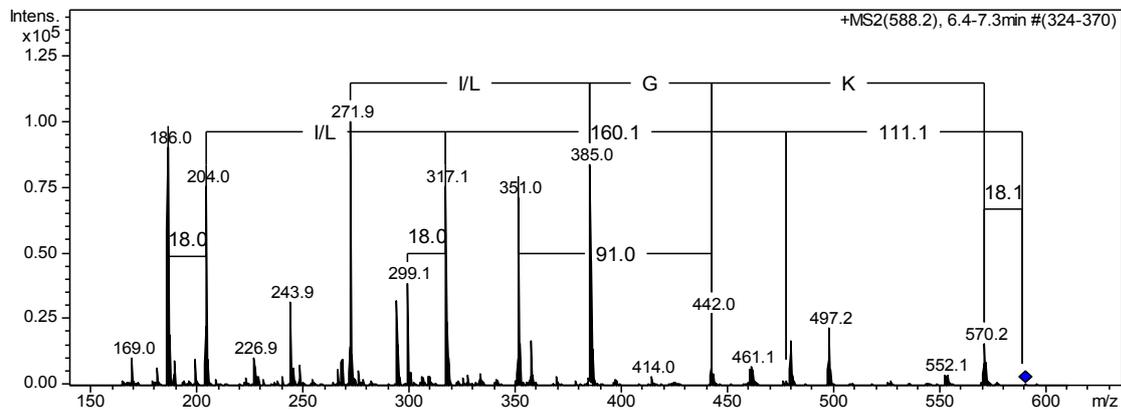


Abbildung 29: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 588,2 aus Fraktion FSN_35.3. (Tabelle 10, S.48).

3.2.3 FSN_39.2.

Aus der Fraktion FSN_39.2., die als zweite Unterfraktion mit 39%-igem Acetonitril über die SPE (Kap. 2.4, S.33) eluiert wurde, konnte das Peptid P4 sequenziert werden (siehe Tabelle 11, S.58). Wie die Abbildung 30, S.57, zeigt, handelt es sich bei der Fraktion um eine Peptidmischung mit drei Hauptkomponenten. Diese eluierten bei 17,6 min, 20,7 min und 22,4 min. Im Rahmen der Arbeit wurde das Peptid mit der größten Intensität, das bei 20,7 min eluierte und die Masse 3549,0 Da besitzt, sequenziert.

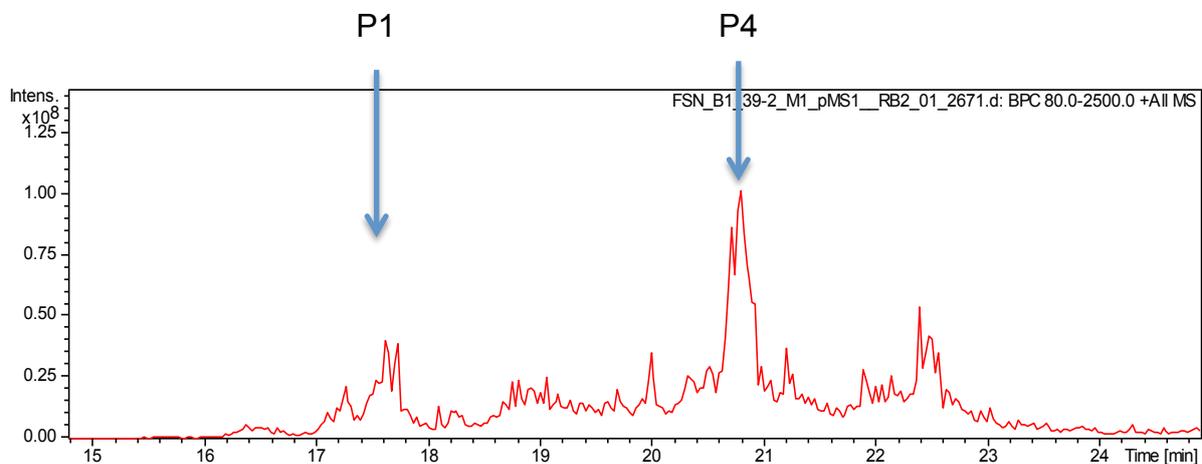


Abbildung 30: Basispeakchromatogramm der reduzierten und alkylierten Peptidfraktion FSN_39.2. zeigt die drei Hauptpeptide, die bei ca. 17,6 min, 20,7 min und 22,4 min eluieren.

m/z	MW	Peptid	Mod	35.3.	35.4.	39.1.	39.2.
1229,0	3684,0	P1	+Hex	xxx	x	x	x
1283,0	3846,0	P1	+2Hex	xx	(x)	(x)	(x)
1244,4	3730,2		+46	xx	x	(x)	(x)
1179,4	3535,2	P2		xxx	xxx	xx	(x)
1179,3	3534,9	P3		xxx	xxx	xxx	(x)
1192,0	3573,0			xx	x	x	(x)
1184,0	3549,0	P4		x	x	xx	xxx
1220,3	3657,9						x

Tabelle 11: Ergebnisse der semi-quantitativen Auswertung der reduzierten und alkylierten Peptide der Fraktionen FSN_35.3.-39.2.. Die Tabelle enthält die Molekulargewichte der wesentlichen Peptide der Fraktionen. Die vollständige Tabelle ist im Anhang zu finden (Tabelle B 1, S.111).

3.2.3.1 Enzymatischer Verdau

Je ein Probenaliquot der Peptidfraktion wurde analog wie FSN_35.3. mit den Enzymen Trypsin bzw. Pepsin verdaut (Kap. 2.7, S.36). Dabei ergaben sich die folgenden Spaltpeptide, die Tabelle 12 und Tabelle 13 zu entnehmen sind.



m/z	MG	Aminosäuresequenz
393,1	392,1	TC[I/L]
553,2	552,2	CTC[I/L]
530,2	529,2	GVGGQ[I/L]
675,2	674,2	GACTGP[I/L] (1.Isomer)
405,1	404,1	[I/L]C[I/L]
655,2	1308,4	CAPWSPCQSGC
662,2	1322,4	CAPWSPCQTGC
1186,5	1185,4	GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L] (1.Isomer)
998,4	997,4	GlpCWGF (+Hex)
1004,8	2007,6	GlpCWGKGCAPWSPCQSGC
924,8	1847,6	GlpCWGKGCAPWSPCQSG
1191,9	2381,8	GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTC[I/L]

Tabelle 12: Reduzierte Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Pepsinverdaus von FSN_39.2. (vollständige Tabelle siehe Anhang Tabelle B 6, S.118). Die schwarz bzw. grau gekennzeichneten Spaltpeptide konnten P4 zugeordnet werden. Die pepsinspezifischen Spaltstellen sind nach Position 20 und 26 [I/L] in der Sequenz; die weitere Fragmentierung des Peptids ist unspezifischen Ursprungs.



m/z	MG	Aminosäuresequenz
661,3	660,3	GlpCWGK
934,2	933,2	GCAPWSPC
996,7	1991,4	QSGCTC[I/L]GVGGQ [I/L] GACTGP[I/L]
969,9	2906,7	GCAPWSPCQSGCTC[I/L]GVGGQ [I/L] GACTGP[I/L]

Tabelle 13: Reduzierte Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Trypsinverdaus von FSN_39.2. (FSN_39.2_TD) (vollständige Tabelle siehe Anhang Tabelle B 7, S.120). Die schwarz bzw. grau gekennzeichneten Spaltpeptide konnten P4 zugeordnet werden. Die trypsinspezifische Spaltstelle ist nach dem basischen Lysin an Position fünf in der Sequenz; die weitere Fragmentierung des Peptids ist unspezifischen Ursprungs.

Die erhaltenen Spaltpeptide der enzymatischen Verdauung zeigten, wie auch schon bei der Fraktion FSN_35.3., enzymespezifische und unspezifische Spaltstellen.

Aus den peptischen Spaltpeptiden ließ sich das intakte Peptid auf zwei verschiedene Weisen rekonstruieren. Das intakte Peptid konnte aus den Spaltpeptiden 2381,8 Da und 1185,4 Da zusammengesetzt werden, wobei das Spaltpeptid 2381,8 Da wiederum sowohl aus den Spaltpeptiden 1847,6 Da und 552,2 Da, als auch aus den Spaltpeptiden 2007,6 Da und 392,1 Da zusammengesetzt werden konnte. Das Spaltpeptid mit 1185,4 Da konnte aus den Spaltpeptiden 529,2 Da und 674,2 Da rekonstruiert werden (siehe Abbildung 31, S.59).

Dabei ließen sich die enzymespezifischen Spaltstellen nach den Positionen 20 und 26 lokalisieren, die im Folgenden als ein Leucin bzw. Isoleucin [I/L] identifiziert wurden. Zusätzlich zeigte sich eine unspezifische Fragmentierung vor dem modifizierten Cystein an Position 7 sowie vor und nach dem modifizierten Cystein an Position 17 (vgl. Tabelle 12, S.58).

Pepsin Spaltpeptidmuster

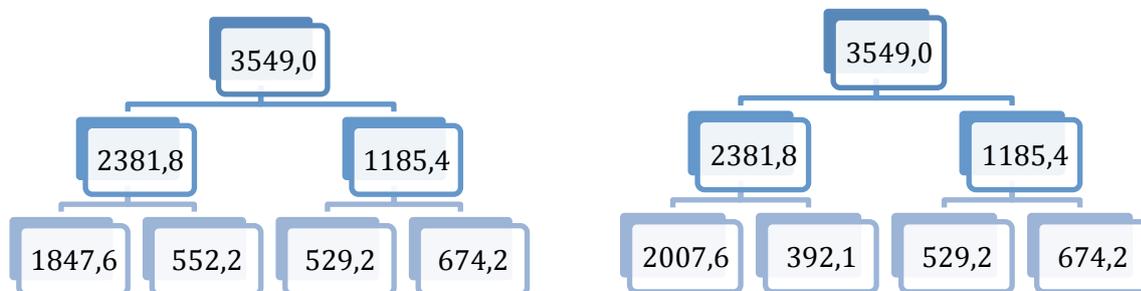


Abbildung 31: Theoretische Rekonstruktion des Peptids P4 aus den peptischen Spaltpeptiden der Fraktion FSN_39.2..

Aus den tryptischen Spaltpeptiden mit 660,3 Da und 2906,7 Da (Abbildung 32, S.60) ließ sich ebenfalls theoretisch das intakte Peptid P4 rekonstruieren. Die Spaltpeptide entstehen durch die spezifische tryptische Spaltung nach dem basischen Lysin an Position 5. Das größere Spaltpeptid (2906,7 Da) konnte aus den Spaltpeptiden 933,2 Da und 1991,4 Da, die durch unspezifische Spaltung nach einem Cystein an Position 13 entstanden sind, zusammengesetzt werden (vgl. Abbildung 32, S. 60 und Tabelle 13, S.59).

Trypsin Spaltpeptidmuster

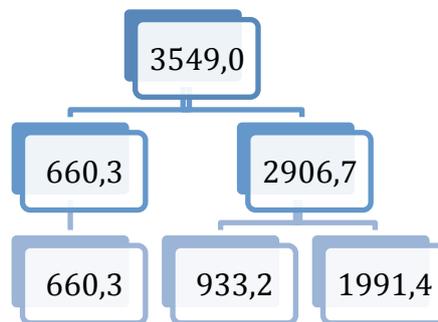


Abbildung 32: Theoretische Rekonstruktion des Peptids P4 aus den tryptischen Spaltpeptiden der Fraktion FSN_39.2..

3.2.3.2 Sequenzierung des Peptids P4

Bei der Interpretation der Spektren der enzymatischen Spaltpeptide (FSN_39.2_PD und FSN_39.2_TD) wurden vermehrt bereits bekannte Sequenzinformationen genutzt. Hierfür wurden Spektren von Spaltpeptiden gleicher Masse aus anderen Fraktionen mit Spektren aus der FSN_39.2. verglichen und bei einer Übereinstimmung die Sequenz übernommen. Die N-terminale Sequenz des neuen Peptids wurde auf diese Weise bestimmt. Der direkte Vergleich der Spektren von m/z 661,2 aus den Trypsinverdauen von FSN_35.3. und FSN_39.2. zeigte, dass es sich hierbei um die gleiche Sequenz GlpCWGK handelt (vgl. Abbildung 33, S.61).

GlpCWGKGCAPWSPC**QSGCTC**[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

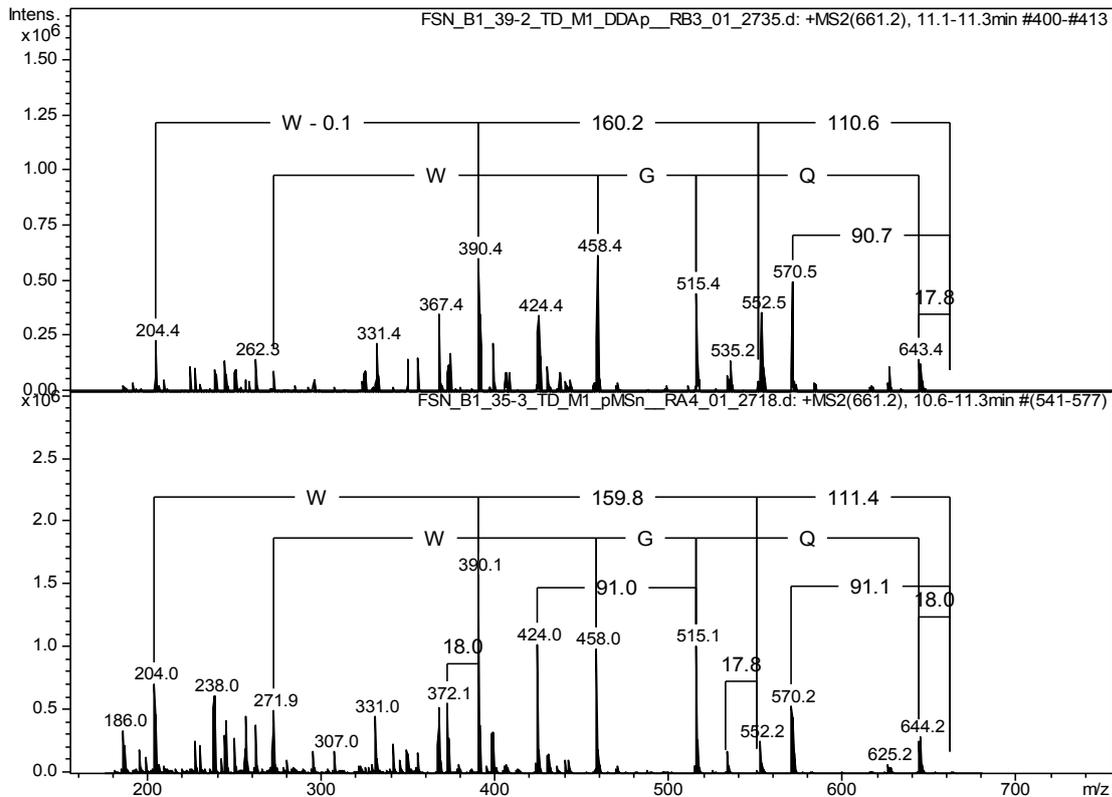


Abbildung 33: Die MS²-Spektren des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 661,2 im Vergleich, das sowohl in Fraktion FSN_35.3. (unteres Spektrum) als auch in FSN_39.2. (oberes Spektrum) vorkommt.

Das tryptische Spaltpeptid 2906,7 Da (m/z 969,9) ist das komplementäre Verdauprodukt zu der oben beschriebenen N-terminalen Sequenz. Aus dem Spektrum ließ sich, hauptsächlich im Vergleich mit dem Spaltpeptid bei m/z 965,3 aus FSN_35.3., die Sequenz **GCAPWSPCQSGCTC**[I/L] **GVGGQ**[I/L]**GACTGP**[I/L] auslesen.

Aus dem Vergleich der Spaltpeptidspektren von m/z 969.9 (FSN_39.2.) und m/z 965,3 (FSN_35.3.) wurde ersichtlich, dass sich die Sequenzen der beiden Spaltpeptide durch den Austausch eines Valins (V) mit einem Leucin (L) bzw. Isoleucin (I) an Position 20 unterscheiden (vgl. Abbildung 34, S.62). Dies ließ sich bereits aus dem veränderten Spaltpeptidmuster des peptischen Verdaus vermuten, da durch den Austausch eine neue peptische Spaltstelle entstanden ist.

GlpCWGKGCAPW**SPCQSGCTC**[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

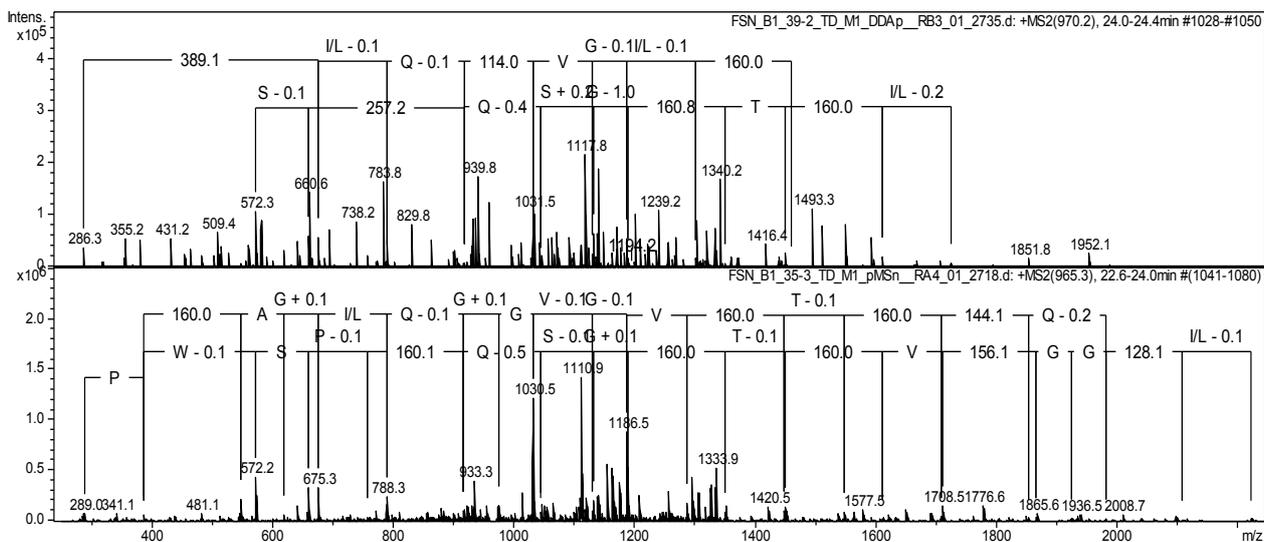


Abbildung 34: MS²-Spektrum des [M+3H]³⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 969,9 (FSN_39.2., oberes Spektrum) im Vergleich mit dem MS²-Spektrum des [M+3H]³⁺-Ions 965,3 m/z (FSN_35.3., unteres Spektrum).

GlpCWGKGCAPW**SPC**QSGCTC[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

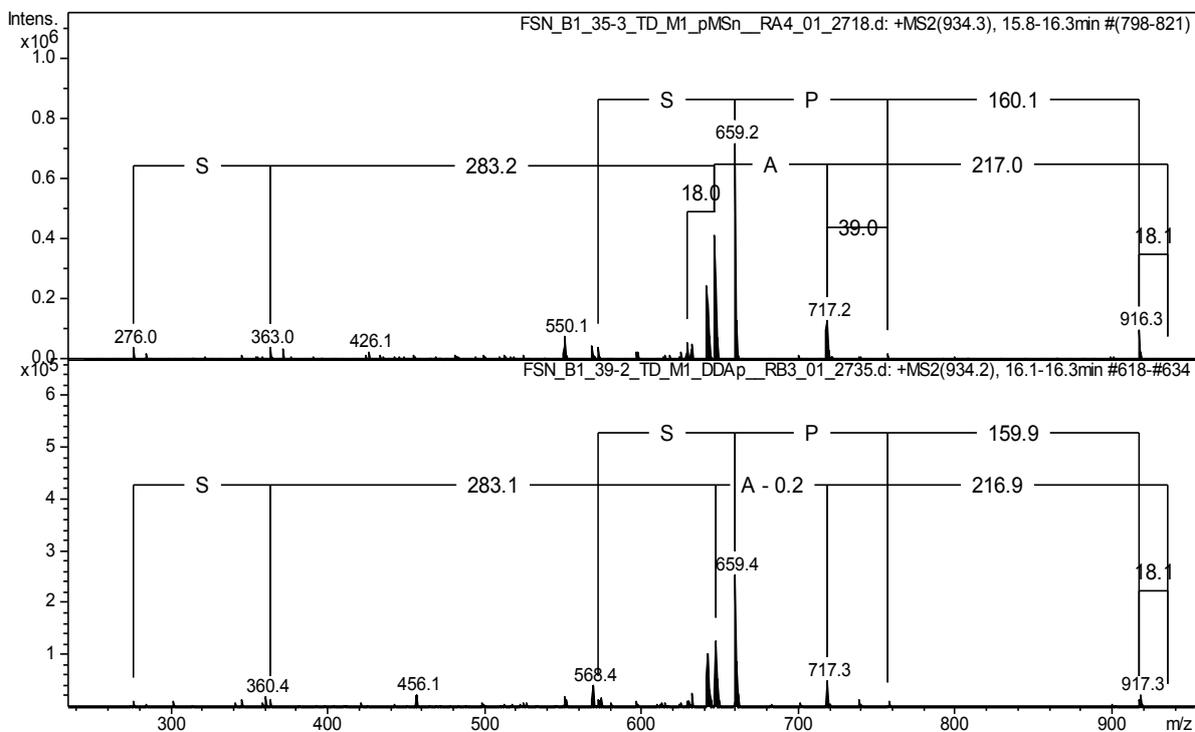


Abbildung 35: MS²-Spektrn des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 934,2 aus Fraktion FSN_35.3. (oberes Spektrum) und FSN_39.2. (unteres Spektrum) im Vergleich.

Der Sequenzteil GCAPWSPC, der auch aus dem Spaltpeptid m/z 970,2 nicht sequenziert werden konnte, wurde durch das unspezifische tryptische Spaltpeptid m/z 934,2, das bereits in der Fraktion FSN_35.3. vorhanden war, bestätigt (siehe Abbildung 35, S.62).

Das intakte Peptid P4 konnte auch aus den peptischen Spaltpeptiden 2381,8 Da und 1185,4 Da zusammengesetzt werden. Das N-terminale Spaltpeptid 2381,8 Da selbst konnte sowohl aus den Spaltpeptiden 1847,6 Da und 552,2 Da, als auch aus den Spaltpeptiden 2007,6 Da und 392,1 Da zusammengesetzt werden (siehe Abbildung 31, S.59).

Durch die Sequenzierung des Spaltpeptids m/z 1191,9 (2381,8 Da), (Abbildung 36, S.63) erschloss sich der Sequenzbereich zwischen Position 6 und 18, der bereits durch die Sequenzinformation aus den tryptischen Spaltpeptiden bei m/z 934,2 und m/z 969,9 bekannt war (siehe Abbildung 35, S.62 und Abbildung 34, S.62). Die N-terminale Sequenz von P4 kann aus den Spektren der peptischen Verdauprodukte nicht sequenziert, sondern nur rechnerisch bestätigt werden.

GlpCWGK**GCAPWSPCQSGCT**[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGPTGP[I/L]

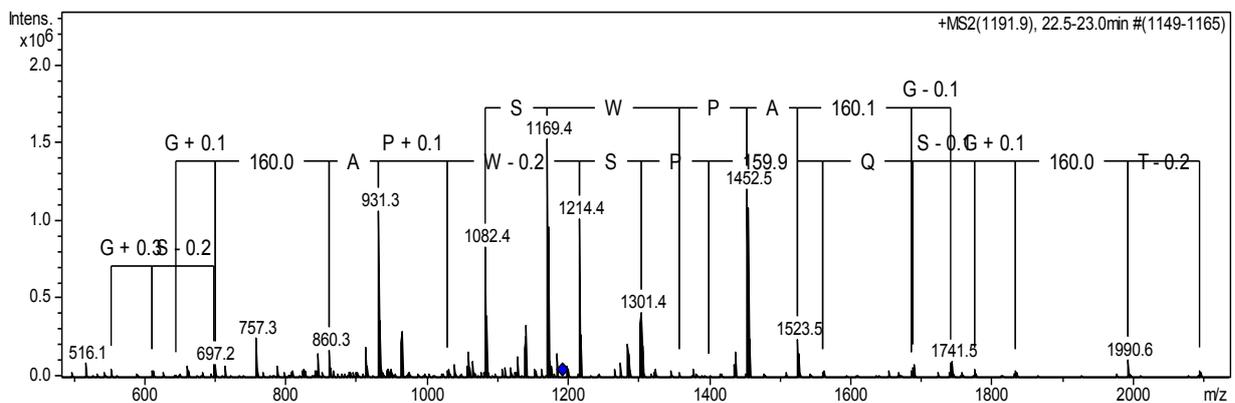


Abbildung 36: MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 1191,9 aus FSN_39.2..

GIpCWGKGCAPWSPCQSG**CTC[I/L]**GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

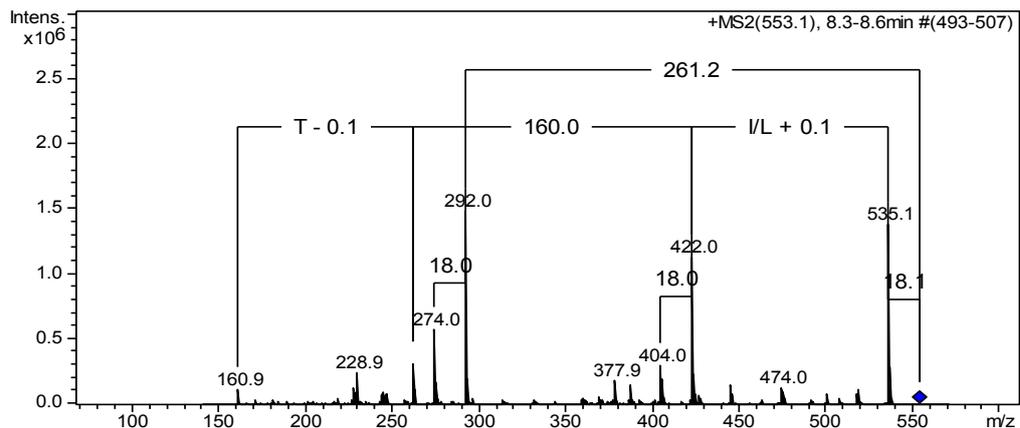


Abbildung 37: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 553,1 aus FSN_39.2..

Die C-terminale Sequenz des N-terminalen Spaltpeptids m/z 1191,9 konnte auch durch das Spaltpeptid m/z 553,1 belegt werden (siehe Abbildung 37, S.64). Damit konnte der Aminosäureaustausch (Position 20) eines Valins (V) gegen ein Leucin (L) bzw. Isoleucin (I), was bereits aus dem tryptischen Verdau bekannt war, eindeutig bestätigt werden.

Das C-terminale Spaltpeptid 1185,4 Da konnte aus den Spaltpeptiden 529,2 Da und 674,2 Da rekonstruiert werden. Durch diese konnte die Sequenz somit vollständig beschrieben werden. Aus den Spektren konnte die Sequenzinformation **GVGGQ[I/L]** (529,2 Da) und die C-terminale Sequenz **GACTGP[I/L]** (674,2 Da) gewonnen werden (siehe Abbildung 38, S.64 und Abbildung 39, S.65). Letztere ist, auch bezüglich der Retentionszeit, identisch mit dem Peptid P2 (vgl. Abbildung 27, S.54).

GIpCWGKGCAPWSPCQSG**CTC[I/L]**GV**GGQ[I/L]**GACTGP[I/L]

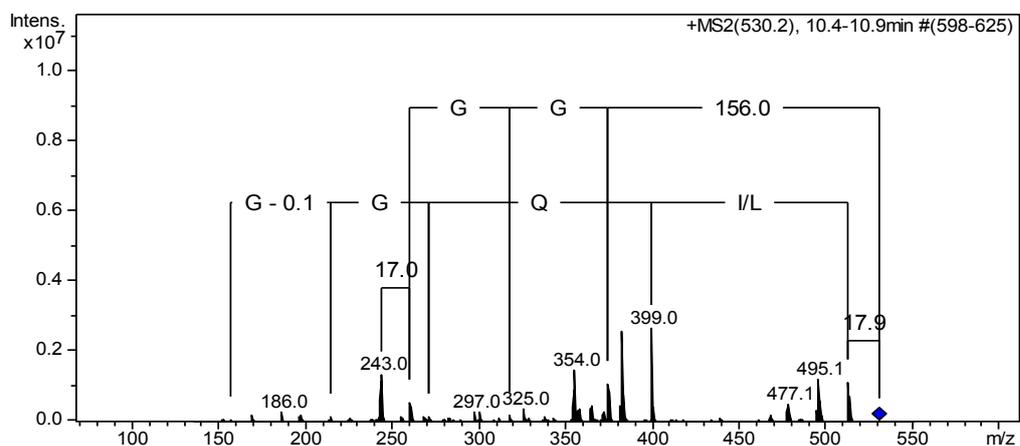


Abbildung 38: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 530,2 aus Fraktion FSN_39.2..

GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTC[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]

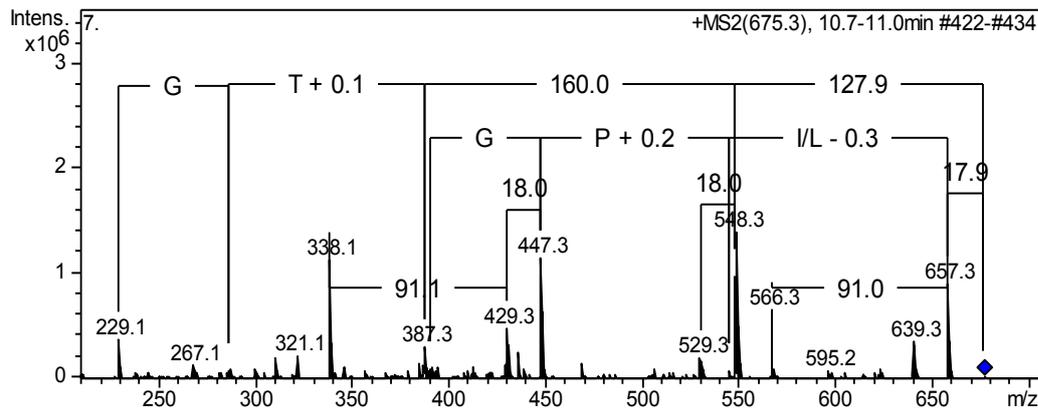


Abbildung 39: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 675,3 aus Fraktion FSN_39.2..

Durch die Sequenzinformationen aus den MS-Spektren der enzymatischen Spaltpeptide ließ sich die gesamte Aminosäuresequenz des Peptids P4 GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTC[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L] aufklären.

Durch einen theoretischen Enzymverdau der Sequenz mit dem Programm Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>) konnte die ermittelte Sequenz bzw. die erhaltenen Verdauprodukte noch einmal bestätigt werden. Auch die theoretisch generierten MS²-Spektren stimmten mit den der erhaltenen Spaltpeptiden überein und bestätigten die Interpretation.

3.2.4 FSN_31.4.

Die Peptidfraktion FSN_31.4. ist die vierte Unterfraktion, die mit 31%-igem Acetonitril eluiert wurde (siehe Kap. 2.3, S.31). Dabei handelte es sich um eine relativ reine Fraktion, deren Hauptpeptidkomponente bei 16,8-17,8 min eluierte (siehe Abbildung 40, S.66).

Diese Fraktion wurde exemplarisch für die Peptide, die auch in den Fraktionen FSN_31.2.-35.2. eluierten, verwendet (vgl. Tabelle 14, S.66 und Anhang Abbildung B 1, S.112 und Abbildung B 2, S.113).

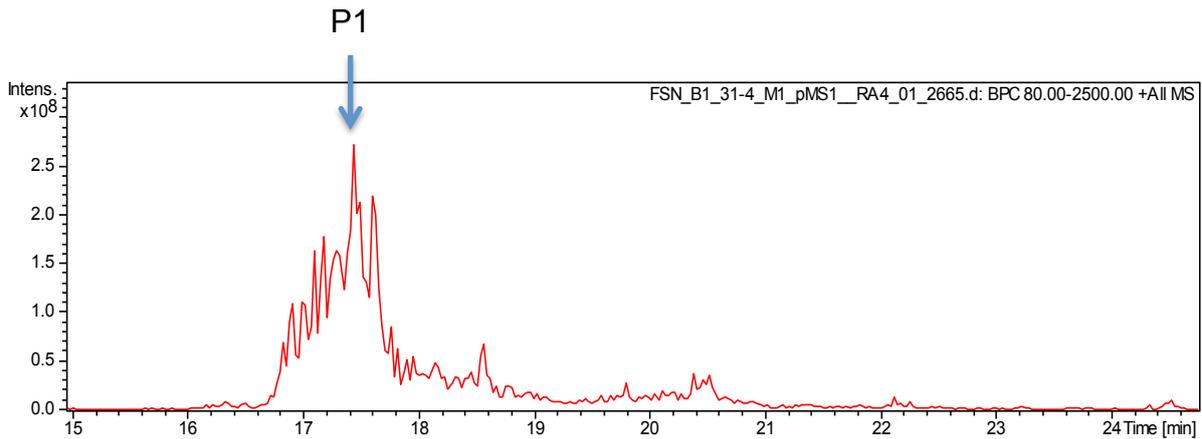


Abbildung 40: Das Basispeakchromatogramm der reduzierten und alkylierten Peptidfraktion FSN_31.4. zeigt bei 16,8-17,8 min einen Hauptpeak, der den Isoformen des Peptids P1 entspricht.

m/z	MW	Peptid	Mod	31.1.	31.2.	31.3.	31.4.	35.1.	35.2.	35.3.	35.4.	39.1.	39.2.
861,2	2580,6			(x)	x								
1273,6	3817,8			(x)									
1229,0	3684,0	P1	+Hex		xx	xx	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	x	x	x
1283,0	3846,0	P1	+2Hex		xxx	xxx	xxxx	xxx	xxxx	xx	(x)	(x)	(x)
974,0	3892,0		+46		x	xxx	xxx	xxx	xxx	x	(x)	(x)	
1337,0	4008,0	P1	+3Hex		xxx	xx	xxx	x					
1005,5	4018,0				x	xx	x	x					
1010,1	4036,4	P1	+28		x	x	x	x					
1014,5	4054,0		+46		xx	x	xxx	x					
1244,4	3730,2		+46		(x)	xx	xxx	x(x)	xxx	xx	x	(x)	(x)
1391,0	4170,0	P1	+4Hex		x	x							
1175,0	3522,0	P1				xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	(x)	

Tabelle 14: Ergebnisse der semi-quantitativen Massenauswertung der reduzierten und alkylierten Peptide der Fraktionen FSN_31.1-39.2.. In der Tabelle sind jedoch hauptsächlich die Massen, des unter 3.2.2. beschriebenen Peptids und dessen Varianten aufgelistet. Die vollständige Tabelle ist im Anhang zu finden (Tabelle B 1, S.111).

Bei dieser Peptidfraktion handelte es sich im Wesentlichen um ein Peptid, welches in verschiedenen Isoformen vorhanden war. So existierten verschiedenste Varianten des Peptids, die mit keiner bzw. einer, zwei, drei und vier Hexosen assoziiert vorlagen. Diese konnten den Peptiden mit der Masse 3522,0 Da, 3684,0 Da, 3846,0 Da, 4008,0 Da und 4170,0 Da zugeordnet werden (siehe Tabelle 14, S.66).

Mehrfache Wasserverluste in den Massenspektren mancher Spaltpeptide (siehe Abbildung 44, S.72) ließen das Vorhandensein eines Zuckers vermuten. Vergleicht man das MS³-Spektrum eines solchen Spaltpeptids nach Verlust der Hexose (-162 Da) im MS² mit dem MS²-Spektrum des entsprechenden unmodifizierten Spaltpeptids, so zeigt sich die Übereinstimmung der beiden Spektren (siehe Abbildung 45, S.73 und Abbildung 46, S.73).

Die glykierten Isoformen können eine zusätzliche N-terminale Formyl-Gruppe besitzen; ebenso konnte für alle glykierten Isoformen eine Variante, die 46 Da schwerer war als die jeweilige Ausgangsstruktur gefunden werden (vgl. Tabelle 14, S.66 und Abbildung 41, S.68). Die Formylierung ließ sich als chemisches Artefakt, das durch den Einsatz von Ameisensäure bei der Extraktion entsteht, erklären. Bei den substituierten Hexosen handelte es sich höchst wahrscheinlich um Zucker, die aufgrund des hohen Zuckergehalts der Frucht ohne Beteiligung von Enzymen an reaktive Aminosäuren, vor allem an Lysine, aber auch an den N-Terminus konjugiert wurden (vgl. Kap. 4.1, S.95). Die verschiedenen Varianten der Substituenten sind in Abbildung 41, S.68, dargestellt. Tabellarisch sind sie in der Tabelle 14, S.66, festgehalten. Die folgende Sequenzinformation wurde hauptsächlich aus den Spektren des Peptids mit der Masse 3684,0 Da (eine Hexose) gewonnen. Da die Modifizierungen keinen Einfluss auf die Peptidsequenz haben, wurde auch teilweise auf Spektren modifizierter Spaltpeptide Bezug genommen.

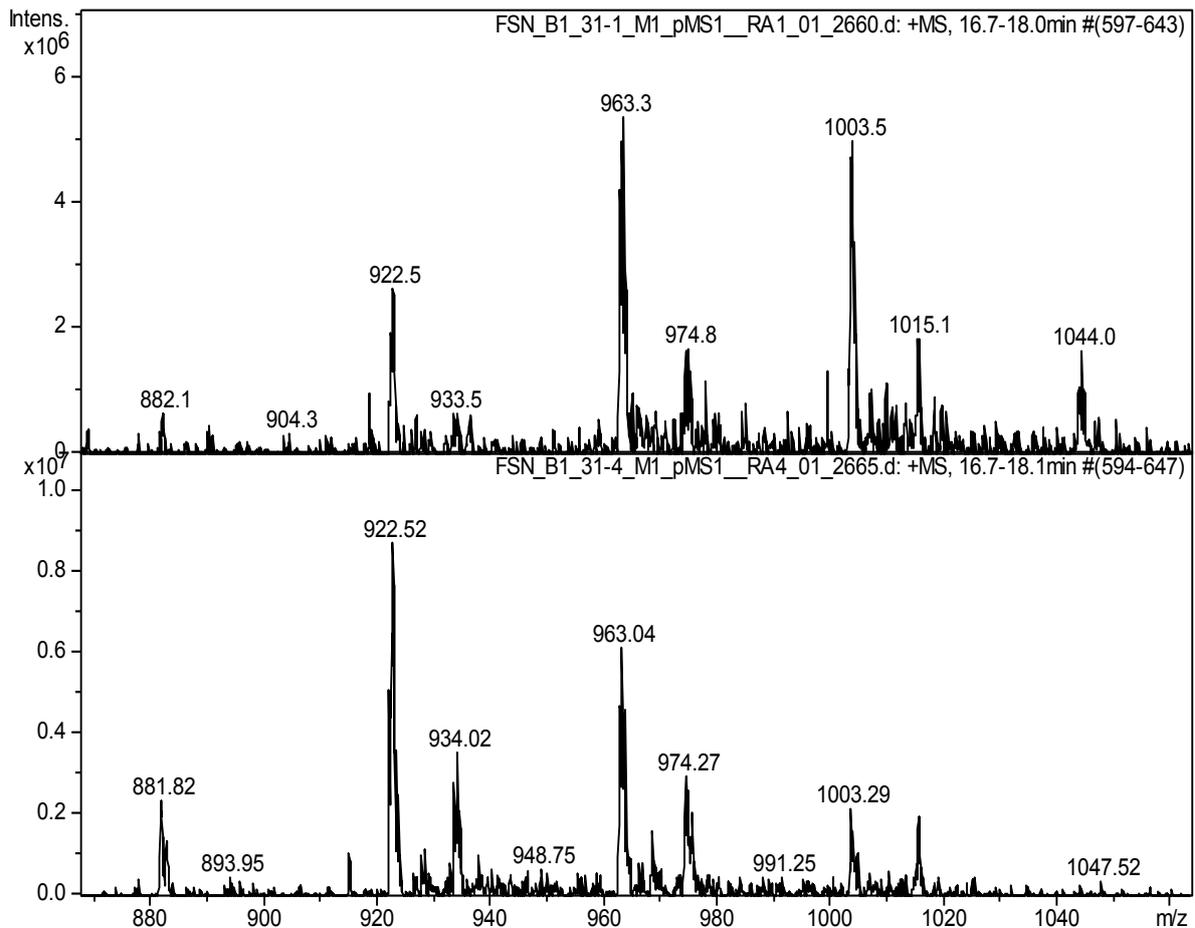


Abbildung 41: Ausschnitt aus den MS¹-Spektren der vierfach geladenen Peptidionen der reduzierten und alkylierten Fraktionen FSN_31.2⁴ und FSN_31.4, die zwischen 16,7- 18,1 min eluieren. Der Massenpeak bei m/z 881,5 ist das Peptid ohne Substituenten. Darauf folgen drei Gruppe von jeweils drei Peaks. Bei dem ersten Peaks handelt es sich jeweils um das Peptid mit einer (m/z 922,0), zwei (m/z 962,8) bzw. drei (m/z 1003,3) konjugierte/n Hexose/n. Der vierte Peak im oberen MS¹-Spektrum (FSN_31.1) bei m/z 1043,5 ist das Peptid mit vier konjugierten Hexosen. Die mittleren, kleineren Peaks (m/z 928,3, m/z 968,0 und m/z 1010,0) weisen jeweils einen Massenzuwachs von 28 Da auf – dies entspricht einer Formylgruppe. Die hintersten Peaks der Dreiergruppe sind die Variationen des Peptids mit jeweils einer addierten Masse von 46 Da (m/z 933,5, m/z 974,0 und m/z 1014,5). Der Ursprung dieser Modifikation konnte allerdings nicht geklärt werden.

3.2.4.1 Enzymatischer Verdau

Über den enzymatischen Verdau mit Pepsin und Trypsin ergaben sich verschiedene Spaltpeptide (siehe Tabelle 15, S.70, Tabelle 16, S.71 und Anhang Tabelle B 2, S.116 und Tabelle B 3, S.116), aus welchen das Peptid 3684,0 Da (bzw. 3846,0 Da und 4008,0 Da) rekonstruiert werden konnte (siehe Abbildung 42, S.69 und Abbildung 43, S.70).

⁴ Diese Fraktion wurde unter einem irreführenden Dateinamen (FSN_B1_31.1) gespeichert, da es bei den Messungen zu einer Verwechslung gekommen ist.

Das Peptid 3684,0 Da konnte aus den tryptischen Spaltpeptiden 703,3 Da und 2999,1 Da zusammengesetzt werden, wobei das Spaltpeptid 2999,1 Da wiederum aus den Spaltpeptiden 1023,3 Da und 1993,8 Da, oder aus 1469,4 Da und 1547,6 Da rekonstruiert werden konnte. Das Peptid 3846,0 Da ergab sich aus den Spaltpeptiden 865,4 Da und 2999,1 Da, also einer variablen N-terminalen Sequenz mit gleicher C-terminaler Sequenz wie das Peptid 3684,0 Da. Alternativ ist aber auch die Variante mit dem N-terminalen Spaltpeptid 703,3 Da und dem Spaltpeptid mit 3161,1 Da denkbar. Das Peptid 4008,0 Da ließ sich aus den Spaltpeptiden 865,4 Da und 3161,1 Da rekonstruieren, wobei sich das Spaltpeptid 3161,1 Da wiederum aus den Spaltpeptiden 1469,4 Da und 1707,6 Da zusammensetzen ließ (siehe Abbildung 42, S.69).

Trypsin Spaltpeptidmuster

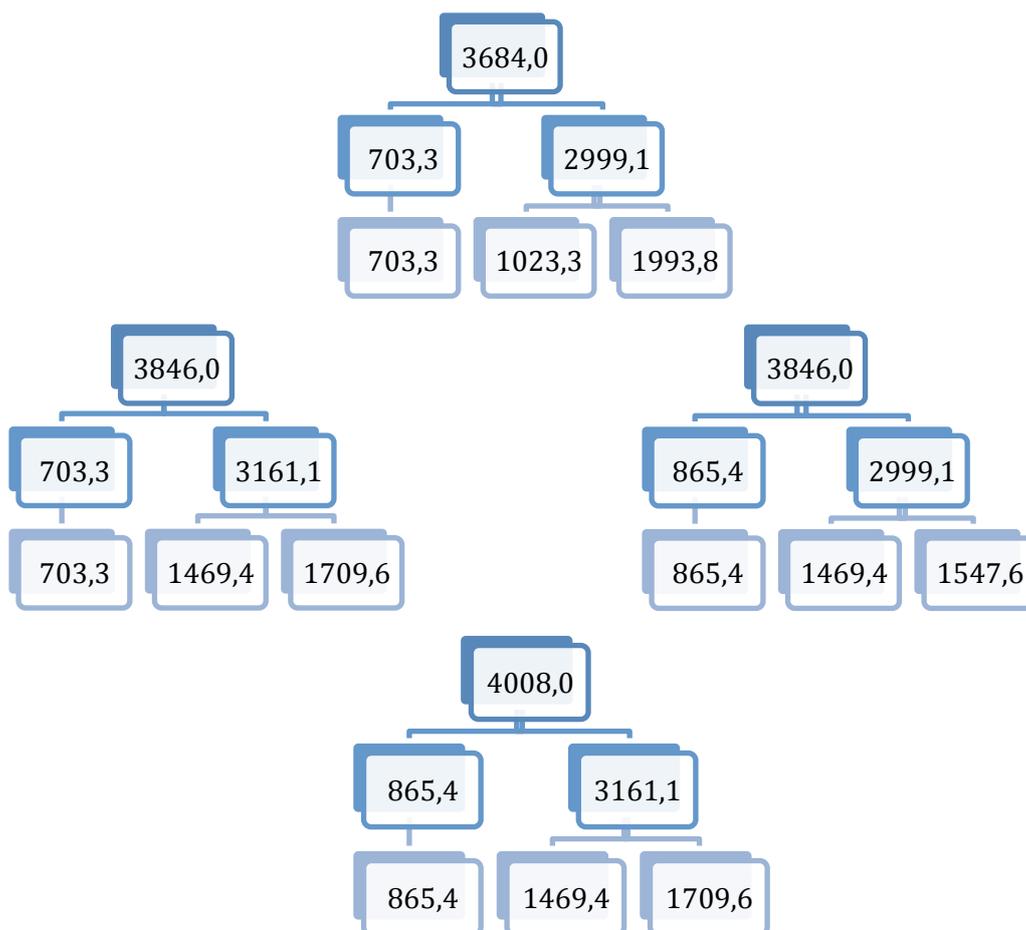


Abbildung 42: Theoretische Rekonstruktion der Peptide mit den Massen 3684,0 Da, 3846,0 Da und 4008,0 Da aus den tryptischen Spaltpeptiden der Fraktion FSN_31.4..

Pepsin Spaltpeptidmuster

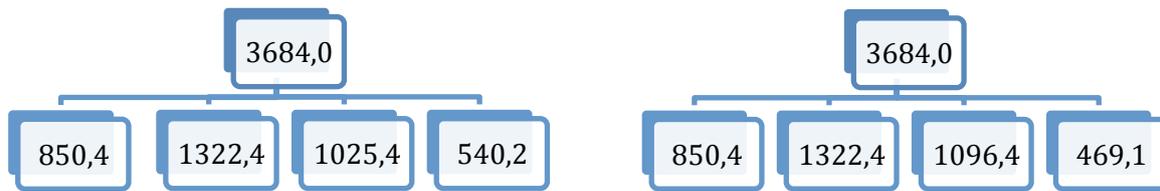


Abbildung 43: Theoretische Rekonstruktion des Peptids P1 mit der Masse 3685,0 Da aus den peptischen Spaltpeptiden der Fraktion FSN_31.4..



m/z	MG	Mod	Aminosäuresequenzen
470,1	469,1		CY[K/Q]
541,2	540,2		ACY[K/Q]
519,2	518,2		VQC[I/L]
851,4	850,4		VQC[I/L]GKF
1026,4	1025,4	+Hex	TCFPSPVG
1097,4	1096,4	+Hex	TCFPSPVGA
1323,4	1322,4		CAPWSPCQTGC

Tabelle 15: Reduzierte Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Pepsinverdaus von FSN_31.4. (FSN_31.4_PD) (vollständige Tabelle siehe Anhang Tabelle B 2, S.116). Die schwarz bzw. grau gekennzeichneten Spaltpeptide konnten P1 zugeordnet werden. Die spezifische Spaltstelle von Pepsin ist hier nach dem hydrophoben Phenylalanin (F) an Position sieben der Aminosäuresequenz. Die weitere Fragmentierung des Peptids P1 ist unspezifischen Ursprungs.

Die verschiedenen Spaltpeptide, die aus dem spezifischen enzymatischen Verdau der Peptidfraktion FSN_31.4. entstehen, sind Tabelle 15, S.70, und Tabelle 16, S.71, zu entnehmen. Durch den peptischen Verdau entstanden vier Hauptspaltpeptide 850,4 Da, 1322,4 Da, 1025,4 Da und 540,2 Da, aus denen das intakte Peptid P1 (mit einer Hexose) rekonstruiert werden konnte.

Die Spaltung der Peptidkette im peptischen Verdau, die zu den Spaltpeptiden 1322,4 Da und 1025,4 Da sowie zu 1025,4 Da und 540,2 Da führte, ist nicht auf eine spezifische enzymatische Aktivität zurückzuführen. Allein die Spaltstelle nach Position 7, einem Phenylalanin (F), ist spezifischen Ursprungs. In der Sequenz war ein weiteres Phenylalanin zu finden, das allerdings keine Spaltstelle darstellt, da die nachfolgende Aminosäure ein Prolin (P) ist, das sterisch die enzymatische Spaltung verhinderte.

Die N-terminale Sequenz von P1 ließ sich durch die Interpretation der MS-Spektren der tryptischen Spaltpeptide m/z 866,4 und m/z 704,3 (FSN_31.4..TD) bestimmen. Dabei zeigte der Vergleich des MS²-Spektrums von m/z 704,3 mit dem MS³-Spektrum von m/z 866,4→704,3 eine Sequenzübereinstimmung (vgl. Abbildung 46, S.73 und Abbildung 45, S.73). Aus diesen Spektren konnte die N-terminale Sequenz VQC[I/L]GK bis zur spezifischen Trypsinspaltstelle – nach dem basischen Lysin (K, Position 6) – sequenziert werden.

Die Massendifferenz der beiden Spaltpeptide von 162 Da entspricht einer Hexose. Die Identität der Hexose konnte durch mehrfache Wasserverluste sowie durch die charakteristische Abspaltung von 162 Da aus dem MS²-Spektrum von m/z 866,4 bestätigt werden. Die Position dieser Modifikation konnte nicht genauer lokalisiert werden, da die Hexosylgruppe im MS² restlos abgespalten wird.

Die Spaltpeptide mit 731,3 Da, und mit 893,4 Da konnten als formylierte Varianten der N-terminalen Sequenz – ohne bzw. mit konjugierter Hexose – identifiziert werden, wobei der Formylrest am N-Terminus vermutet wird (siehe Anhang Abbildung B 5, S.123). Diese N-terminalen Sequenzen wurden den in Abbildung 42, S.72, (vgl. Tabelle 16, S.71) dargestellten Isoformen des Peptids zugeordnet.

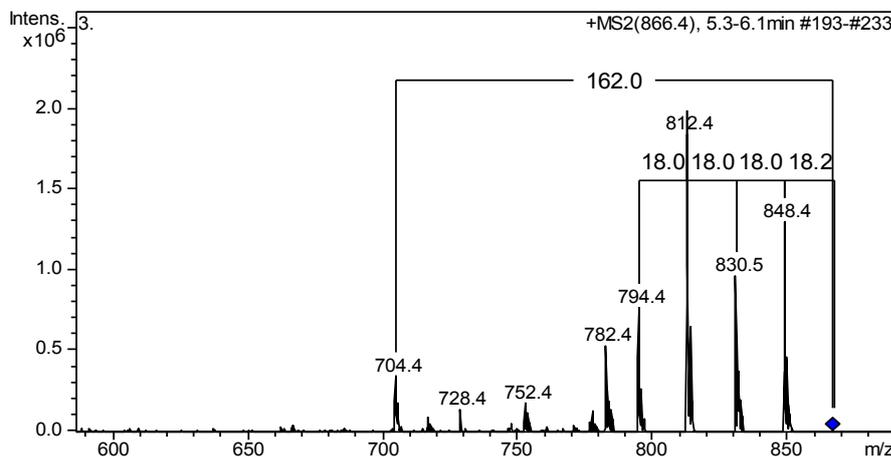


Abbildung 44: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 866,4 aus Fraktion FSN_31.4..

VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]

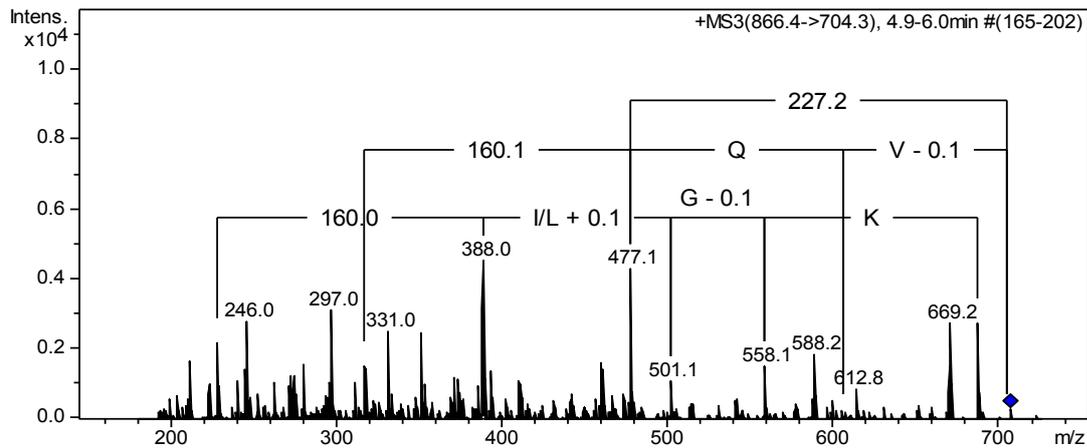


Abbildung 45: Das MS³-Spektrum (m/z 866,4->704,3) ausgehend von dem [M+H]⁺-Ion des Trypsin Spaltpeptids mit der Masse 865,4 Da aus Fraktion FSN_31.4..

VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]

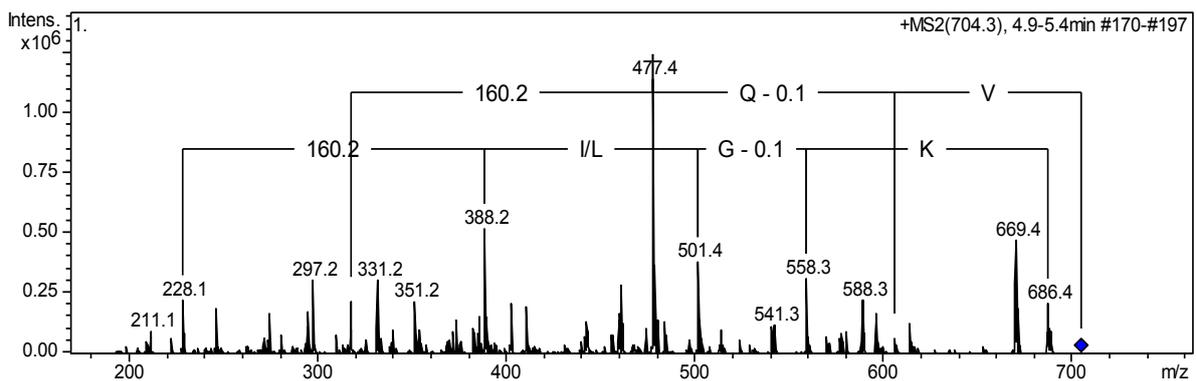


Abbildung 46: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 704,3 aus FSN_31.4..

Aus dem Spaltpeptid m/z 640,7 (bzw. m/z 1280,5) ließ sich die anschließende Sequenz VQC[I/L]GKFCAPWSPCQ(Q?) ermitteln (siehe Abbildung 47, S. 74, und Abbildung 48, S.74). Hierbei ist die letzte Aminosäure der Sequenz eine Glutaminsäure bzw. Lysin (Q bzw. K an Position 16). Diese Variante der Sequenz ließ sich jedoch mit keinem anderen sequenzierten Spektrum in Übereinstimmung bringen (vgl. Abbildung 54, S.77).

Die Aminosäuresequenz FCAPWSPCQ konnte auch durch andere sequenzierte Spaltpeptide, wie z.B. m/z 1024,2, die P1 zugeordnet wurden, rechnerisch oder durch die Sequenz bestätigt werden. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um einen konservierten Sequenzbereich handelt (vgl. Abbildung 49, S.75). Bei der C-terminalen Aminosäure des Spaltpeptids bei m/z 1280,5 handelt es sich demnach um

eine Modifikation des (in der Sequenz folgenden) Threonins (T), oder um eine Variante des Sequenzteils, die jedoch keinem intakten Peptid zugeordnet werden konnte.

VQC[I/L]GK**FCAPWSPCQ(Q?)**TGCTCFPSPVGACY[K/Q]

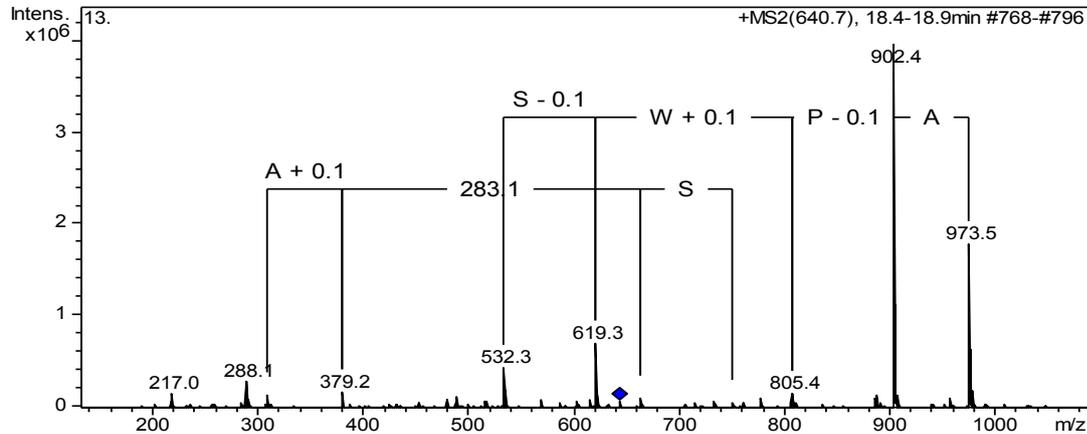


Abbildung 47: Das MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 640,7 aus Fraktion FSN_31.4..

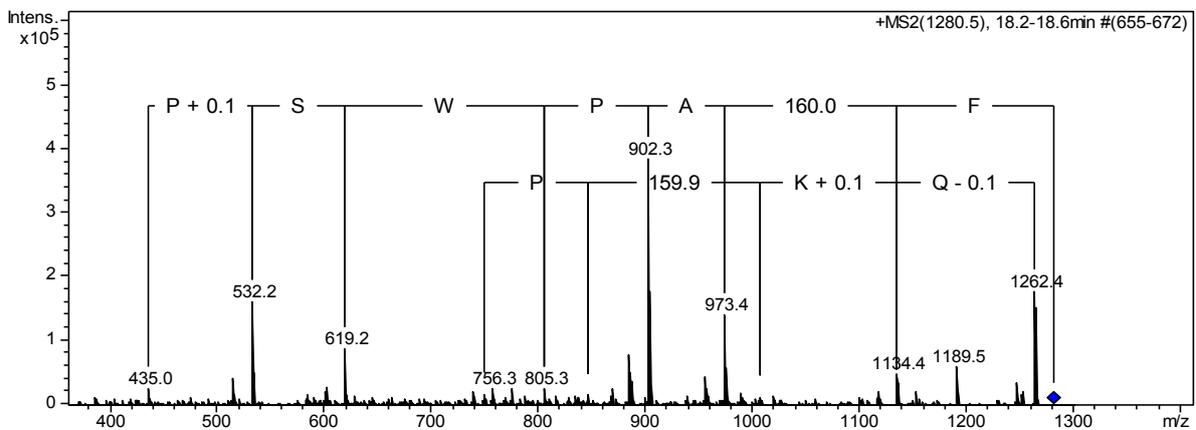


Abbildung 48: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 1280,5 aus Fraktion FSN_31.4..

Aus den MS²-Spektren der Spaltpeptide mit der Masse 1547,6 Da und 1993,8 Da (m/z 774,8 und m/z 997,8) ließ sich die C-terminale Sequenz ermitteln (siehe Abbildung 50, S.76 und Abbildung 51, S.76). Diese beiden Spaltpeptide sind die zwei möglichen C-terminalen Spaltpeptide, die durch spontane Fragmentierung während des enzymatischen Verdaus aus dem tryptischen Verdauprodukt 2999,1 Da entstanden (siehe Abbildung 42, S.69).

Aus dem MS²-Spektrum m/z 997,8 ließ sich die Sequenz FCAPWSPCQTGCTCFPSPVG ACY[K/Q] ableiten. Durch das MS²-Spektrum m/z 774,8 konnte die Sequenz in den Positionen 21-27 bestätigt werden.

VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]

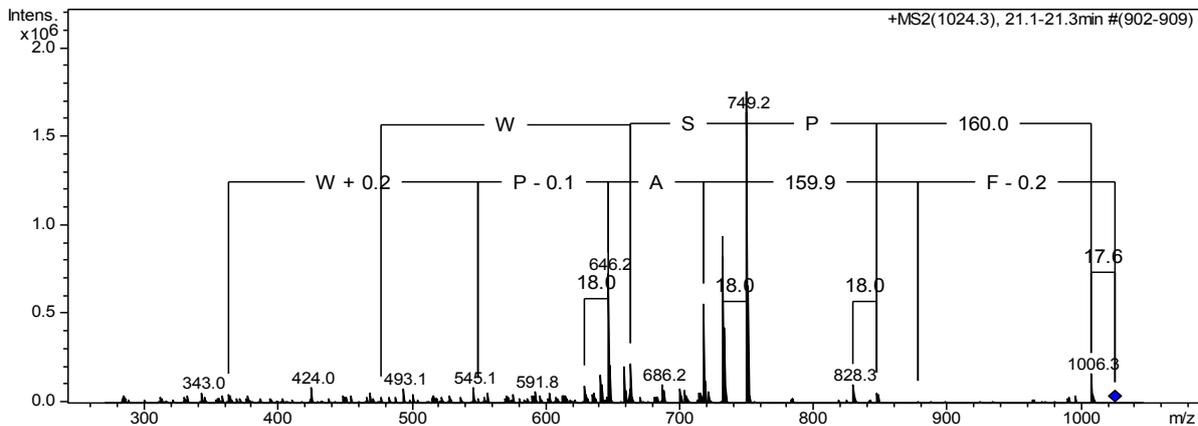


Abbildung 49: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 1024,3 aus Fraktion FSN_31.4..

Aus den Spektren ließ sich interpretieren, dass im Mittelteil der Sequenz eine Hexose gebunden ist. Der Verlust eines Phenylalanins (F) als auch wahlweise einer Hexose war in beiden Spektren zu erkennen (vgl. Abbildung 50, S.76 und Abbildung 51, S.76). Die Fragmentierung war sowohl in die eine, wie auch in die andere Richtung zu beobachten. Diese Hexose schien, anders als die bisher bekannten Zucker, gebunden zu sein, da sich das Fragmentierungsverhalten deutlich unterscheidet. Im Vergleich mit anderen MS²-Spektren Hexose-konjugierter Spaltpeptide, bei welchen meist nur ein mehrmaliger Wasserverlust zu erkennen war (vgl. Abbildung 44, S.72), zeigten die Spaltpeptide 1547,6 Da und 1993,8 Da neben dem Verlust von 162 Da bereits im MS² eine intensive Fragmentierung des Peptidrückgrads.

In der Diskussion (siehe Kap. 4.1, S.95) wird nochmals genauer auf den vermuteten Ursprung der Glykierungen eingegangen. Das größte C-terminale tryptische Spaltpeptid mit 2999,1 Da setzt sich somit aus der Sequenz FCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q] und einer Hexose zusammen. In dem MS³-Spektrum m/z 1001,0→1088,9 konnte der Sequenzbereich CQTGCTCFPSPVGAC (Position 14-28) nochmals bestätigt werden (Abbildung 52, S.76).

VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]

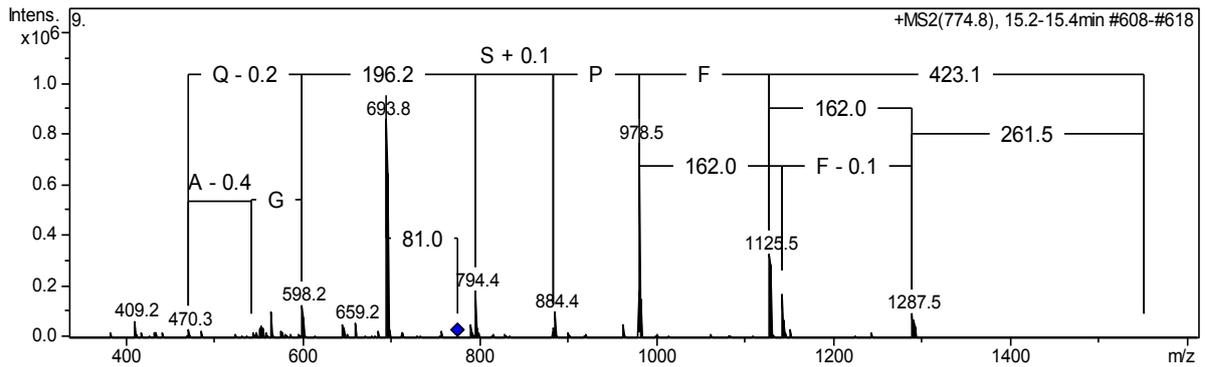


Abbildung 50: Das MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 774,8 aus Fraktion FSN_31.4..

VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]

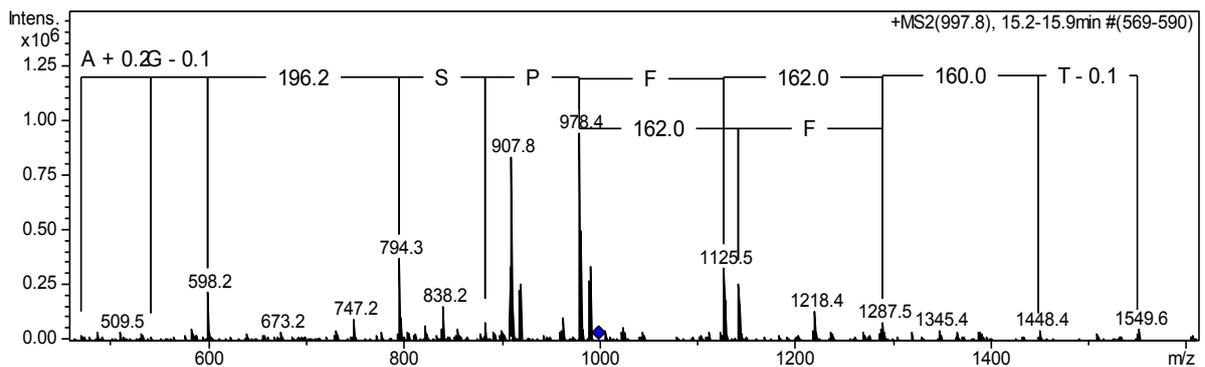


Abbildung 51: Das MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 997,8 aus Fraktion FSN_31.4..

VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]

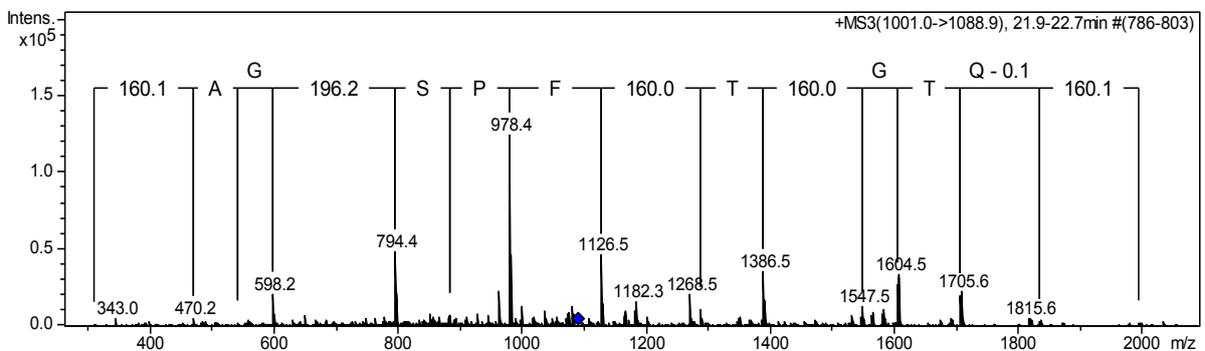


Abbildung 52: Das MS³-Spektrum (m/z 1001,0->1088,9) ausgehend von dem [M+3H]³⁺-Ion des Trypsin Spaltpeptids mit der Masse 2999,1 Da aus Fraktion FSN_31.4..

Das intakte Peptid P1 konnte zum einen aus den peptischen Spaltpeptiden 850,4 Da, 1322,4 Da, 1025,4 Da und 540,2 Da, als auch aus 850,4 Da, 1322,4 Da, 1096,4 Da und 469,1 Da rekonstruiert werden (siehe Abbildung 43, S.70).

Die N-terminale Sequenz VQC[I/L]GKF bis zur peptischen Spaltstelle nach dem aromatischen Phenylalanin (F) an Position 7 ergab sich aus dem MS²-Spektrum des Spaltpeptids 850,4 Da (siehe Abbildung 53, S.77).

VQC[I/L]GKF_{CAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY}[K/Q]

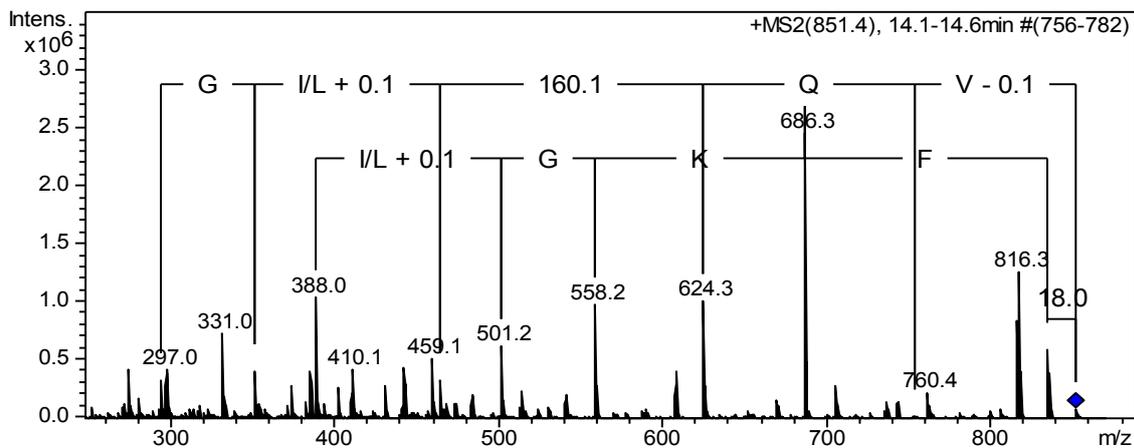


Abbildung 53: Das MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 851,4 aus Fraktion FSN_31.4..

Durch die Sequenzierung des Spaltpeptids 1322,4 Da (m/z 662,2) konnte die Sequenz zu CAPWSPCQTGC, die bereits aus den tryptischen Spaltpeptiden vermutet wurde, noch weiter ergänzt werden.

VQC[I/L]GKF_{CAPWSPCQTGC}TCFPSPVGACY[K/Q]

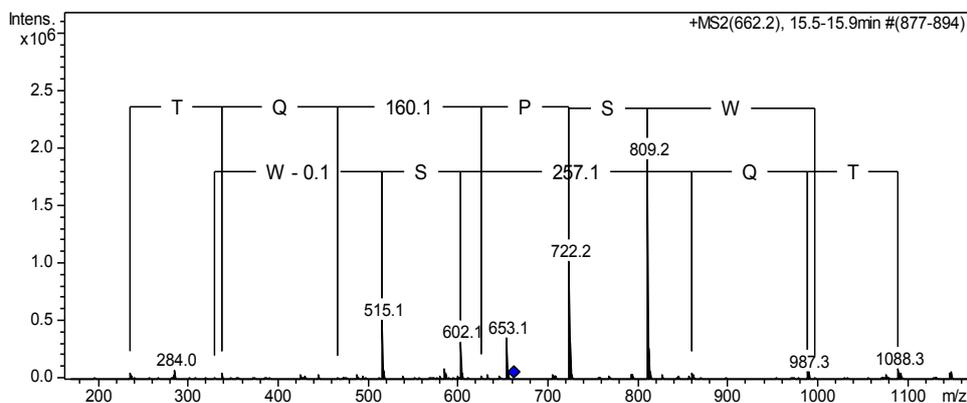


Abbildung 54: Das MS²-Spektrum des [M+2H]²⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 662,2 aus Fraktion FSN_31.4..

Wie bereits erwähnt, entstanden durch den enzymatischen Verdau nicht nur verdauspezifische Spaltpeptide, sondern auch solche, die durch spontane Brüche labilerer Bindungen entstehen.

Die C-terminalen Spaltpeptide des peptischen Verdau waren hierbei beispielhaft für das beschriebene Fragmentierungsverhalten. Dabei entstanden zum einen die Spaltpeptide 1025,4 Da und 1096,4 Da und zum anderen die dazu jeweils komplementären kurzen Spaltpeptide 540,2 Da und 469,1 Da (vgl. Abbildung 55, S.78 und Abbildung 56, S.79). Beide Paare wiesen eine Massendifferenz von 71 Da zu dem jeweils größeren Spaltpeptid auf – dies entspricht der molekularen „residue mass“ eines Alanins (A). Aus den MS²-Spektren m/z 1026,4 und m/z 1097,4 ließ sich die Sequenz VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSV**G**ACY[K/Q] und aus den MS² -Spektren m/z 541,2 und m/z 470,1 die anschließende Sequenz VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSV**G**ACY[K/Q] ermitteln (vgl. Abbildung 55, S. 78 und Abbildung 56, S.79).

VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSV**G**ACY[K/Q]

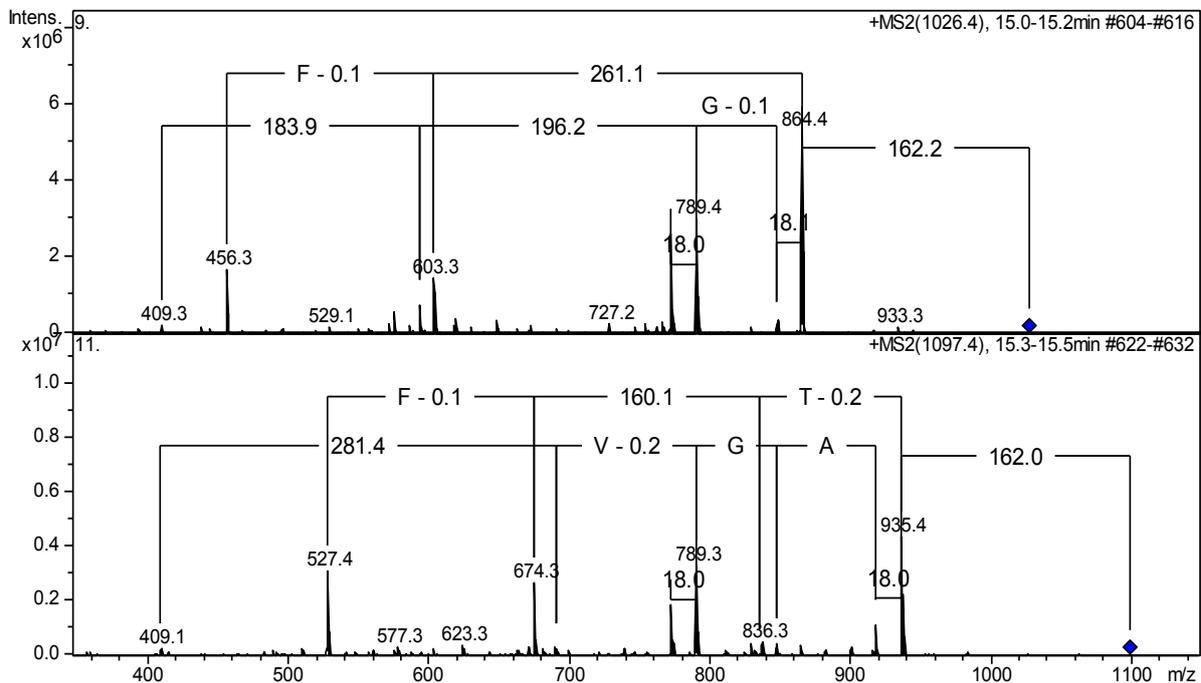


Abbildung 55: Die MS²-Spektren der [M+H]⁺-Ionen der Pepsin Spaltpeptide m/z 1026,4 und m/z 1097,4 aus Fraktion FSN_31.4. im Vergleich.

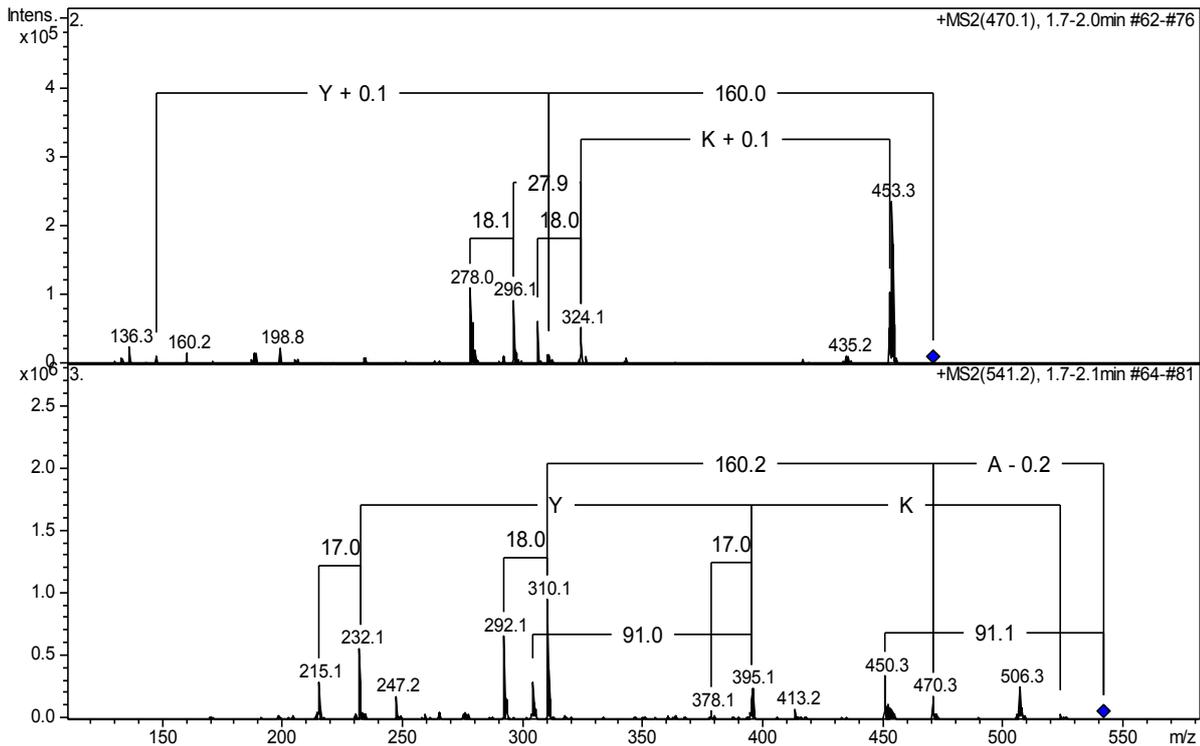


Abbildung 56: Die MS²-Spektren der [M+H]⁺-Ionen der Pepsin Spaltpeptide m/z 470,1 und m/z 541,2 aus Fraktion FSN_31.4. im Vergleich.

Aus den Sequenzierungsergebnissen der tryptischen und peptischen Spaltpeptide ließ sich die vollständige Sequenz VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGYAC[K/Q] des Peptids P1 ermitteln.

Beide Spektren der peptischen Spaltpeptide m/z 1026,4 und m/z 1097,4 zeigten den Verlust von 162 Da, der bereits bei der Sequenzierung der tryptischen Spaltpeptide an dieser Stelle beschrieben wurde; hier aber als dominanteste Fragmentierungsreaktion und nicht, wie in den MS²-Spektren von m/z 774,8 und m/z 997,4 (tryptische Spaltpeptide), gleichwertig zu den Brüchen des Peptidrückgrads (vgl. Abbildung 50, S.76 und Abbildung 51, S.76). Die Ursachen des unterschiedlichen Fragmentierungsverhaltens und auch die Bindungsstelle, an welcher die Hexose in der Sequenz konjugiert ist, sind noch nicht völlig geklärt (siehe Kap. 4.1, S.95). Letztere muss allerdings auf dem Sequenzstück PSPV liegen und ist somit höchst wahrscheinlich an der OH-Gruppe der Aminosäureseitenkette des Serin (S) an Position 23 konjugiert.

Es besteht weiterhin die Frage, ob die C-terminale Aminosäure ein Lysin (K) oder ein Glutamin (Q) ist. Ebenso gilt es zu klären, ob es sich bei der Aminosäure an Position 4

um Leucin (L) oder ein Isoleucin (I) handelt. Dies muss durch Vergleichsexperimente mit synthetisierten Peptiden geklärt werden.

3.2.5 FSN_39.4.-43.4.

Die Fraktionen FSN_39.4.-43.4. (siehe Kap. 2.4, S.33) wurden nicht wie die Fraktionen FSN_31.4., FSN_35.3. und FSN_39.2. einzeln analysiert, sondern im kollektiven Vergleich ausgewertet. Bei den Fraktionen FSN_39.4.-43.4. handelte es sich um komplexe Peptidmischungen, die in einer isolierten Analyse der Einzelfraktionen ein äußerst komplexes Spaltpeptidmuster ergaben, so dass die Zuordnung der Spaltpeptide zu den intakten Peptiden anhand einer Fraktion alleine nicht möglich war. Es handelte sich dabei ausschließlich um Peptide, die in den vorigen Fraktionen nicht vorhanden waren. Die Peptide waren jedoch in verschiedenen Konzentrationen in den Fraktionen FSN_39.4.-43.4. enthalten. Dadurch bot sich der Vergleich der Fraktionen und vor allem der Vergleich der Spaltpeptidmuster zur Analyse an (siehe Abbildung 57, S.81).

Durch den Vergleich der ab- und zunehmenden Konzentrationen der Spaltpeptide in den verschiedenen Fraktionen (siehe Tabelle 18, S.83 und Tabelle 19, S.84), konnten diese den ab- und zunehmenden Konzentrationen der intakten Peptide der jeweiligen Fraktionen (siehe Tabelle 17, S.81; vgl. Anhang Tabelle B 1, S.111) zugeordnet bzw. Zusammenhänge ersichtlich werden. Gleichzeitig konnte eine theoretisch mögliche Zusammensetzung der intakten Peptide aus den Spaltpeptiden durch den Abgleich der Konzentrationen der intakten Peptide mit den Konzentrationen der rechnerisch ermittelten Spaltpeptide bestätigt werden. Die Peptide aus den Fraktionen FSN_39.4.-43.4. waren im Vergleich zu den bereits analysierten Fraktionen in geringerer Menge vorhanden, jedoch noch für die Analyse relevant. Die Peptide, die in den Fraktionen FSN_39.4.-43.4. analysiert wurden, sind in Tabelle 17, S.81, zusammengefasst.

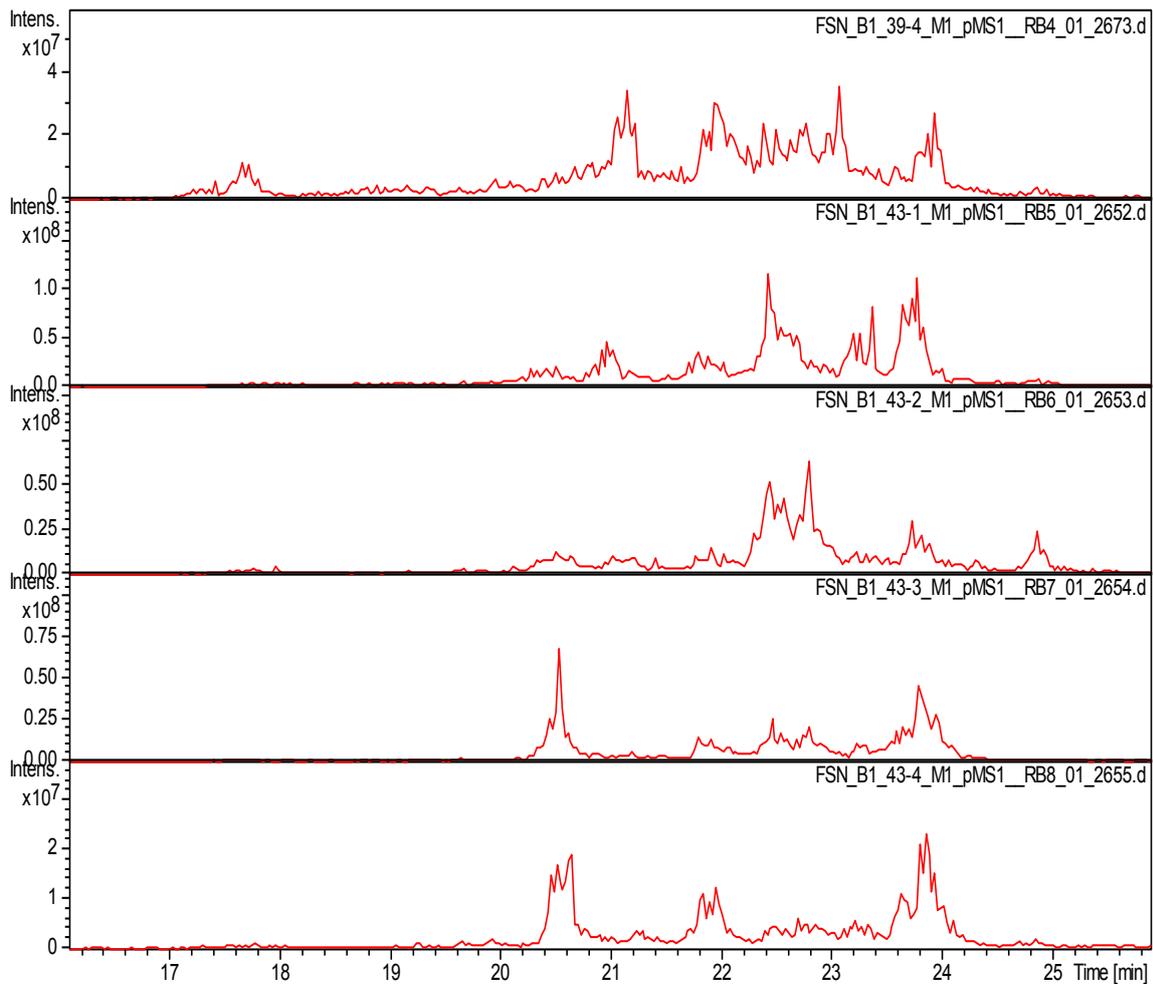


Abbildung 57: Basispeakchromatogramme der alkylierten und reduzierten Peptidfraktionen FSN_39.4.-43.4. (von oben nach unten) im Vergleich.

m/z	MW	39.4.	43.1.	43.2.	43.3.	43.4.
1178,7	3533,1	x	x			
1225,3	3672,9 ⁵	x	x			
1218,0	3651,0	(x)	xx	x		
1172,7	3515,1	(x)				
1170,3	3507,9	(x)	xx	(x)		
1191,6	3571,8 ⁵	(x)	x	(x)		
1183,3	3546,9			(x)	x	(x)
1177,3	3528,9		(x)	x	(x)	
1221,3	3660,9			(x)		
1143,7	3428,1				xx	xx

Tabelle 17: Reduzierte tabellarische Auflistung und semi-quantitative Bewertung der Peptide (alkyliert und reduziert) der Fraktionen FSN_39.4.-43.4.. Die vollständige Auflistung ist der Gesamttabelle im Anhang zu entnehmen (Tabelle B 1, S.111).

⁵ Diese Peptide konnten aus der Kombination zweier Spaltpeptide minus 18 Da zusammengesetzt werden. Deren Masse wurde um 18 Da reduziert, da das N-terminale Fragment sehr leicht und viele Wasserverluste aufweist (vgl. Tabelle 20, S.86).

3.2.5.1 Enzymatischer Verdau

Die Spaltpeptide, die beim enzymatischen Verdau durch Pepsin und Trypsin in den verschiedenen Fraktionen entstanden, wurden tabellarisch festgehalten (vgl. Tabelle 18, S.83 und Tabelle 19, S.84). Die Spaltpeptide mit der stärksten Intensität wurden darauf hin mit einander kombiniert (vgl. Abbildung 58, S.86 und Abbildung 59, S.88).

Pepsin Fragmente der Fraktionen FSN_39.4-43.4.

														GlpCWGKFCAPWSPCQSGC[I/L]C[I/L]...		
FSN_39-4_			FSN_43-1			FSN_43-2			FSN_43-3			FSN_43-4				
z	m/z	MG	z	m/z	MG	z	m/z	MG	z	m/z	MG	z	m/z	MG		
1			1	720,3	719,3											
1	823,2	822,2	1	823,2	822,2	1	823,2	822,2	1	823,2	822,2	1	823,2	822,2		
1	448,2	447,2	1	448,2	447,2	1	448,2	447,2	1	448,2	447,2	1	448,2	447,2		
1	993,3	992,3	1	993,3	992,3	1	993,3	992,3	1	993,3	992,3	1	993,3	992,3		
1	1022,3	1021,3	1	1022,3	1021,3	1	1022,3	1021,3								
			1	528,1	527,1	1	528,2	527,2								
	599,2	598,2	1	599,2	598,2	1	599,2	598,2	1	599,2	598,2					
1	935,2	934,2	1	935,2	934,2	1	935,2	934,2	1	935,2	934,2	1	935,2	934,2		
1	992,3	991,3	1	992,3	991,3	1	992,3	991,3							+Hex	
1	863,4	862,4				1	863,3	862,3	1	863,3	862,3	1	863,3	862,3		
1	1149,3	1148,3				1	1149,3	1148,3	1	1149,3	1148,3	1	1149,3	1148,3		
1	1171,3	1170,3				1	839,2	838,2	1	839,2	838,2					
1	618,3	617,3	1	618,3	617,3	1	618,3	617,3	1	618,3	617,3	1	618,3	617,3	VGACYK*	
1	405,2	404,2	1	405,2	404,2	1			1	405,2	404,2	1	405,2	404,2	[I/L]C[I/L]	
1	1309,2	1308,2	1	1309,2	1308,2	2	1309,2	1308,2	1	1309,2	1308,2	1	1309,2	1308,2	CAPWSPCQSGC	
1	1422,3	1421,3	1	1422,3	1421,3	2	1422,3	1421,3	1	1422,3	1421,3	1	1422,3	1421,3		
2	791,7	1581,4				2	791,7	1581,4	2	791,7	1581,4	2	791,7	1581,4		
			2	1141,7	2281,4	1	1141,7	2281,4								
1	998,2	997,2	1	998,2	997,2		998,2	997,2	1	998,2	997,2	1	998,2	997,2	+Hex	Formyl-GlpCWGKF
1	808,2	807,2	1	808,2	807,2		808,2	807,2	1	808,2	807,2	1	808,2	807,2		GlpCWGKF
1	836,2	835,2	1	836,2	835,2		836,2	835,2	1	836,2	835,2	1	836,2	835,2		Formyl-GlpCWGKF

Tabelle 18: Reduzierte Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Pepsinverdaus von FSN_39.4.-43.4. (FSN_39.2._PD-43.4._PD) im Vergleich (vollständige Tabelle siehe Anhang Tabelle B 8, S.121). Grün hinterlegte Sequenzen sind bereits aus vorhergehenden Fraktionen bekannt. Die hellgrün hinterlegten m/z Werte sind im folgenden Text mit Sequenzen belegt.

Trypsin Fragmente der Fraktionen FSN_39.4-43.4.

FSN_39-4		FSN_43-1		FSN_43-2		FSN_43-3		FSN_43-4								
z	m/z	MG	z	m/z	MG	z	m/z	MG	z	m/z	MG					
1	707,2	706,2	1	707,2	706,2	1	707,2	706,2	1	707,2	706,2	1	707,2	706,2	+H ₂ O	Formyl-GlpCWGK
1	869,1	868,1	1	869,1	868,1	1	869,1	868,1							+H ₂ O/ +Hex	Formyl-GlpCWGK
1	851,2	850,2	1	851,2	850,2	1	851,2	850,2	1	851,2	850,2	1	851,2	850,2	+Hex	Formyl-GlpCWGK
1	661,2	660,2	1	661,2	660,2	1	661,2	660,2	1	661,2	660,2	1	661,2	660,2		GlpCWGK
1	689,2	688,2	1	689,2	688,2	1	689,2	688,2	1	689,2	688,2	1	689,2	688,2		Formyl-GlpCWGK
2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4		
2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4		
2	1002,7	2003,4	2	1002,7	2003,4	2	1002,7	2003,4								
1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2		
1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2		
3	1000,5	2998,5	3	1000,5	2998,5											
						3	959,2	2874,6	3	959,2	2874,6	3	959,2	2874,6		
3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7		
3			3	1003,9	3008,7	3	1003,9	3008,7	3	1003,9	3008,7					
3	949,2	2844,6	3	949,2	2844,6	3	949,2	2844,6								
			3	970,5	2908,5	3	970,5	2908,5								
			3	1007,3	3018,9	3	1007,3	3018,9	3	1007,3	3018,9					
			3	924,9	2771,7	3	924,9	2771,7	3	924,9	2771,7	3	924,9	2771,7		
			3	963,2	2886,6				3	963,2	2886,6	3	963,2	2886,6		
3	920,2	2757,6	3	920,2	2757,6	3	920,2	2757,6	3	920,2	2757,6	3	920,2	2757,6		
3	956,2	2865,6	3	956,2	2865,6	3	956,2	2865,6								

GlpCWGKFCAPWSPCQSGC[I/L]C[I/L]...

Formyl-GlpCWGK

Formyl-GlpCWGK

Formyl-GlpCWGK

GlpCWGK

Formyl-GlpCWGK

FCAPWSPC

FCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]

Tabelle 19: Reduzierte Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Trypsinverdaus von FSN_39.4.-43.4. (FSN_39.4_TD-43.4_TD) im Vergleich (vollständige Tabelle siehe Anhang Tabelle B 9, S.123). Grün hinterlegte sind bereits aus vorhergehenden Fraktionen bekannt. Schwarzgeschriebene Aminosäuren sind anhand von Spektren bestätigt, weißgeschriebene aus anderen Fraktionen übernommen.

Die Massen der alkylierten und reduzierten intakten Peptide, die aus den LC-MS Daten der Fraktionen FSN_39.4-43.4. ermittelt wurden, wurden mit möglichen Kombinationen der relevanten tryptischen Spaltpeptide abgeglichen. Das Ergebnis dieser Auswertung ist der Tabelle 20, S.85, zu entnehmen.

m/z	660,2	688,2	706,2	850,2	-18,0	679,1
2757,6	3399,8	3427,8	3445,8	3589,8	3571,8	3418,7
2771,7	3413,9	3441,9	3459,9	3603,9	3585,9	3432,8
2844,6	3486,8	3514,8	3532,8	3676,8	3658,8	3505,7
2858,7	3500,9	3528,9	3546,9	3690,9	3672,9	3519,8
2865,6	3507,8	3535,8	3553,8	3697,8	3679,8	3526,7
2874,6	3516,8	3544,8	3562,8	3706,8	3688,8	3535,7
2886,6	3528,8	3556,8	3574,8	3718,8	3700,8	3547,7
2908,5	3550,7	3578,7	3596,7	3740,7	3722,7	3569,6
3008,7	3650,9	3678,9	3696,9	3840,9	3822,9	3669,8
3018,9	3661,1	3689,1	3707,1	3851,1	3833,1	3680,0

Tabelle 20: Die Massen der relevanten tryptischen Spaltpeptide der Fraktionen FSN_39.4.-43.4. sind in der Tabelle in verschiedenen Kombinationen addiert. Durch den Vergleich mit der Tabelle der intakten Peptide (siehe Anhang Tabelle B 1, S.111) der alkylierten und reduzierten Fraktionen, ergeben sich Übereinstimmungen, die hier grün markiert sind. Die hellgrün gekennzeichneten Peptidmassen entstehen durch den Verlust von 18 Da⁶ der Peptidmassen, die sich aus der Kombination des N-terminalen Spaltpeptids mit 850,2 Da mit dem Spaltpeptid mit 2757,6 Da bzw. mit dem Spaltpeptid mit 2858,6 Da ergeben.

Die Peptide mit der Masse 3651,0 Da, 3428,1 Da und 3515,1 Da konnten, wie Abbildung 58 darstellt, aus den peptischen Spaltpeptiden rekonstruiert werden.

Hierbei konnte das intakte Peptid mit 3651,0 Da, das in den Fraktionen FSN_39.4.-43.2. vorkam, aus den peptischen Spaltpeptiden 807,2 Da, 1308,2 Da, 991,3 Da und 598,2 Da zusammengesetzt werden. Das intakte Peptid 3428,1 Da konnte aus den Spaltpeptiden 835,2 Da, 1308,2 Da, 404,2 Da und dem C-terminalen Spaltpeptid mit 934,2 Da rekonstruiert werden. Das intakte Peptid mit 3515,1 Da konnte hingegen mit dem C-terminalen Spaltpeptid 1021,3 Da rekonstruiert werden (Tabelle 18, S.83 und Abbildung 58, S.86).

⁶ Wasserverlust

Pepsin Spaltpeptide

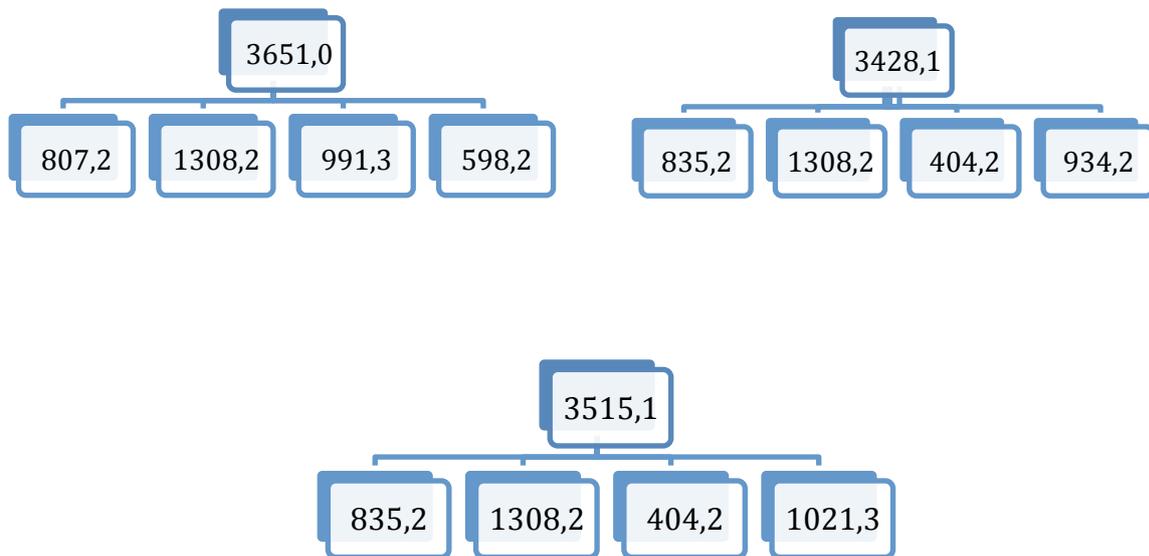


Abbildung 58: Theoretische Rekonstruktion der Peptide mit den Massen 3651,0 Da, 3428,1 Da und 3515,1 Da aus den pepsinischen Spaltpeptiden der Fraktion FSN_{39.4-43.4}.

Das Spaltpeptid mit 1308,2 Da dessen Sequenz bereits von P4 bekannt ist, war in allen Fraktionen (FSN_{39.4-43.4}) durchgehend mit relativ starker Intensität vorhanden. Es ist das zentrale Mittelstück der drei Peptide, die aus den pepsinischen Verdauprodukten theoretisch rekonstruiert werden konnten. Das führte zu der Annahme, dass es sich hierbei um einen relativ konservierten Sequenzbereich handelte. Dies wird unter Kapitel 4.1, S.95, noch eingehender diskutiert.

Das Peptid mit der Masse 3428,1 Da war in den Fraktionen FSN_{43.3} und FSN_{43.4} zu finden. Wie das intakte Peptid 3428,1 Da war auch das Spaltpeptid mit 835,2 Da in den Fraktionen FSN_{43.3} und FSN_{43.4} verstärkt vorhanden. Die Korrelation der Intensität des Spaltpeptids in den Fraktionen FSN_{43.3} und FSN_{43.4} mit der Intensität des Peptids stellt eine Bestätigung der hypothetischen Rekonstruktion des intakten Peptids dar. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass das Spaltpeptid mit 835,2 Da ebenfalls N-Terminus von mindestens einem weiteren Peptid ist, da es bereits in den Fraktionen FSN_{39.4-43.2} vorhanden war. Das Spaltpeptid mit 1308,2 Da war auch hier Teil des Peptids (vgl. Abbildung 58, S.86).

In der theoretischen Zusammensetzung konnte die Sequenz im Anschluss an das Spaltpeptid mit 1308,2 Da durch das Spaltpeptid mit 404,2 Da weiter beschrieben werden.

Das Spaltpeptid mit 404,2 Da kam zum einen in den Fraktionen FSN_39.4. und FSN_43.1. und zum anderen in den Fraktionen FSN_43.3. und 43.4. mit verstärkter Intensität wieder vor. Die Richtigkeit der theoretischen Rekombination der Spaltpeptide wurde auch hier bestätigt, da die Intensität des Spaltpeptids mit der des intakten Peptids korrelierte. Das Spaltpeptid mit 934,2 Da wurde hier als C-terminale Sequenz vermutet. Es war in allen Fraktionen vorhanden: Nahm in der Fraktion FSN_43.1. kurzzeitig zu, in Fraktion FSN_43.2. wieder ab und stieg darauf hin in FSN_43.3. und FSN_43.4. wieder an. Dieser Verlauf korrelierte zum einen mit dem intakten Peptid 3428,1 Da und zum andern mit der ab- und zunehmenden Intensität des Spaltpeptids 404,2 Da. Dies ließ vermuten, dass es sich auch hier möglicherweise um zwei isomere eines Peptids handelt. Das Peptid mit der Masse 3515,1 Da war in der Fraktion FSN_39.4. nur in schwacher Intensität zu finden. Es konnte aus den Spaltpeptiden 835,2 Da, 1308,2 Da, 404,2 Da rekonstruiert werden, aus denen auch das Peptid mit der Masse 3428 Da zusammengesetzt wurde. Die beiden Peptide unterscheiden sich lediglich in der C-terminalen Sequenz, welche hier das Spaltpeptid mit 1021,3 Da war. Dieses war in den Fraktionen FSN_39.4.-43.3. in relativ starker Intensität vorhanden. Auch dieses Spaltpeptid ist wahrscheinlich C-Terminus eines weiteren Peptids.

Wie bereits Tabelle 20, S.85 und der Abbildung 59, S.88, zu entnehmen ist, ließen sich theoretisch elf Peptide aus der Kombination entstandener tryptischer Spaltpeptide zusammensetzen; wobei drei die N-terminale Sequenz mit der Masse 688,2 Da, vier die mit 660,2 Da, zwei die mit 707,2 Da und zwei die mit 850,2 Da besaßen. Betrachtet man das Spektrum des Spaltpeptids m/z 851,2, so lassen sich mehrmalige Wasserverluste feststellen; dies deutet auf einen konjugierten Zucker hin (siehe Abbildung 64, S.91). Subtrahiert man die Masse 162 Da (Hexose) von dem Spaltpeptid mit 850,2 Da, so erhält man die Masse 688,2 Da. Dadurch ließ sich vermuten, dass es sich bei den Peptiden 3428,0 Da und 3571,8 Da sowie bei den Peptiden 3529,0 Da und 3672,8 Da um das jeweils gleiche Peptid mit einer N-terminal konjugierten Hexose handelt, was zu beweisen wäre (vgl. Abbildung 63, S.90 und Abbildung 65, S.91).

Trypsin Spaltpeptide

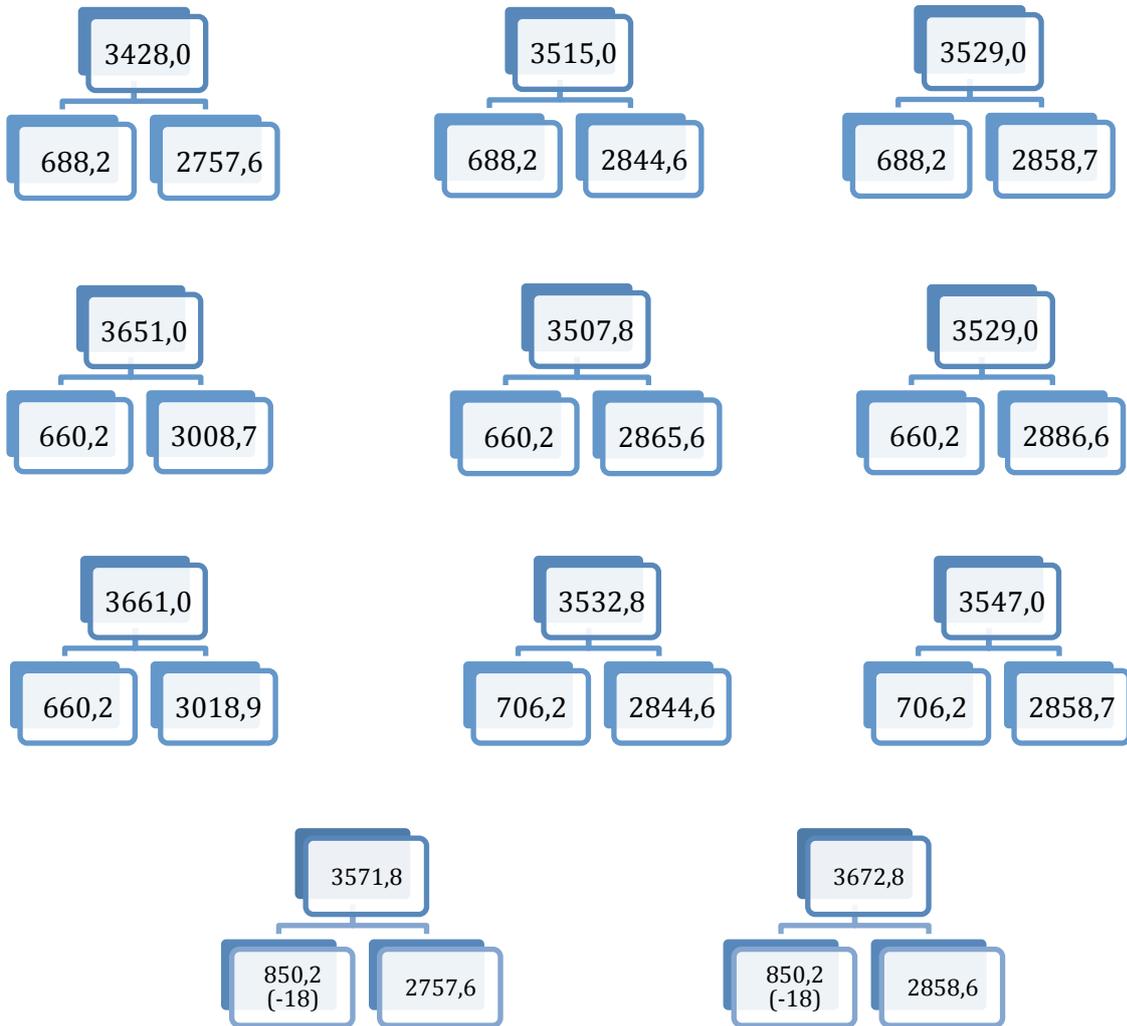


Abbildung 59: Theoretische Rekonstruktion der Peptide mit den Massen 3428,0 Da, 3515,0 Da, 3529,0 Da, 3651,0 Da, 3507,8 Da, 3529,0 Da, 3661,0 Da, 3532,8 Da, 3547,0 Da, 3571,8 Da und 3572,8 Da aus den tryptischen Spaltpeptiden der Fraktionen FSN_{39.4-43.4}.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnten die hier aufgelisteten Peptide nicht vollständig sequenziert werden (vgl. Kap. 4.1, S.95). Im Folgenden werden die sequenzierten Spektren der Spaltpeptide, die den Peptiden zugeordnet wurden, dargestellt.

3.2.5.2 Interpretation der MS-Spektren

Wie auch schon in der vorhergehenden Analyse der MS-Spektren der Spaltpeptide (der Fraktion FSN_{39.2}) wurden die Sequenzinformationen von bereits bekannten

Spaltpeptiden aus Fraktion FSN_31.4., FSN_35.3. und FSN_39.2. genutzt, um etwaige Sequenzübereinstimmungen zu erkennen und abzugleichen.

Aus den peptischen Spaltpeptiden waren folgende Strukturinformationen bekannt.

GlpCWGKFCAPWSPCQSGC.....

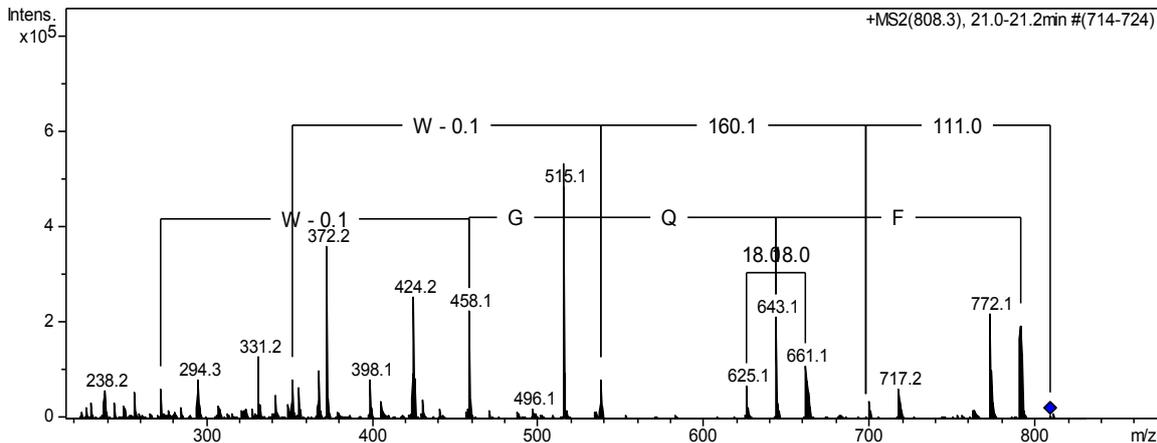


Abbildung 60: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 808,2.

GlpCWGKFCAPWSPCQSGC..... (+Formyl)

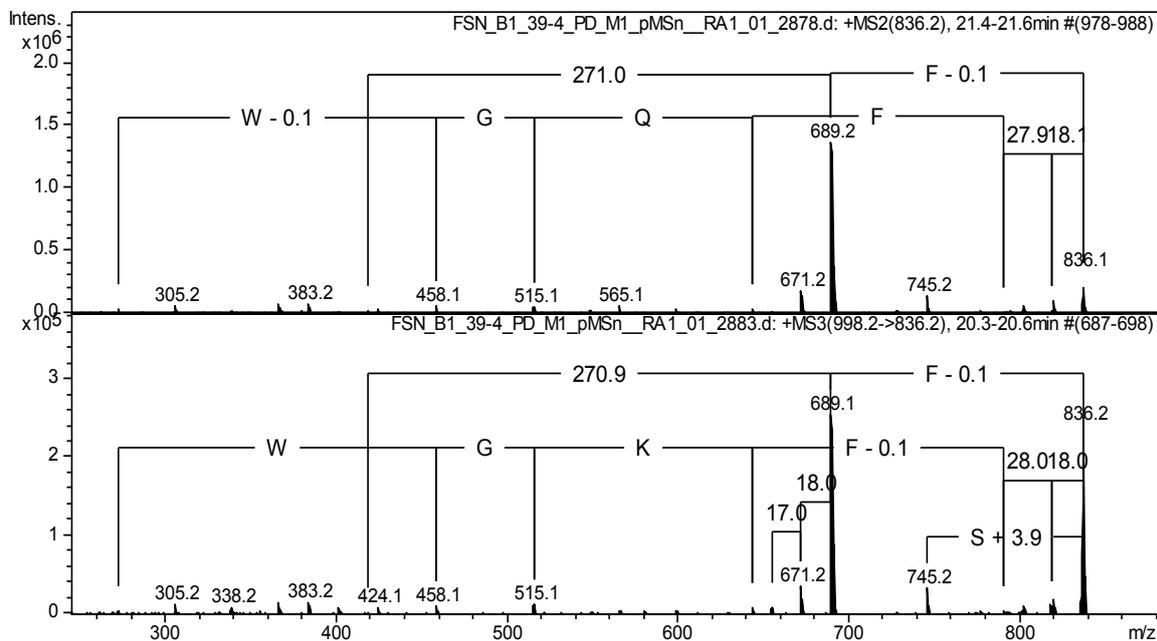


Abbildung 61: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptide m/z 836,2 (Formyl-GlpCWGKFC) und MS³-Spektrum (m/z 998,2→836,2) ausgehend von dem [M+H]⁺-Ion des Pepsin Spaltpeptide mit der Masse 997,2 Da (Formyl-GlpCWGKFC; +Hexose) im Vergleich.

Im Vergleich der Spektren von m/z 808,2 und m/z 836,2 war ersichtlich, dass es sich bei dem Spaltpeptid m/z 836,2 um die formylierte Isoform des Spaltpeptids m/z 808,2 handelte. Daraus ergab sich für beide Spaltpeptide die Sequenz GlpCWGKF. Diese gilt ebenso für das Fragment m/z 998,2, welches die formylierte Isoform des Spaltpeptids mit 807,2 Da mit konjugierter Hexose ist (siehe Abbildung 60, S.89 und Abbildung 61, S.89). Zusätzlich konnte das tryptische Spaltpeptid m/z 661,2 herangezogen werden, welches die Sequenz GlpCWGK ohne das Phenylalanin (F) an Position 6 beinhaltet (vgl. Abbildung 62, S.90). Das tryptische Spaltpeptid m/z 689,2 ist die formylierte Variante der Sequenz GlpCWGK und die hexosekonjugierte formylierte Isoform dieser Sequenz ist das Spaltpeptid m/z 851,2 (siehe Abbildung 64, S.91 und Abbildung 65, S.91).

GlpCWGKFCAPWSPCQSGC.....

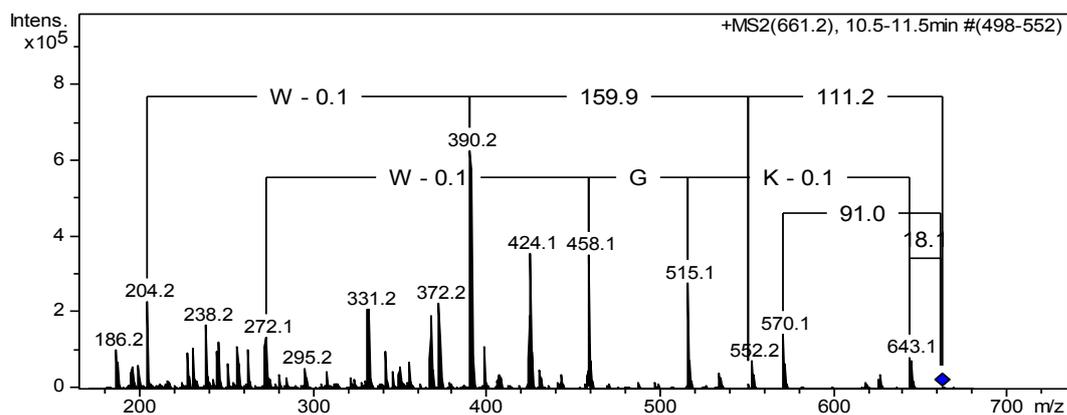


Abbildung 62: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 661,2.

GlpCWGKFCAPWSPCQSGC..... (+Formyl)

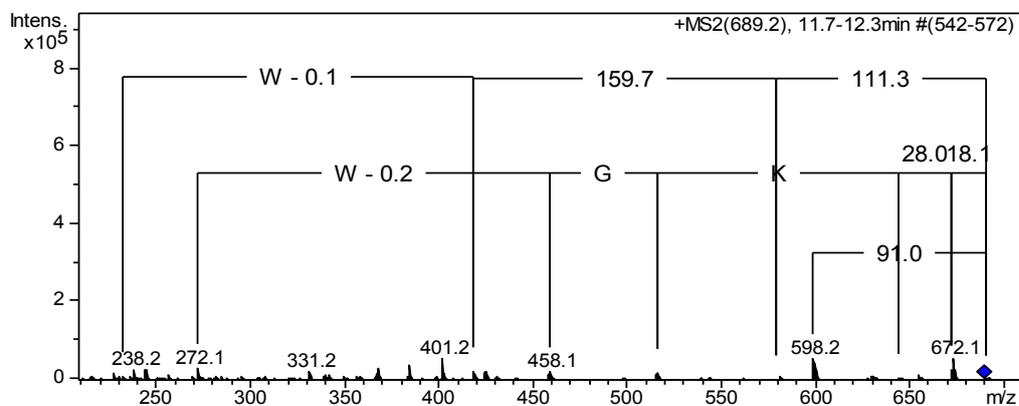


Abbildung 63: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 689,2.

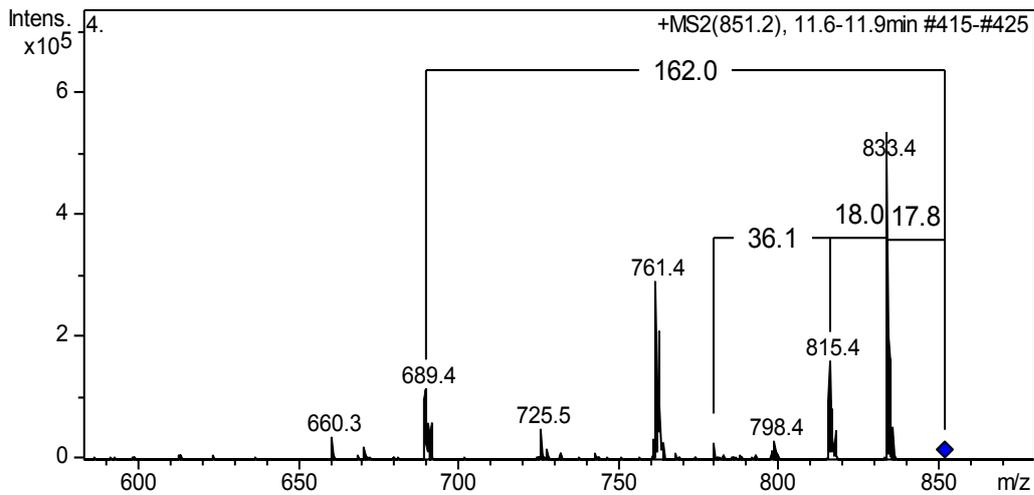


Abbildung 64: MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions des Trypsin Spaltpeptids m/z 851,2.

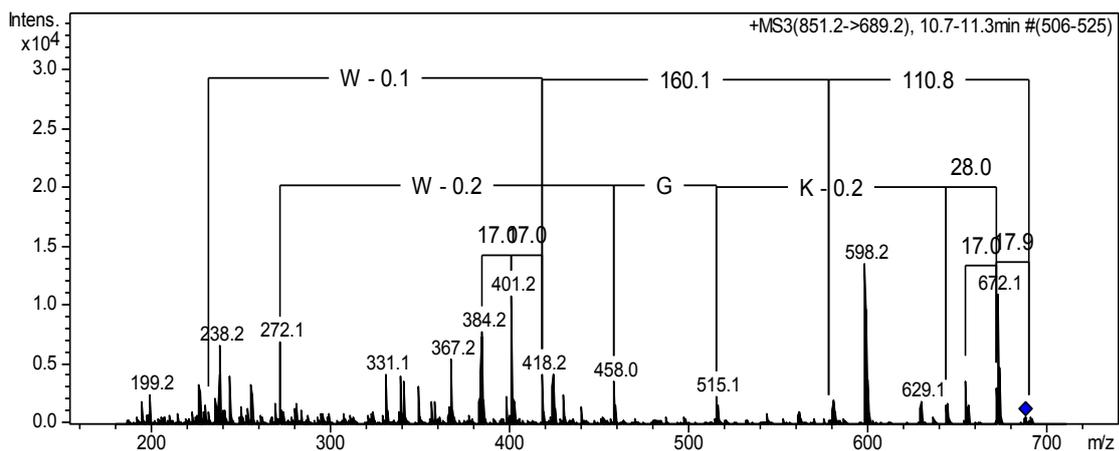


Abbildung 65: MS³-Spektrum (m/z 851,2->689,2) ausgehend von dem [M+H]⁺-Ion des Trypsin Spaltpeptids mit der Masse 850,2 Da.

Wie bereits schon unter Kapitel 3.2.5.1, S.82, erwähnt, ließ sich durch den mehr-maligen Wasserverlust im MS²-Spektrum des Spaltpeptids m/z 851,2 die Abspaltung einer Hexose vermuten und wurde durch das MS³-Spektrum m/z 851,2->689,2 bestätigt (vgl. Abbildung 64, S.91 und Abbildung 65, S.91). Die Hypothese, dass es sich bei den Peptiden 3428,0 Da und 3571,8 Da sowie zwischen 3529,0 Da und 3672,8 Da um sequenzidentische Peptide handelt, die sich in einer N-terminalen Modifikation unterscheiden, wurde hiermit bestätigt.

GlpCWGK**FCAPWSPCQSGC**.....

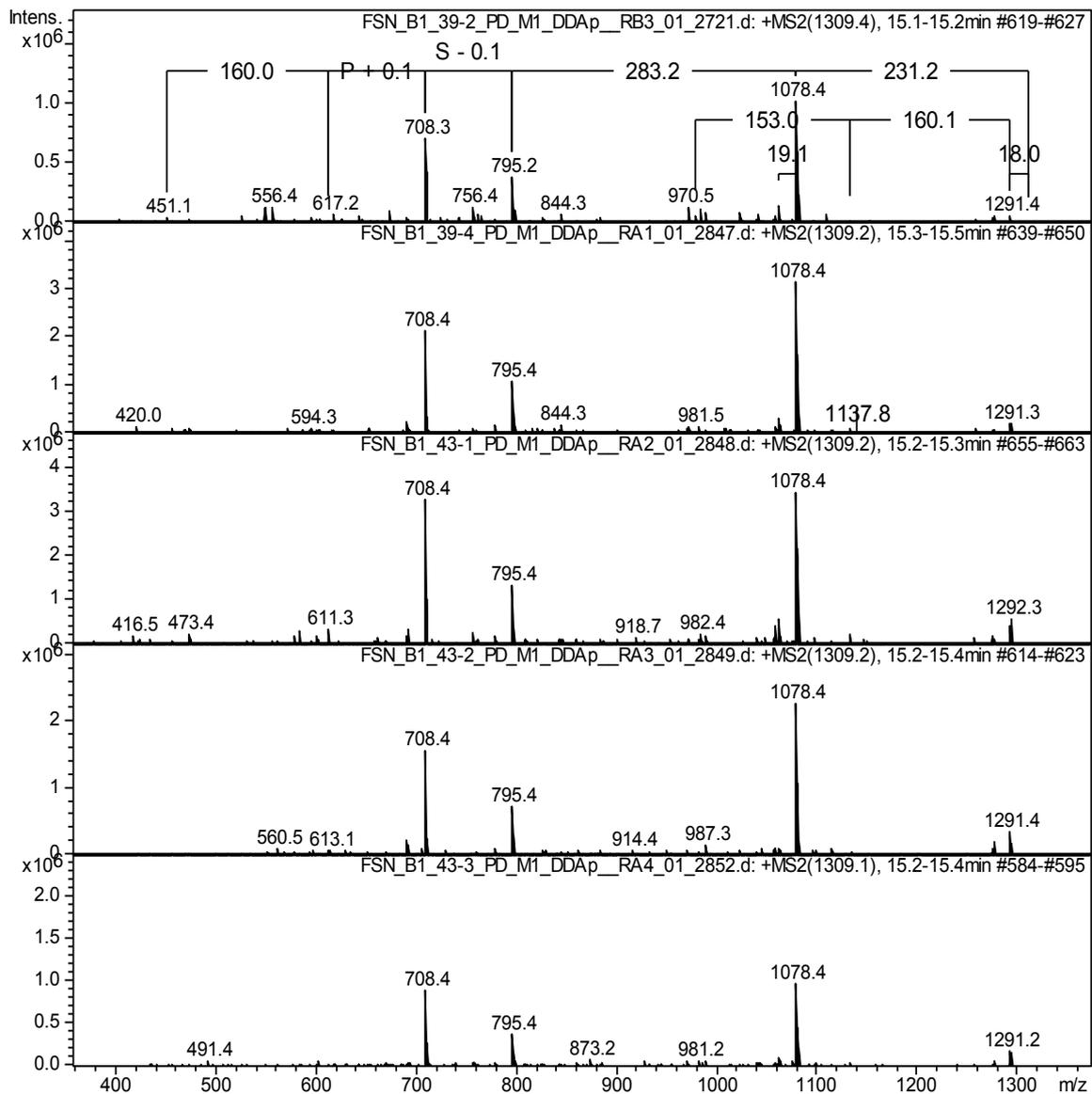


Abbildung 66: MS²-Spektren des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 1309,2 aus (von oben nach unten) FSN_39.2., FSN_39.4., FSN_43.1., FSN_43.2., und FSN_43.3..

Der Vergleich der Spektren des Spaltpeptids mit m/z 1309,2 aus den Fraktionen FSN_39.4.-43.4. und zusätzlich aus der Fraktion FSN_39.2. wird in Abbildung 66, S.92, dargestellt. Der Vergleich zeigte, dass es sich in allen Fraktionen um das gleiche Spaltpeptid handelt. Es ist Spaltpeptid der drei Peptide 3651,0 Da, 3428,1 Da und 3515,1 Da, die aus den peptischen Spaltpeptiden rekonstruiert werden konnten. Aus den Spektren ließ sich die Sequenz FCAPWSPCQSGC auslesen bzw. auch rechnerisch nachvollziehen. Das anschließende Spaltpeptid ist bei den Peptiden 3428,1 Da und

3515,1 Da das Spaltpeptid mit 404,2 Da, aus dessen MS²-Spektrum sich die Sequenz [I/L]C[I/L] ergab (siehe Abbildung 67, S.93).

GIpCWGKFCAPWSPCQSGC **[I/L]C[I/L]**.....

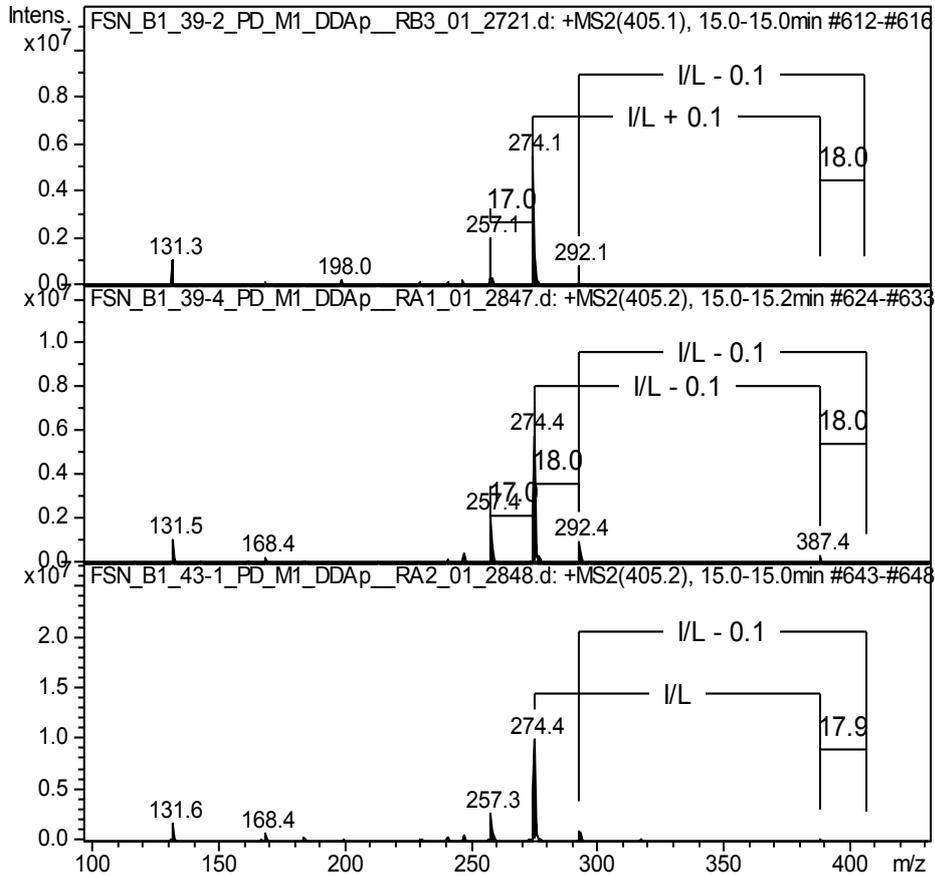


Abbildung 67: MS²-Spektrn des [M+H]⁺-Ions des Pepsin Spaltpeptids m/z 405,2 aus den Fraktionen FSN_39.2., FSN_39.4. und FSN_43.3. (von oben nach unten).

Die C-terminale Sequenz des Peptids 3428,1 Da ließ sich aus dem Spaltpeptid 934,2 Da ermitteln. Das Spaltpeptid mit 1021,2 Da, das theoretisch den C-Terminus des Peptids mit 3515,1 Da bildet, wies große Sequenzhomologie zu dem Spaltpeptid mit 934,2 Da auf (Abbildung 68, S.94). Für die Spaltpeptide konnten die Sequenzen GVS**GTQGG**[I/L] bzw. GVS**GTQGG**[I/L]S ermittelt werden. Allerdings konnten die Sequenzen nicht eindeutig bestätigt werden, da die Reihenfolge der (im Spaltpeptid) N-terminalen Aminosäuren GV/VG nicht mehr geklärt werden konnte. Auch die Sequenzen der übrigen Spaltpeptide, aus welchen die intakten Peptide rekonstruiert wurden, konnten im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr aufgeklärt werden.

GIpCWGKFCAPWSPCQSGC[I/L]C[I/L]GVSGTQGG[I/L]S

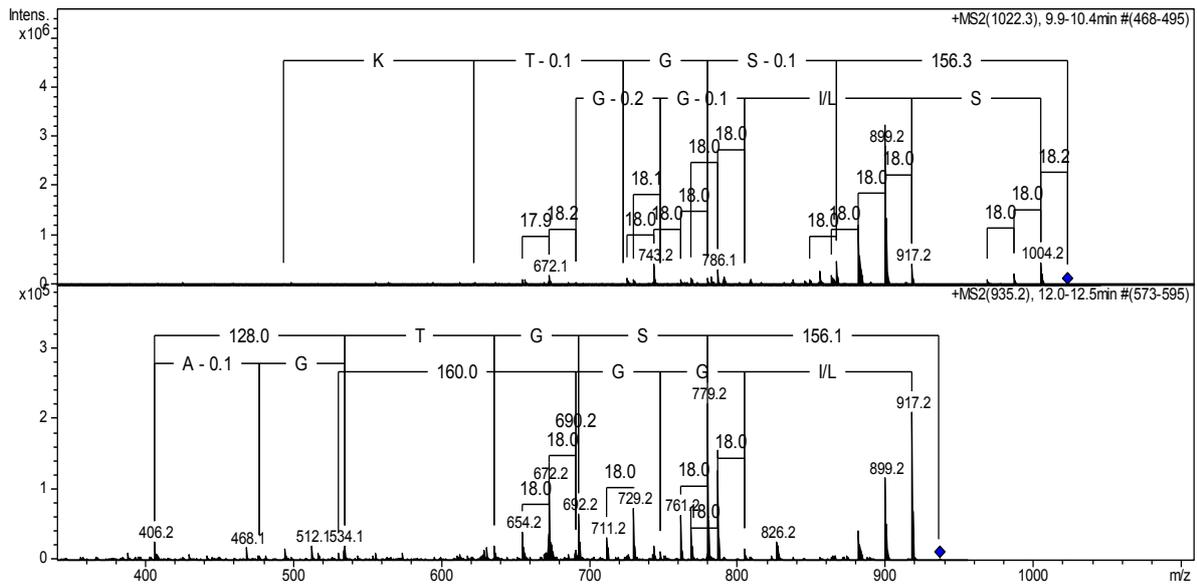


Abbildung 68: MS²-Spektren der [M+H]⁺-Ionen der Pepsin Spaltpeptide m/z 935,2 (unten) und m/z 1022,3 (oben) aus der Fraktion FSN_39.4..

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Peptide aus Fructus Sambuci nigrae analysiert. Dabei konnte die Aminosäuresequenz von vier Hauptpeptiden vollständig aufgeklärt werden. Im Folgenden werden die ermittelten Sequenzen verglichen und noch bestehende Unklarheiten diskutiert.

4.1 Aminosäuresequenzen der identifizierten Peptide im Vergleich

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier identifizierten Peptide zeigt in weiten Sequenzbereichen eine sehr ähnliche bzw. homologe Sequenz. Alle vier Peptide besitzen sechs Cysteine (C), die drei peptidinterne Disulfidbrücken ausbilden; über diese wird die lineare Aminosäuresequenz der Peptide quervernetzt (vgl. Tabelle 21, S.95).

Fraktion	Peptid	AS-Sequenz
FSN_31.4.	P1	VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGC T C F PSP V GACY[K/Q]
FSN_35.3.	P2	GlpC W GKGCAPWSPCQSGC T C V GVGGQ[I/L]GACTGP I
FSN_35.3.	P3	GlpC W GKGCAPWSPCQSGC T C V GVGGQ[I/L]GACTGP L
FSN_39.2.	P4	GlpC W GKGCAPWSPCQSGC T C [I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP [I/L]
FSN_39.4. -43.4.		GlpC W GKFCAPWSPCQSGC [I/L]C [I/L]

Tabelle 21: Sequenzvergleich der identifizierten Peptide. Die Cysteine (C), die die peptidinternen Disulfidbrücken bilden, sind hier rot und konservierte Sequenzbereiche grün gekennzeichnet.

Es konnten zwei verschiedene N-terminale Sequenzen bestimmt werden. Der N-Terminus des Peptids P1 VQC[I/L]GK(F) existiert mit verschiedenen Modifikationen: Es konnte neben der unmodifizierten Form eine Isoform der N-terminalen Sequenz mit einer Formylgruppe (+28 Da) gefunden werden. Beide Sequenzen – sowohl mit als auch ohne Formylgruppe – konnten auch mit einer konjugierten Hexose (+162 Da) identifiziert werden.

Die Formylierung am N-Terminus ist vermutlich ein chemisches Artefakt, das durch eine Reaktion mit der dem Lösungsmittel zugesetzten Ameisensäure entsteht. Die im Bereich des N-Terminus konjugierte Hexose, die auch an anderen Stellen in der Sequenz

gefunden wurde, ist wahrscheinlich auf den hohen Zuckergehalt in der Beere zurückzuführen. Es handelt sich dabei nicht um eine gezielte, enzymatische Glykosylierungsreaktion, sondern um eine unspezifische Anlagerung eines Zuckers, der sich vor allem an nukleophilen Aminosäuren wie Lysin (K) oder Serin (S) und dem N-Terminus anlagerte.

So konnten, wie unter Kapitel 3.2.4, S.65, beschrieben, die Aminosäuresequenz von P1 mit keiner, einer, zwei bzw. drei konjugierten Hexosen identifiziert werden. Zusätzlich konnte jede dieser Varianten einmal mit +28 Da und einmal mit +46 Da gefunden werden (siehe Abbildung 41, S.68). Der Massenzuwachs von 28 Da entspricht der Formylierung. Die Ursache des Massenzuwachses von 46 Da konnte bislang nicht geklärt werden.

Neben der in der Nähe des N-Terminus konjugierten Hexose, konnte eine weitere Hexose im Sequenzbereich PSPVG identifiziert werden. Diese schien anders als die N-terminale Hexose gebunden zu sein, da das Massenspektrum ein anderes Fragmentierungsmuster aufwies (Abbildung 50, S.76, Abbildung 51, S.76, Abbildung 55, S.78 und Abbildung 54, S.77). Das Spektrum m/z 997,8 (Abbildung 51, S.76) zeigt die Ionenserie dieses Sequenzbereiches auch um 162 Da verschoben. Der kleinste Massenpeak dieser +162 Da-Serie ist dabei der Peak bei m/z 1140,4 (+162 Da zu m/z 978,5 verschoben). Das Fragmentierungsmuster des Pepsin Spaltpeptids m/z 541,2 zeigt, dass die Hexose nicht an der C-terminalen Sequenz ACY[K/Q] gebunden ist (Abbildung 56, S.79). Dadurch konnte die konjugierte Hexose mit großer Sicherheit an dem Serin (S) an Position 23 der Sequenz lokalisiert werden, da die OH-Gruppe des Serins (S) die einzig Position ist an der eine Hexose in der Sequenz PSPVG konjugiert sein kann.

Die Peptidvarianten, die über die Auswertung der LC-MS Daten der intakten Peptide als Isoform mit drei bzw. vier konjugierten Hexosen identifiziert wurden, konnten durch die Spaltpeptide des enzymatischen Verdau nicht bestätigt bzw. es konnten keine weiteren Fragmente mit einer konjugierten Hexose gefunden werden. Da die Peptidvarianten jedoch nur in einer geringen Konzentration vorhanden waren und die Modifikation für die Analyse auch keine vorrangige Bedeutung hat, wurde auch nicht explizit nach der Lokalisation der dritten bzw. vierten Hexose gesucht.

Die Aminosäuren Lysin (K) und Glutamin (Q), sowie Isoleucin (I) und Leucin (L) sind im Massenspektrum nicht zu unterscheiden, da sie ein sehrähnliches bzw. identisches

Molekulargewicht besitzen (vgl. Tabelle 1, S.24). Deshalb muss auf andere Identifikationsmethoden, wie den enzymatischen Verdau, oder auf MS-Experimente mit externen Vergleichsproben zurückgegriffen werden.

Die Sequenz von P1 (VQC[I/L]GKFCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]) wurde durch Trypsin spezifisch nach Position 6 gespalten. Dadurch konnte die Aminosäure eindeutig als ein Lysin (K) bestimmt werden.

Da die Sequenz weder nach Position 2, noch nach Position 15 eine spezifische Spaltstelle für Trypsin aufwies, war dies ein eindeutiger Hinweis darauf, dass es sich bei den Aminosäuren um ein Glutamin (Q) handelte (siehe Tabelle 16, S.71). Die letzte Aminosäure der Sequenz konnte aufgrund der vorliegenden Daten nicht eindeutig als Q oder K bestimmt werden.

An der Position 4 der Sequenz zeigten die Sequenzierungsergebnisse ein Isoleucin (I) bzw. Leucin (L). Eine genaue Aussage über die Identität der Aminosäure kann hier erst nach gezielten Vergleichsexperimenten mit den synthetisierten Sequenzvarianten gemacht werden. Diese sind bereits in Planung und werden in einer anschließenden Arbeit durchgeführt.

Für den N-Terminus der Peptide P2 und P3 konnte die Sequenz GlpCWGK(G) sequenziert werden. Dabei handelte es sich bei der N-terminalen Aminosäure um ein zyklisiertes Glutamin – eine Pyroglutaminsäure (Glp). Dies ist keine ungewöhnliche Modifikation; sie ist häufig in der Literatur beschrieben. Dabei zyklisiert die freie Aminogruppe einer N-terminalen Glutaminsäure (E) oder eines Glutamins (Q) mit der Seitenkette spontan zu einem Laktamring (Podell et al., 1978). Setzte man das N-terminale Pyroglutamat (Glp aus P2 und P3) mit dem Glutamin (Q an Position 2) aus der N-terminalen Sequenz von Peptids P1 gleich, so zeigte der Vergleich der Sequenzen einen Austausch eines Isoleucins bzw. Leucins ([I/L]) gegen ein Tryptophan (W; Position 2 bzw. 3) und eines Phenylalanins (F) gegen ein Glycin (G) (Position 6 bzw. 7). Die Sequenz ist ansonsten unverändert.

Der weitere Sequenzvergleich der Peptide P2 bzw. P3 mit P1 zeigte eine weitgehende Übereinstimmung der Sequenzen bis Position 19 bzw. 20. Der einzige Unterschied in diesem sehr konservierten Sequenzbereich ist der Austausch eines Serins (S) gegen ein Threonin (T) an Position 15 bzw. 16. Ab Position 19 der Peptide P2 und P3 zeigte die Sequenz keine signifikanten Ähnlichkeiten mehr zur Sequenz von P1. Ausschließlich die Aminosäuren von Position 26-28 (in P1) und Position 27-29 (in P2 und P3) haben noch

eine übereinstimmende Sequenz. Da im tryptischen Verdau keine Spaltpeptide einer enzymspezifischen Spaltstelle an Position 25 gefunden werden konnten – wurde von einem Glutamin (Q) an dieser Position ausgegangen.

Die Peptide P2 und P3 besitzen die gleiche Masse und unterschieden sich lediglich in ihren Retentionszeiten. Die ausgelesene Sequenz der beiden Peptide ist „identisch“. Alle Spaltpeptide, die die C-terminale Sequenz beinhalten, konnten jeweils bei zwei unterschiedlichen Retentionszeiten gefunden werden. So ließ sich aufgrund der Retentionszeitverschiebung der Peptide und derer C-terminaler Spaltpeptide, ein Sequenzunterschied in einer Aminosäure vermuten, wobei es sich sowohl um Leucin (L) als auch um Isoleucin (I) handeln könnte, die im Massenspektrometer nicht zu unterscheiden sind.

Da die Retentionszeitverschiebung auch bei den kleinsten C-terminalen Spaltpeptiden ACTGP[I/L] festzustellen war, konnte der isomere Unterschied in der letzten Aminosäure – im Austausch eines Leucin gegen ein Isoleucin – lokalisiert werden. Welches Signal allerdings zu welchem Isomer gehört, muss durch den Vergleich der Spaltpeptide (469,1 Da) mit synthetisierten Peptiden der gleichen Sequenz noch bestimmt werden.

Das Peptid P4 besitzt die gleiche Aminosäuresequenz wie die Peptide P2 und P3, lediglich der Austausch einer Aminosäure – eines Valins (V) an Position 20 gegen ein Isoleucin (I) bzw. Leucin (L) – unterscheidet die Sequenzen voneinander. Für P4 konnte allerdings nur eine isomere Form der C-terminalen Sequenz gefunden werden. Um welche es sich dabei handelt, ist noch zu klären.

Da für die aus den Fraktionen FSN_39.4.-43.4. rekonstruierten Peptide die Sequenzen nicht vollständig ermittelt werden konnten, kann hier nur eine spekulative unvollständige Sequenz diskutiert werden: GlpCWGKFCAPWSPCQSGC[I/L]C[I/L].....

Diese zeigte große Sequenzähnlichkeiten mit der N-terminalen Sequenz von P2, P3 und P4 (vgl. Tabelle 21, S.95) lediglich an Position 6 war in dieser Sequenz, wie auch an Position 7 bei P1, ein Phenylalanin (F) zu finden. Der mittlere Sequenzbereich, der sehr konserviert ist, war auch hier bis Position 17 unverändert. An Position 14 konnte, wie schon bei den Peptiden P2, P3 und P4, ein Serin (S) identifiziert werden. Die anschließende Sequenz [I/L]C[I/L] zeigt Ähnlichkeit mit der Sequenz von P4; so unterscheiden sich die Sequenzbereiche der Peptide im Austausch eines Threonins (T)

gegen ein Isoleucin (I) bzw. Leucin (L) an Position 18. Die C-terminale Sequenz konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr vollständig sequenziert werden.

Die Peptide zeigen in weiten Bereichen eine sehr konservierte Struktur; so befinden sich die strukturgebenden Cysteine (C) in allen Peptiden ungefähr in gleichen Abständen zueinander (vgl. Tabelle 21, S.95). Durch den Sequenzvergleich wurde ersichtlich, dass auch die Sequenz in weiten Teilen übereinstimmt. Die variablen Bereiche befinden sich an den Termini, sowie im Mittelteil zwischen Position 19 bzw. 20 und 26 bzw. 27 der Sequenzen.

Für die sequenzierten Peptide aus *Fructus Sambuci nigrae* konnte bei der Recherche in der nicht redundanten Proteindatenbank mittels „NCBI BLAST“ keine signifikante Sequenzhomologie zu bereits bekannten Peptiden gefunden werden.

4.2 Antivirale Wirkung

Durch die Erkenntnis, dass cysteinreiche Peptide eine wichtige Rolle im Bereich der Immunabwehr spielen und ihnen häufig eine antibakterielle, antifungizide oder antivirale Wirkung, aber auch eine immunstimulierende Wirkung zugeschrieben wird, sind sie eine Substanzklasse, die potentiell einen neuen Therapieansatz im Kampf gegen Infektionen darstellt. So befinden sich derzeit einige Präparate in klinischen Studien. Der Forschungsschwerpunkt liegt bislang auf äußeren Anwendungen, da die Bioverfügbarkeit der Peptide bei oraler Einnahme oft nicht gewährleistet werden kann. Dabei sind z.B. Präparate gegen die bakterielle Infektion von Kathetern und auch solche mit antiviraler Wirkung im Fokus der Forschung; so ist ein Forschungsansatz die Entwicklung „chemischer Kondome“, die eine Infektion sexuell übertragbarer Erkrankungen, wie HIV (*Humaner Immundefizienz Virus*) oder HSV (*Herpes simplex Virus*) verhindern sollen (Zasloff, 2002; vgl. Hellmayr, 2012).

Da auch in Holunderbeeren eine hohe Konzentration von cysteinreichen Peptiden gefunden werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass eine antivirale Wirkung – die bereits in einer Studie belegt wurde – von den Peptiden ausgeht bzw. mit bestimmt sein könnte. So konnte in einer Studie an Influenza-A- und B-erkrankten Patienten mit

Sambucol®, einen Holunderbeerenextrakt, eine Verkürzung der Krankheitszeit um vier Tage erreicht werden (Zakay-Rones et al., 2004).

Parallel zu dieser Arbeit konnte in in-vitro Tests an Influenza-A-Virus-Kulturen eine antivirale Wirkung der hier untersuchter Peptidfraktionen (von Fructus Sambuci nigrae) nachgewiesen werden (Prof. Oliver Planz; Eberhard Karls Universität Tübingen). Durch weitere gezielte Testungen der Einzelfraktionen an Virenkulturen besteht eventuell die Möglichkeit, die Wirkung bestimmten Peptiden zuzuordnen. Ebenso zeigen erste Ergebnisse eine immunmodulierende Wirkung der Peptide (Dr. Carsten Gründemann; Universitätsklinikum Freiburg).

Noch zu klären bleibt, ob die antivirale Wirkung der Holunderbeere ausschließlich auf der Wirkung der cysteinreichen Peptide beruht, oder ob diese nur mitverantwortlich für die antivirale Wirkung sind. Dafür wären noch weitere Vergleichstests mit einem Gesamtextrakt der Beere bzw. entsprechenden Reihnssubstanzen erforderlich.

Die Identifizierung einer antiviralen Komponente in Fructus Sambuci nigrae kann die Grundlage für die Entwicklung einer neuen Klasse von Arzneistoffen darstellen; zudem besteht die Aussicht durch weitere Experimente Fructus Sambuci nigrae in das Europäische Arzneibuch aufzunehmen.

5 Zusammenfassung

In der Volksmedizin und auch in der Phytotherapie ist *Sambucus nigra* eine Arzneidroge, die vor allem bei Grippe und grippalen Infekten angewendet wird. Vorangegangene Diplomarbeiten zeigten, dass Früchte, Blüten, Blätter und Rinde des schwarzen Holunders, neben anderen Inhaltsstoffen, eine relevante Menge cysteinreicher, linearer Peptide enthalten. Peptide sind ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr; sie sind ein Schutz der Pflanze gegen Fraßfeinde, Bakterien-, Pilz- und Virusinfektionen.

In dieser Arbeit wurden vier der in Holunderbeeren enthaltenen Hauptpeptide mittels LC-MS Analyse sequenziert und die Daten für mindestens ein weiteres gesammelt. Alle vier Peptide besitzen sechs konservierte Cysteine (C) in nahezu identischer Position, die drei interne Disulfidbrücken ausbilden und die Peptide so quervernetzen und stabilisieren. Auch sonst weisen die Peptide über weite Bereiche eine hohe Sequenzähnlichkeit auf, wohingegen andere Bereiche und insbesondere die Termini deutlich weniger konserviert sind. Besonders interessant ist hierbei, dass die Sequenzen der Peptide keine relevante Homologie zu anderen bisher bekannten Peptiden oder Proteinmotiven aufweisen.

Pflanzliche Peptide sind als Ausgangssubstanzen für die Arzneistoffentwicklung von Bedeutung. Die sequenzierten Peptide zeigen bei in Kooperation durchgeführten in-vitro-Tests eine antivirale und immunmodulierende Wirkung und sind dadurch eine mögliche Grundlage für neue Entwicklungen.

6 Abstract

Sambucus nigra is a herbal drug that is used in traditional European medicine and phytotherapy for the treatment of influenza and common cold. Preceding diploma theses showed that fruits, flowers, leaves and cortex of black elder contain a significant amount of linear, cystein-rich peptides. Plant peptides are part of the innate immune system of plants. They have been shown to possess antibacterial, antifungal and antiviral properties and thereby, they are protecting the plant from infections.

In this thesis, four main peptides of the elder berries were sequenced by LC-MS analysis and data for at least one more peptide were collected. The four peptides contain six cysteins (C) at almost identical positions. These cysteins form three internal disulfid bridges, which crosslink and stabilize the peptides. The peptides show high sequence similarity for large parts, but they also contain less conserved regions. Particularly the terminal sequences show significant variations in the sequence. Most notably, the peptides that were sequenced in this thesis do not show relevant homology to any published peptide sequences or protein motifs.

Plant peptides are promising leads for the development of new drugs due to their therapeutic potential. In cooperation with external research groups, anti-influenza viral and immunomodulatory activity of peptide fractions from *Sambucus nigra* could be shown in cell assays. Further studies to elucidate the potential of the here sequenced peptides for drug development should therefore be conducted.

7 Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielles Peptid
BPC	Basispeak-Chromatogramm
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektrosprayionisation
Glp	Pyroglutaminsäure
HCOOH	Ameisensäure
HIV	<i>Humaner Immundefizienz Virus</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSV	<i>Herpes simplex Virus</i>
LC	Liquid Chromatography
LDL	Low Density Lipoprotein
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natronlauge
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung
RP-Material	Reversed-Phase Material
SPE	Solid-Phase Extraction
UpM	Umdrehungen pro Minute

8 Literaturverzeichnis

Anonym; 2009. *Kochrezept*.

<http://www.chefkoch.de/rezepte/538381150978444/Holundersaft.html> (Zugriff am 11.November 2013).

Anonym; 1994. *Sambucus nigra L.* In *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. Bd. 6, eds. Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. eds. Springer Press: Berlin, Heidelberg, New York, 579-586.

Alexandrov, M. L., Gall, L. N., Krasnov, N. V., Nikolaev, V. I., Pavlenko, V. A. und Shkurov, V. A.; 1984. *Ion extraction from solutions at atmospheric-pressure - a method of mass-spectrometric analysis of bioorganic substances* [in Russisch]. Dok Akad Nauk SSSR 277: 379-383.

Atkinson, M. D., und Atkinson, E.; 2002. *Biological Flora of the British Isles - Sambucus nigra L.*, J Ecol 90: 895–923.

Barak, V., Halperin, T. und Kalickman, I.; 2001. *The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines*. Eur Cytokine Network: 290-296.

Biemann, K.; 1992. *Mass spectrometry of peptides and proteins*. Annu Rev Biochem 61: 977-1010.

Blumenthal M.; 1998. *The Complete German Commission E Monographs*. The American Botanical Council: Austin, Texas.

Bruker Daltonics; 2008. *Esquire HCT Series User Manual*. Bd. 1. Bremen: Bruker Daltonics.

Budzikiewicz, H., und Schäfer, M.; 2005. *Massenspektrometrie - Eine Einführung*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Chen, Y., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.; 2002. *The Sambucus nigra Typ-2 ribosom-antiactivating protein SNA-I` exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco*.

FEBS Lett 516: 27-30.

Citores, L., Ferreras, J. M., Munoz, R., Benítez, J., Jiménez, P., Girbès, T.; 2002. *Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic typ-2 ribosome-inactivating protein nigrin b or erbulin I*. Cancer Lett 184: 29-35.

Dole, M., Hines, R. L., Mack, L. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D. und Alice, M. B.; 1968a. *Gas phase macroions*. Macromolecules 1: 96-97.

Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D. und Alice, M. B.; 1968b. *Molecular beams of macroions*. J Chem Phys 49: 2240-2249.

Farrokhi, Naser, Whitelegge, Julian P., Brusslan, Judy A.; 2008. *Plant peptides and peptidomics*. Plant Biotechnol J 6: 105-134.

Fischer, M. A., Oswald, K., Adler, W.; 2008. *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol*. Linz: Land Oberösterreich, Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen.

Gruber, C. W. und O'Brien, M.; 2011. *Uterotonic Plants and their Bioactive Constituents*. Planta Med 77: 207-220.

Haas H., Falcone F. H., Schramm G. et al.; 1999. *Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and IL-13 from human basophils*. Eur J Immunol 29: 918-927.

Hellmayr, Johanna.; 2012. *Isolierung, Charakterisierung und Analytik von cysteinreichen Peptiden aus Sambucus nigra L.* Diplomarbeit. Universität Wien.

Hemgesberg, H.; 1998. *Natürlich gesund mit Holunder*. Augsburg: Midena Verlag.

Horvath, C., Melander, W., and Molnar, I.; 1976. *Solvophobic Interactions in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases*. J Chromatogr 125: 129-156.

Iribarne, J.V. and Thomson, A.; 1976. *On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets*. J Chem Phys 64: 2287-94.

Kastner, M.; 2000. *Protein liquid chromatography*. Elsevier, Amsterdam.

Kebarle, P. and Tang, L.; 1993. *From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase. The Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry*. Anal Chem 65: 972A- 986A.

König, J., Rudolf, E.; 2006. *Methoden der Experimentellen Ernährungsforschung, der Genetik und molekularer Mechanismen in der Ernährung (LC-MS Vorbereitung 2)*
http://www.univie.ac.at/nutrigenomics/teaching/vo_methoden/LC_MSTeil2.pdf.
(Zugriff: 10. September 2013).

Lehmann, T.; *Massenspektrometrie*. Freie Universität Berlin 1998/2010
<http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~tlehmann/gp/ms.pdf> (Zugriff am 23. Dezember 2013).

Lohninger, H., Fröhlich, J., Mizaikoff, B., Rosenberg, E.; 2010. (aktualisiert am 14. Dezember 2010). *Teach/Me Instrumentelle Analytik*. http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_iontrap.html. (Zugriff am 06. August 2013).

Mack, L.L., Kralic P., Rheude A., and Dole M.; 1970. *Molecular beams of macroions*. II. J. Chem Phys 52: 4977-4986.

Monroe, M.; 2013. (aktualisiert am 19. May 2013).
<http://www.alchemistmatt.com/MwtHelp/PeptideFragModelling.htm>. (Zugriff am 8. September 2013).

Pfeiffer Vakuum GmbH; 2005. *Massenspektrometer Kathalog*. <http://www.physik.uni-kl.de/aeschlimann/lectures/OFSS08/Hilfsmittel03.pdf>. (Zugriff am 10. Oktober 2013).

Podell, David N., Abraham, George N.; 1978. *A technique for the removal of pyroglutamic acid from the amino terminus of proteins using calf liver pyroglutamate amino peptidase*. Biochem Biophys Res Commun 81: 176–85.

Roepstorff, P. und Fohlman, J.; 1984. *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom 11: 601.

Schmelzer, C.; 2007. *Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinhydrolysaten: Verdaustudien an β -Casein und Strukturuntersuchungen an Elastin*. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Schmelzer, C.; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften Institut für Pharmazie. 2002. (aktualisiert am 15. Oktober 2012). *Methodenspektrum*. <http://www.pharmtech.uni-halle.de/deutsch/ag-biopharm/elastin-methoden.htm>. (Zugriff am 08. September 2013).

Semper, B.; 2012. *Phytochemisches Screening auf Pflanzenpeptide in ausgewählten Drogen*. Diplomarbeit. Universität Wien.

Thevenon, G. and Regnier, F. E.; 1989. *Reversed-phase liquid chromatography of proteins with strong acids*. J Chromatogr 476: 499-511.

Vandenbussche, F., Desmyter, S., Ciani, M., Proost, P., Peumans, W. J., Van Damme E. J.; 2004. *Analysis of the in planta antiviral activity of elderberry ribosome-inactivating protein*. Eur J Biochem 271: 1508- 1515.

Vatansever, B.; 2007. *Elektrospray-Ionisations- Massenspektrometrie als Tool für die Qualitative und die Quantitative Protein- und Peptidanalytik*. Bio- und Werkstoffwissenschaften- der Universität des Saarlandes.

Vlachojannis, J. E., Cameron, M., Chrubasik, S.; 2010. *A Systemstic Review on the Sambuci fructus Effect and Efficacy Profiles*. Phythother Res 24: 1-8.

Wang, H., Guohua, C., Prior, L.R.; 1997. *Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins*. J Agric Food Chem 45: 304-309.

Wenigmann, M.; 1999. *Phytherapie: Arzneipflanzen, Wirkstoffe, Anwendung*. München: Verlag Urban & Schwarzenberg.

Worthington Biochemical Corporation; 2014a. *Worthington Enzyme Manual – Pepsin*. <http://www.worthington-biochem.com/PM/default.html>. (Zugriff am 15. Oktober 2013).

Worthington Biochemical Corporation; 2014b. *Worthington Enzyme Manual – Trypsin*. <http://www.worthington-biochem.com/TRY/default.html>. (Zugriff am 15. Oktober 2013).

Yamashita, M. und Fenn, J. B.; 1984a. *Electrospray ion-source - another variation on the free jet theme*. *J Phys Chem* 88: 4451-4459.

Yamashita, M. und Fenn, J. B.; 1984b. *Negative-ion production with the electrospray ion-source*. *J Phys Chem* 88: 4671-4675.

Zakay-Rones, Z.; Thom, E.; Wollan, T. und Wadstein, J.; 2004. *Randomized Study of the Efficacy and Safety of Oral Elderberry Extract in the Treatment of Influenza A and B Virus Infections*. *J Int Med Res* 32: 132-140.

Zaslhoff, M.; 2002. *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. *Nature* 415: 389-395.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit einzuholen. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

9 CURRICULUM VITAE

Anne Jilg

AKADEMISCHE BILDUNG

- 1995-2004 **Allgemeine Hochschulreife**
Lion Feuchtwanger Gymnasium
München, 15.06.2004
- 2005-2008 **B.Sc. in Molekularer Biotechnologie an der**
Technischen Universität München
Bachelorarbeit am Department für Pharmakologie und
Toxikologie unter Univ.-Prof. Hofmann
- 2008-2014 **Pharmaziestudium an der Universität Wien**
seit Sep. 2008 - geplanter Abschluss April 2014
Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie
unter Univ.-Prof. Dirsch, Univ.-Prof. Glasl-Tazreiter
und Dr. Zehl

STIPENDIUM

- 2007 **Erasmus Mobilitätsstipendium**
Universität für Bodenkultur, Wien SS 2007

BERUFLICHE ERFAHRUNG

- 2004-2005 **Anstellung im Einzelhandel, in der Gastronomie und**
Kinderbetreuung
München, Sep.-Dez. 2004
München, Aug.-Sep. 2005
- 2011 **Famulatur in der Bahnhof-Apotheke**
Kempten, Jul.-Aug. 2011
- 2013 **Werkvertrag am Lehrstuhl für Pharmakognosie**
Universität Wien, Wien, 01.10.-29.11.2013
Massenspektrometrische Analytik von Peptiden
- 2014 **Geringfügige Anstellung in der Alten Löwen Apotheke**
Wien, seit Jan. 2014

SRACHKENNTNISSE

- Sprachen**
Deutsch Muttersprache / Englisch B1 / Französisch A2
- 2005 **Sprachaufenthalte**
England, Worthing, Jan.-Apr. 2005
Frankreich, Bordeaux, Mai-Jul. 2005

10 Anhang

	MW	Peptid	Mod	31.1.	31.2.	31.3.	31.4.	35.1.	35.2.	35.3.	35.4.	39.1.	39.2.	39.3.	39.4.	43.1.	43.2.	43.3.	43.4.
861,2	2580,6			(x)	x														
1273,6	3817,8			(x)															
1229,0	3684,0	P1	+Hex		xx	xx	xxxx	xxxx	xxxx	xxx	x	x	x						
1283,0	3846,0	P1	+2Hex		xxx	xxx	xxxx	xxx	xxxx	xx	(x)	(x)	(x)						
974,0	3892,0		+46		x	xxx	xxx	xxx	xxx	x	(x)	(x)							
1337,0	4008,0	P1	+3Hex		xxx	xx	xxx	x											
1005,5	4018,0				x	xx	x	x											
1010,1	4036,4	P1	+28		x	x	x	x											
1014,5	4054,0		+46		xx	x	xxx	x											
1244,4	3730,2		+46		(x)	xx	xxx	x(x)	xxx	xx	x	(x)	(x)						
1391,0	4170,0	P1	+4Hex		x	x													
991,1	2970,3					x	xx		xx										
893,2	2676,6								xxx	x	x	x							
929,0	3712,0							xx	xx	x	x								
969,3	3873,2							xxx	xx	x	x								
1175,0	3522,0	P1				xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	(x)							
1219,0	3654,0								(x)	x									
1289,3	3864,9								(x)	x	(x)								
1292,8	3875,4							xx	xx	xx	x	x							
1179,4	3535,2	P2								xxx	xxx	xx	(x)						
1179,3	3534,9	P3								xxx	xxx	xxx	(x)						
1186,7	3557,1									x	xx	x							
943,5	3770,0										x	x	(x)						
1156,3	3465,9									xx	x	xx							
1235,3	3702,9									x	x	x							
1238,7	3713,1							xx	xx	xx	x	x							
1192,0	3573,0									xx	x	x	(x)						
1184,0	3549,0	P4								x	x	xx	xxx		(x)				
1186,6	3556,8									xx	xx	x							
1220,3	3657,9												x						

1178,7	3533,1	x	x		
1225,3	3672,9	x	x		
1156,7	3467,1	(x)	(x)		
1218,0	3651,0	(x)	xx	x	
1172,7	3515,1	(x)			
1170,3	3507,9	(x)	xx	(x)	
1191,6	3571,8	(x)	x	(x)	
1183,3	3546,9			(x)	x (x)
1177,3	3528,9		(x)	x	(x)
1221,3	3660,9			(x)	
1151,3	3450,9			(x)	
1143,7	3428,1				xx xx
1164,0	3489,0				x xx

Tabelle B 1: Auflistung der semi-quantitativen Auswertung der reduzierten und alkylierten Peptidfraktion FSN_31.1-43.4..

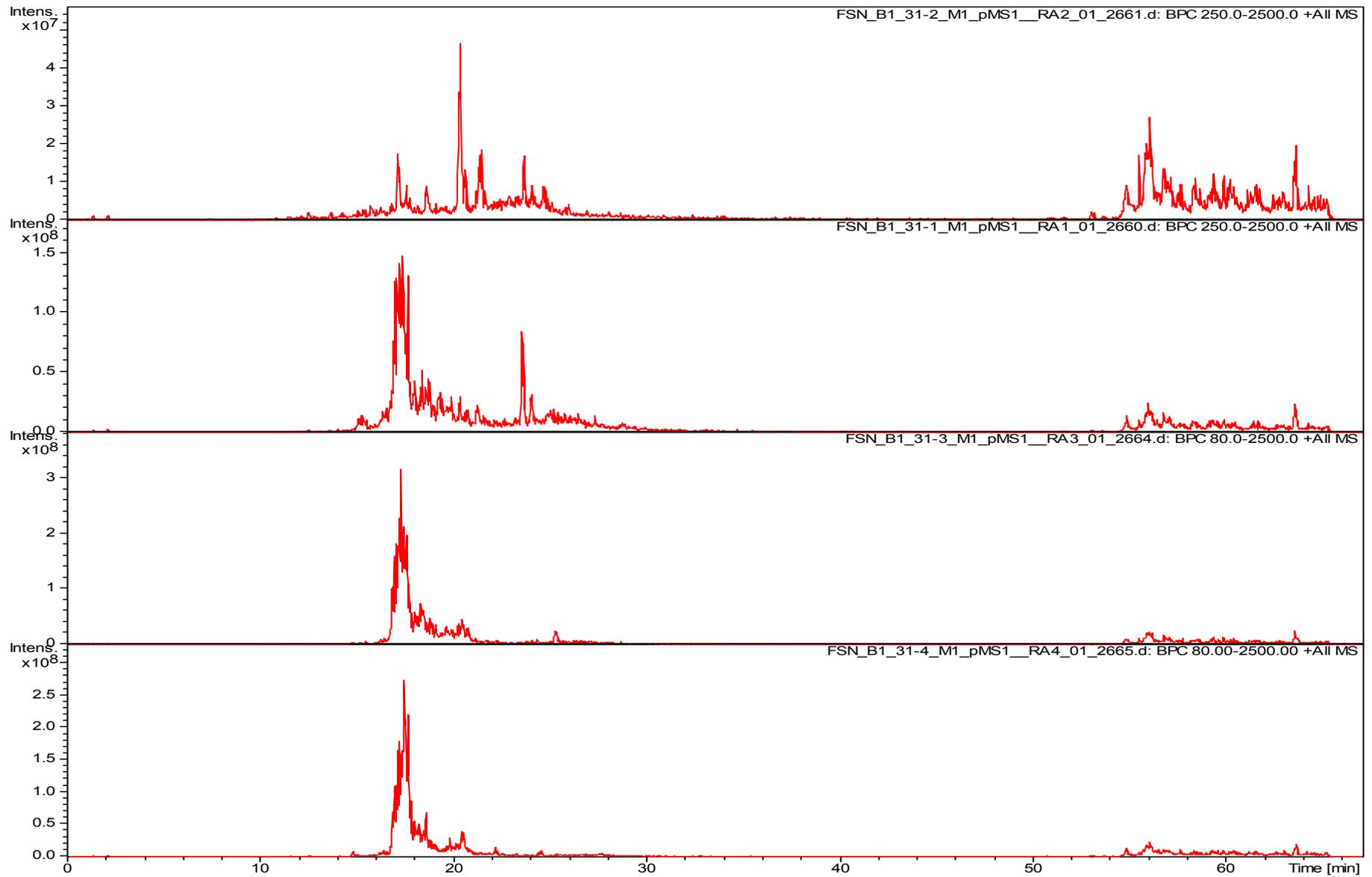


Abbildung B 1: Basispeakchromatogramme der reduzierten und alkylierten Peptidfraktionen FSN_31.1.-31.4..

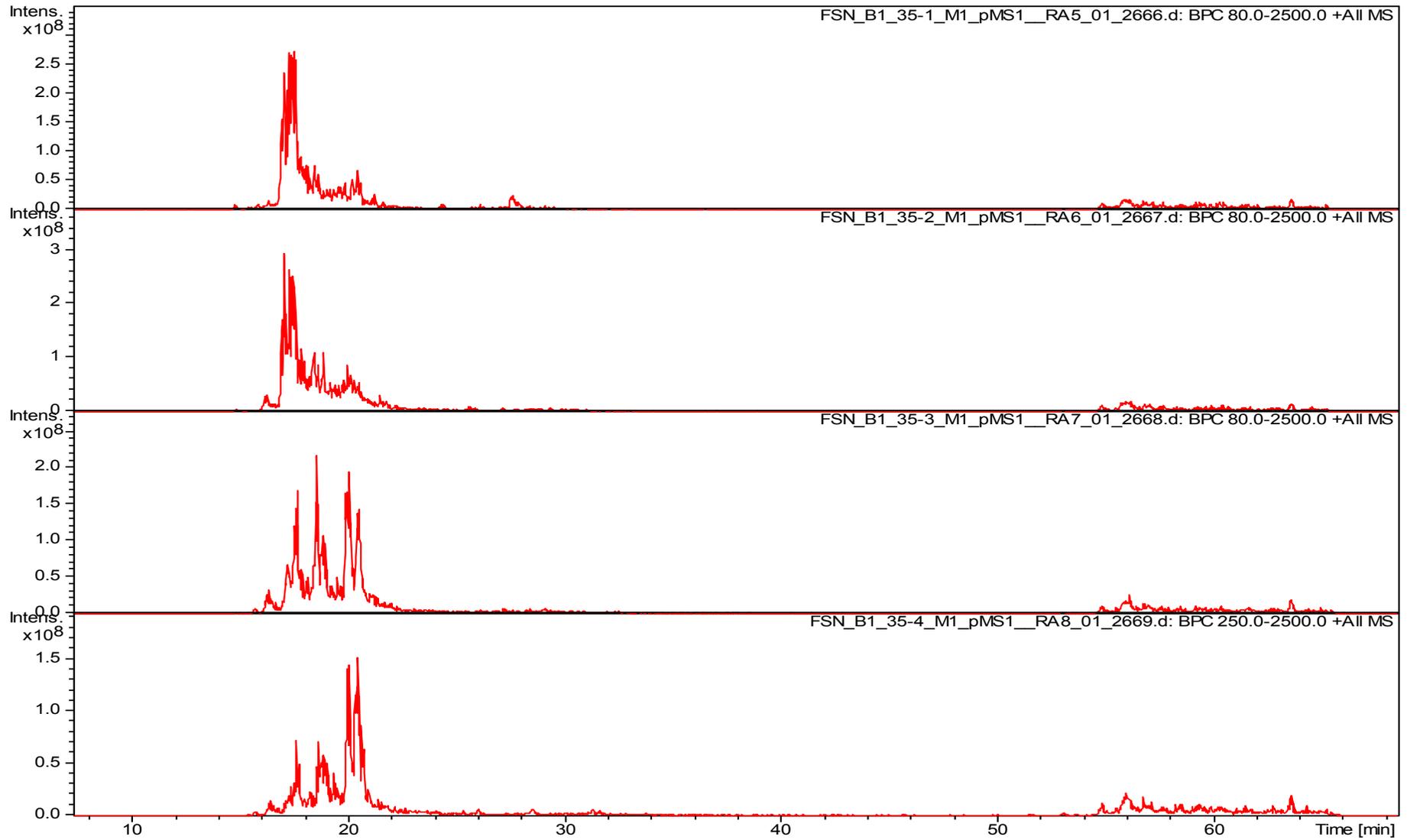


Abbildung B 2: Basispeakchromatogramme der reduzierten und alkylierten Peptidfraktionen FSN_35.1.-35.4..

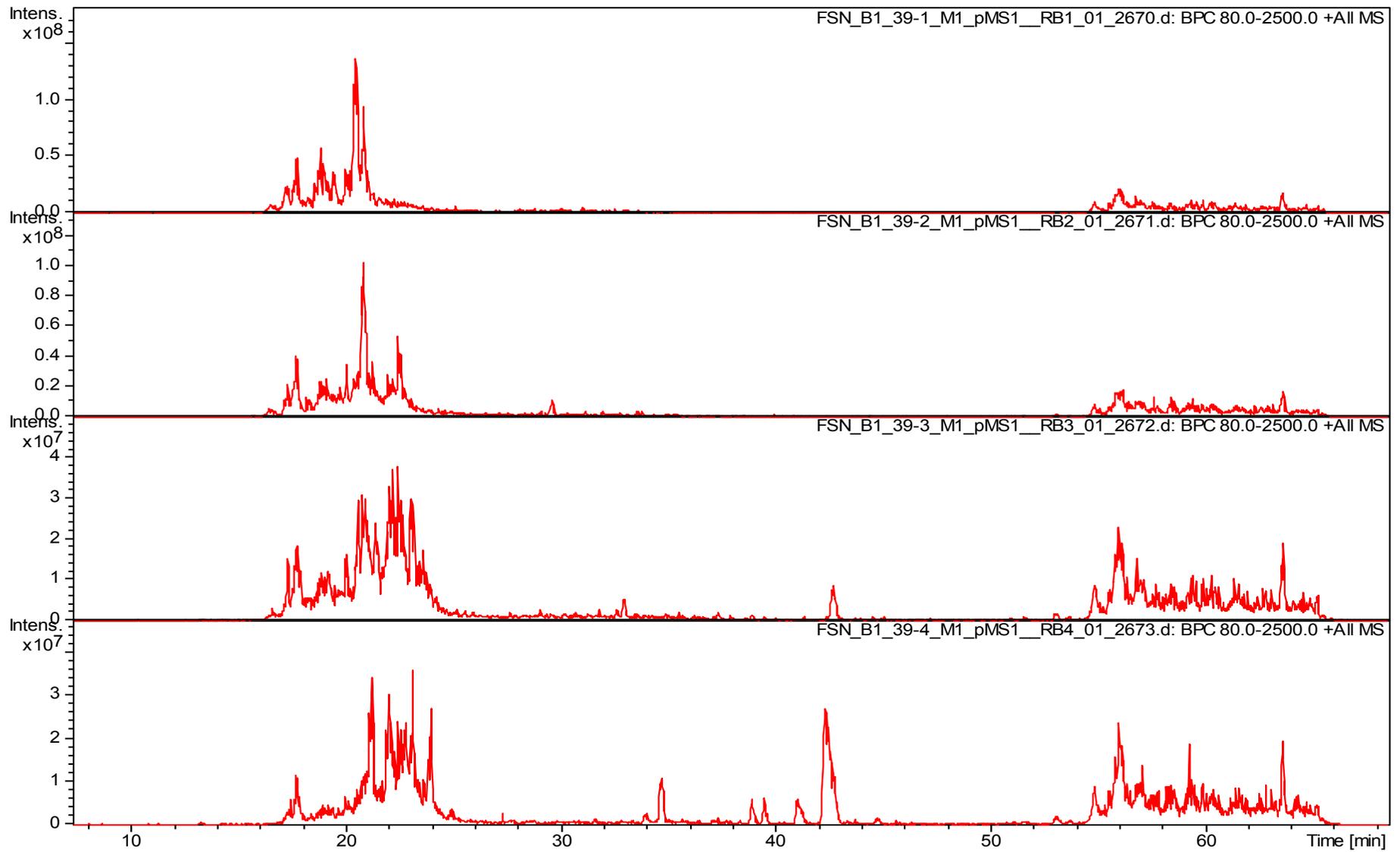


Abbildung B 3: Basispeakchromatogramme der reduzierten und alkylierten Peptidfraktionen FSN_39.1.-39.4..

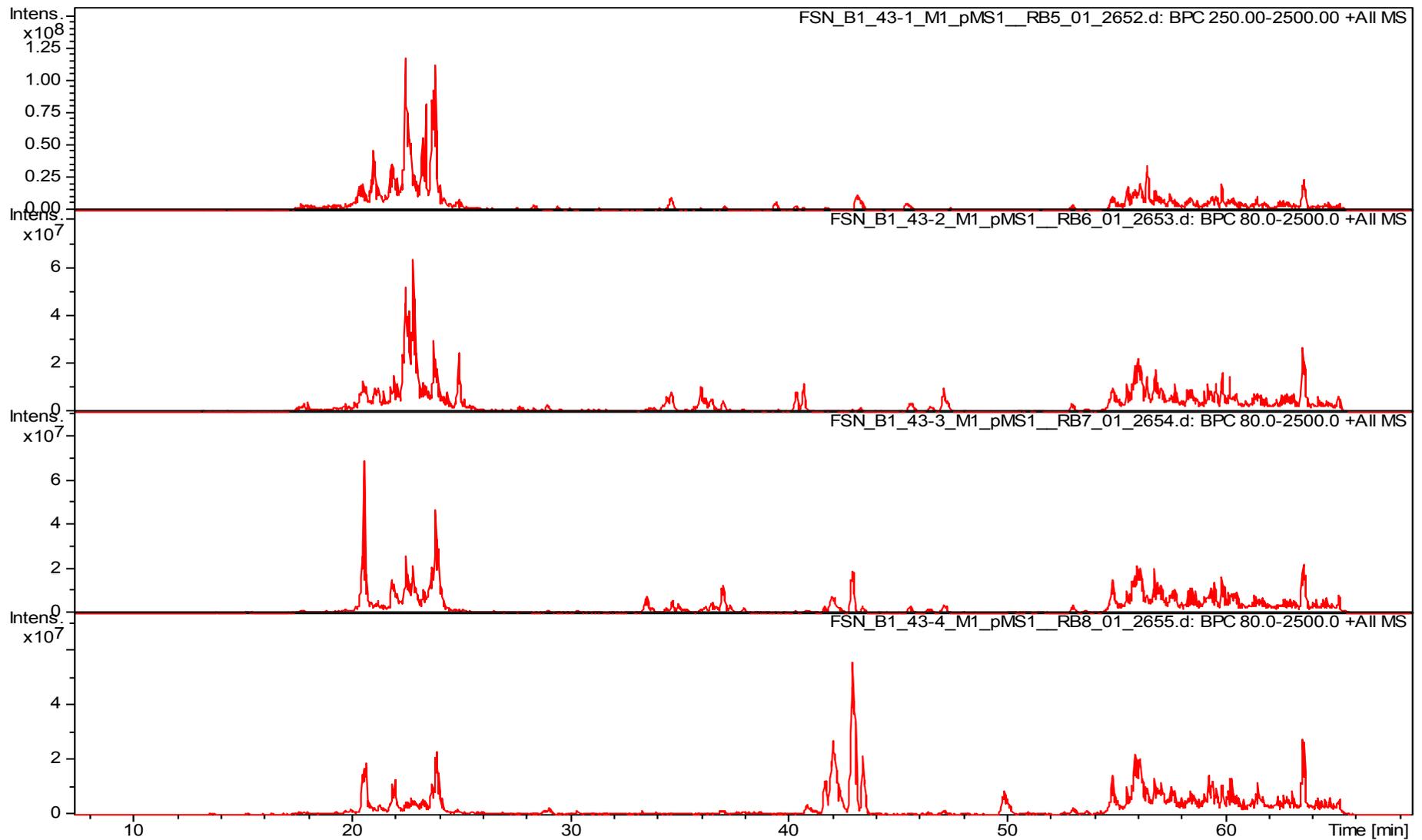


Abbildung B 4: Basispeakchromatogramme der reduzierten und alkylierten Peptidfraktionen FSN_43.1.-43.4..

m/z	MG		850,4 VQC[I/L]GKF	1322,4 CAPWSPCQTGC	1025,4 TCFPSPVGA	540 CY[K/Q]
470,1	469,1					CY[K/Q]
541,2	540,2	71,1				ACY[K/Q]
519,2	518,2		VQC[I/L]			
681,2	680,2	162	VQC[I/L]			
851,4	850,4		VQC[I/L]GKF			
1013,5	1012,5	+Hex	VQC[I/L]GKF			
1026,4	1025,4	+Hex			TCFPSPVG(162)	
1097,4	1096,4	71,0			TCFPSPVGA(162)	
774,8	1547,6				TCFPSPVGACYK	
1323,4	1322,4			CAPWSPCQTGC		
1163,4	1162,4					
1054,4	1053,4	28			TCFPSPVG(162)	
1125,4	1124,4	71,0			TCFPSPVGA(162)	
786,6	2356,8					
840,6	2518,8	162				
951,6	2851,8			CAPWSPCQTGC	TCFPSPVGA	CY[K/Q]
1041,5	1040,5					
1165,9	2329,8	+Hex		CAPWSPCQTGC	TCFPSPVG	
1201,4	2400,8	+Hex/71,0		CAPWSPCQTGC	TCFPSPVGA	
879,4	878,4	28,0	N-Formyl-VQC[I/L]GKF			
1055,0	3162,0		VQC[I/L]GKF	CAPWSPCQTGC	TCFPSPVG	
1078,7	3233,1	71,1	VQC[I/L]GKF	CAPWSPCQTGC	TCFPSPVGA	
1109,0	3324,0	+Hex	VQC[I/L]GKF	CAPWSPCQTGC	TCFPSPVG	
960,7	2879,1	27,3				

Tabelle B 2: Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Pepsinverdaus von FSN_31.4. (FSN_31.4_PD).

m/z	MG		703,3 VQC[I/L]GKF	1469,4 CAPWSPCQTGC	1547,6 TCFPSPVGA	A CY[K/Q]
704,3	703,3		VQC[I/L]GK			
866,4	865,4	+Hex	VQC[I/L]GK			
409,1	816,2		[I/L]VQC[I/L]GK			
661,3	660,3		PyrQCWVGK			
894,4	893,4	+Hex	N-Formyl- VQC[I/L]GK			
732,3	731,3		N-Formyl- VQC[I/L]GK			
774,8	1547,6	+Hex			TCFPSPVGACY[K/Q]	
855,8	1709,6	+Hex			TCFPSPVGACY[K/Q]	
997,8	1993,6	+Hex			QTGCTCFPSPVGACY[K/Q]	
892,8	1783,6	+Hex			GCTCFPSPVGACY[K/Q]*	
854,8	1707,6	+Hex			TCFPSPVGACY[K/Q]**	
640,7	1279,4			FCAPWSPCQQ?		
735,7	1469,4			FCAPWSPCQTGC		
1024,3	1023,3			FCAPWSPC		
992,4	1982,8					
1000,7	2999,1			FCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACY[K/Q]		
1006,6	3016,8					
1054,7	3161,1	+Hex	"1469,4+1709,6"			

Tabelle B 3: Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Trypsinverdaus von FSN_31.4. (FSN_31.4_TD).

m/z	MG		2108,6	788,3	674,3
			GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGG{K/Q}[I/L]GACTGP[I/L]		
470,1	469,1				CY[K/Q]
541,2	540,2	71,1			ACY[K/Q]
560,1	559,1				
473,2	472,2				
547,2	546,2				CTGP[I/L]
519,2	518,2		VQC[I/L]		
618,2	617,2	71,1			ACTCP[I/L]
675,2	674,2	57			GACTGP[I/L]
618,2	617,2				ACTGP[I/L]
675,3	674,3	57			GACTGP[I/L]
629,3	628,3				
789,3	788,3	160		CVGVGGQ[I/L]	
851,4	850,4		VQC[I/L]GKF		
1013,5	1012,5	+Hex	VQC[I/L]GKF		
1026,4	1025,4			TCFPSPVG(162)	
890,4	889,4	101		TCGVGGQ[I/L]	
1050,4	1049,4	160		CTCGVGGQ[I/L]	
1323,4	1322,4		CAPWSPCQTGC		
864,3	863,3			TCFPSPVG(ohne Hexose)	
786,6	2356,8				
840,6	2518,8	+Hex			
1179,4	2356,8				
1214,9	2427,8	+Formyl			
1041,4	1040,4				
795,9	2384,7				
951,3	2850,9				
924,8	1847,6		GlpCWGKGCAPWSPCQSG		
1004,8	2007,6	160	GlpCWGKGCAPWSPCQSGC		
1055,3	2108,6	101	GlpCWGKGCAPWSPCQSGCT		
1134,8	2267,6				
703,9	2108,7				
1179,4	2356,8	89,2			
732,5	2194,5				
777,6	2329,8				
879,4	878,4				
808,3	2421,9				
809,3	2424,9				
801,3	2400,9				
1018,2	2034,4				
1165,9	2329,8		CAPWSPCQTGC	TCFPSPVG(162)	
1201,4	2400,8	71,0	CAPWSPCQTGC	TCFPSPVGA(162)	
1202,4	2402,8				
1213,4	2424,8				
979,3	2934,9				
1003,3	3006,9				
1004,0	3009,0				
960,7	2879,1		GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTCVGVGG{K/Q}[I/L]		
1014,7	3041,1				
1001	3000				
884,8	2651,4				
970	2907				
1179,4	3535,2		"2879,1+ 674,3"		

Tabelle B 4: Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Pepsinverdaus von FSN_35.3. (FSN_35.3_PD).

m/z	MG		660,3 GlpCWGK	2892,9 GCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]
704,3	703,3		VQC[I/L]GK	
866,4	865,4	+Hex	VQC[I/L]GK	
588,2	587,2		GlpC[I/L]GK	
661,3	660,3		GlpCWGK	
894,4	893,4	+Hex	N-Formyl- VQC[I/L]GK	
732,3	731,3		N-Formyl- VQC[I/L]GK	
934,3	933,3		GCAPWSPC	
892,8	1783,6			GCTCFPSPVGACYK*
640,7	1279,4			FCAPWSPC[K/Q]Q??
989,8	1977,6		"1977,6+ 933,3"(2892,9)	QSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP [I/L]
884,8	1767,6			
1000,7	2999,1			FCAPWSPCQTGCTCFPSPVGACYK
965,3	2892,9			GCAPWSPCQSGCTCVGVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]
965,3	2892,9		"2892,9+660,3"	
1006,6	3016,3		größer geworden!	

Tabelle B 5: Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Trypsinverdaus von FSN_35.3. (FSN_35.3._TD).

m/z	MG		2007,6 GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTC	392,1 [I/L]	530,2 GVGGQ[I/L]	675,2 GACTGP[I/L]
393,1	392,1			TC[I/L]		
553,2	552,2			CTC[I/L]		
473,2	472,2					
290,9	289,9					
1022,4	1021,4				VGSGTAGCGG[I/L]S	
530,2	529,2				GVGGQ[I/L]	
675,2	674,2					GACTGP[I/L]
405,1	404,1			[I/L]C[I/L]???		
655,2	1308,4		CAPWSPCQSGC			
662,2	1322,4		CAPWSPCQTGC			
1013,5	1012,5					
1309,4	1308,4		CAPWSPCQSGC			
1323,4	1322,4		CAPWSPCQTGC			
1186,5	1185,4				GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]	
890,4	889,4	101		TCVGVGGQ[I/L]		
593,7	1185,4				GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]	
786,6	2356,8					
840,6	2518,8	+Hex				
1179,4	2356,8					
1214,9	2427,8	28				
1041,4	1040,4					
795,9	2384,7					
951,3	2850,9					
998,4	997,4	+Hex	Formyl- GlpCWGKF			
1004,8	2007,6		GlpCWGKGCAPWSPCQSGC			
924,8	1847,6					
794,9	2381,7					
703,9	2108,7					
1191,9	2381,8		GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTC	[I/L]		

Tabelle B 6: Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Pepsinverdaus von FSN_39.2. (FSN_39.2._PD).

m/z	MG		660,3	933,2	2906,7
			GlpCWGKGCAPWSPCQSGCTC[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]		
704,3	703,3		VQC[I/L]GK		
605,3	604,3	-99			
661,3	660,3		GlpCWGK		
851,2	850,2				
934,2	933,2		GCAPWSPC		
894,4	893,4	+Hex			
732,3	731,3	28			
892,8	1783,6		GCTCFPSPVGACYK*		
640,7	1279,4		FCAPWSPC[K/Q]Q??		
920,7	1839,4				
996,7	1991,4		QSGCTC[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]		
1024,2	1023,2				
1045,2	1044,2				
1068,1	1067,1				
1000,5	2998,5		FCAPWSPCQTGCTC FPSPVGACYK		
969,9	2906,7		GCAPWSPCQSGCTC[I/L]GVGGQ[I/L]GACTGP[I/L]		
953,9	2858,7				
949,2	2844,6		FCAPWSPCQSG C[I/L]C [I/L]GV SGTGACGG[I/L]S		

Tabelle B 7: Tabelle der erhaltenen Spaltpeptide des Trypsinverdaus von FSN_39.2. (FSN_39.2_TD).

FSN_39.4.-43.4_PD

39-4	MG	43-1	MG	43-2	MG	43-3	MG	43-4	MG							
1		1	720,3	719,3												
1	823,2	822,2	1	823,2	822,2	1	823,2	822,2	1	823,2	822,2	1	823,2	822,2	P7	STGACAG[I/L]S
1	448,2	447,2	1	448,2	447,2	1	448,2	447,2	1	448,2	447,2	1	448,2	447,2	P7	[I/L] CVG
1	993,3	992,3	1	993,3	992,3	1	993,3	992,3	1	993,3	992,3	1	993,3	992,3	P7	VASTGACAG[I/L]S
1	1022,3	1021,3	1	1022,3	1021,3	1	1022,3	1021,3							P5	VGSGTAGCGG [I/L] S
			1	528,1	527,1	1	528,2	527,2							P8/9	CTTF
	599,2	598,2	1	599,2	598,2	1	599,2	598,2	1	599,2	598,2				P8/9	ACTTF
1	935,2	934,2	1	935,2	934,2	1	935,2	934,2	1	935,2	934,2	1	935,2	934,2	P6	VGSGTAGCGG [I/L]
1	992,3	991,3	1	992,3	991,3	1	992,3	991,3								T C[I/L]PS (+162)PVG
1	863,4	862,4				1	863,3	862,3	1	863,3	862,3	1	863,3	862,3		
1	1149,3	1148,3				1	1149,3	1148,3	1	1149,3	1148,3	1	1149,3	1148,3	P5	VGVASTGACAG[I/L]S
						1	839,2	838,2	1	839,2	838,2					VGAGTCAGF
1	618,3	617,3	1	618,3	617,3	1	618,3	617,3	1	618,3	617,3	1	618,3	617,3		????VGACYK*
1	405,2	404,2	1	405,2	404,2	1			1	405,2	404,2	1	405,2	404,2	P5/6	m[I/L]C[I/L]
1	1026,2	1025,2	1	1026,2	1025,2	1										T C FPS(+162)PVG
1	1149,2	1148,2				1										
1	1309,2	1308,2	1	1309,2	1308,2	2	1309,2	1308,2	1	1309,2	1308,2	1	1309,2	1308,2	P5/6/8	CAPWSPCQSGC
1	641,2	640,2	1	641,2	640,2	2	641,2	640,2								[I/L]CTTF
									1	854,2	853,2	1	854,2	853,2		
1	1422,3	1421,3	1	1422,3	1421,3	2	1422,3	1421,3	1	1422,3	1421,3	1	1422,3	1421,3	P7	[I/L]C VGVASTGACAG[I/L]S
2	791,7	1581,4				2	791,7	1581,4	2	791,7	1581,4	2	791,7	1581,4	P5/6	CAPWSPCQSG C[I/L]C [I/L]
			2	1141,7	2281,4	1	1141,7	2281,4							P8	CAPWSPCQSG CTC [I/L]PS(+162)PVG
			2	1177,2	2352,4	1	1177,2	2352,4								
						1	1146,7	2291,4							P9	CAPWSPCQPG CTC [I/L]PS(+162)PVG
									2	906,7	1811,4					

	39-4	MG		43-1	MG		43-2	MG		43-3	MG		43-4	MG		
1	707,2	706,2	1	707,2	706,2	1	707,2	706,2	1	707,2	706,2	1	707,2	706,2		GlpCWGK
1	869,1	868,1	1	869,1	868,1	1	869,1	868,1								GlpCWGK
1	851,2	850,2	1	851,2	850,2	1	851,2	850,2	1	851,2	850,2	1	851,2	850,2		GlpCWGK
1	661,2	660,2	1	661,2	660,2	1	661,2	660,2	1	661,2	660,2	1	661,2	660,2		GlpCWGK
1	689,2	688,2	1	689,2	688,2	1	689,2	688,2	1	689,2	688,2	1	689,2	688,2		GlpCWGK
2	892,7	1783,4	2	892,7	1783,4											(162) GCTCFPSPVGACYK*
2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4	2	711,7	1421,4	P7	[I/L]C V GVASTGACAG[I/L]S
2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4	2	927,7	1853,4	P7	QGA C[I/L]C V GVASTGACAG[I/L]S
2	640,7	1279,4	2	640,7	1279,4											FCAPWSPC[K/Q]Q?
2	920,8	1839,6													P5	QSG C[I/L]C [I/L]GV SGTGACGG[I/L]S
2	1002,7	2003,4	2	1002,7	2003,4	2	1002,7	2003,4							P8	QSG CTC [I/L] PS(+162)PVGACTTF
1	970,2	969,2														
			2	728,7	1455,4	2	728,7	1455,4								
			2	877,2	1752,4	2	877,2	1752,4	2	877,2	1752,4	2	877,2	1752,4		
			2	931,2	1860,4	2	931,2	1860,4								
1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2	1	1024,2	1023,2		FCAPWSPC
1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2	1	1046,2	1045,2		
1	680,1	679,1	1	680,1	679,1	1	680,1	679,1	1	680,1	679,1	1	680,1	679,1		
2	865,2	1728,4	2	865,2	1728,4	2	865,2	1728,4	2	865,2	1728,4	2	865,2	1728,4		
3	1000,5	2998,5	3	1000,5	2998,5											FCAPWSPC[K/Q]TGCTCFPSPVGACYK
						3	959,2	2874,6	3	959,2	2874,6	3	959,2	2874,6		
3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7	3	953,9	2858,7	P7	CAPWSPCQSG C[I/L]C VGV ASTGACAG[I/L]S
3			3	1003,9	3008,7	3	1003,9	3008,7	3	1003,9	3008,7				P8	FCAPWSPCQSG CTC [I/L] PS(+162)PVGACTTF
3	949,2	2844,6	3	949,2	2844,6	3	949,2	2844,6							P5	FCAPWSPCQSG C[I/L]C [I/L]GV SGTGACGG[I/L]S
			3	970,5	2908,5	3	970,5	2908,5								
			3	1007,3	3018,9	3	1007,3	3018,9	3	1007,3	3018,9				P8	FCAPWSPCQPG CTC [I/L] PS(+162)PVGACTTF

