Methodenentwicklung zur Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen mittels Cross-Linking und Massenspektrometrie

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Verena Tinnefeld

aus

Ludwigshafen am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Oktober 2017

1. Gutachter/-in: Prof. Dr. Albert Sickmann
2. Gutachter/-in: Prof. Dr. Oliver Kayser

Dortmund 2017

1. Prüfer: Prof. Dr. Jörg Tiller

A Inhaltsverzeichnis

A Inhaltsverzeichnis I

B Publikationen, Vorträge und Poster IV

C Zusammenfassung V

D Summary VI

1 Einleitung 1

1.1 Die Erforschung der Proteine - Proteomics 1

1.2 Massenspektrometrie 3

1.2.1 Ionisierung 3

1.2.2 Massenanalysatoren 4

1.2.3 Detektoren 6

1.2.4 Hybrid-Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific 6

1.2.5 Peptidfragmentierung 8

1.2.6 Identifizierung von Peptiden durch MS/MS-Spektren 9

1.3 Flüssigchromatographie 11

1.3.1 Grundlagen der Flüssigchromatographie 11

1.3.2 Umkehrphasen-Flüssigchromatographie von Peptiden 12

1.3.3 Ionenaustauschchromatographie 12

1.3.4 ChaFRADIC 13

1.4 Strukturuntersuchung von Proteinen und Proteinkomplexen 16

1.5 Protein Cross-Linking 21

1.5.1 Grundlagen des Protein Cross-Linking 21

1.5.2 Chemisches und Photochemisches Cross-Linking 22

1.5.3 Identifizierung von Cross-Link Peptiden 25

1.5.1 Anreicherung von Cross-Link Peptiden 29

2 Ziel der Arbeit 30

3 Methoden 31

3.1 Protein-Cross-Linking 31

3.1.1 Cross-Linking Reaktion 31

3.1.2 Kontrolle der Cross-Linking Reaktion mit Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 33

3.1.3 Enzymatischer Verdau 34

3.1.4 Kontrolle des enzymatischen Verdaus mit monolithischer Umkehrphasen-Säule 35

3.1.5 Entsalzen der Peptide mittels Festphasenextraktion 36

3.2 Isolierung von Proteinen aus HeLa-Zellen 37

3.2.1 Lyse von HeLa-Zellen 37

3.2.2 Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels BCA-Assay 37

3.2.3 Ethanol-Fällung zur Entfernung von Detergenzien aus Proteinlösungen 38

3.3 Derivatisierung von freien Aminen für ChaFRADIC-Anreicherung 38

3.3.1 Phenylacetyl-N-hydroxysuccinimidester 38

3.3.2 Boc-Glycin-N-Hydroxysuccinimidester ... 39
3.4 Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden ... 39
3.5 Kationenaustauschchromatographie (SCX) ... 40
3.6 Größenausschluss-Chromatographie ... 41
3.7 Umkehrphasen-Flüssigchromatographie ... 41
3.8 MS-Methoden ... 42
3.9 Datenauswertung ... 43
3.9.1 Lineare Peptide ... 43
3.9.2 Cross-Link Peptide ... 43

4 Ergebnisse und Diskussion ... 45
4.1 Bovines Serum Albumin als Modellprotein ... 45
4.1.1 Bestimmung des optimalen Reagenz-Protein-Verhältnisses ... 45
4.1.2 Vergleich mit anderen Modellproteinen: Hämoglobin ... 46
4.2 Optimierung der Analyse von Cross-Link Peptiden mittels LC-MS/MS ... 49
4.2.1 Datenauswertung mi pLink, StavroX und xQuest ... 49
4.2.2 Vergleich von Cross-Linkern mit verschiedenen Längen ... 62
4.2.3 Auswertung der Cross-Linking Effizienz in BSA ... 64
4.3 Photo-reaktives Cross-Linking ... 66
4.3.1 UV-Aktivierung mittels gepulstem Laser ... 66
4.3.2 Untersuchung der Aktivierungszeit eines Diazirin-Cross-Linkers ... 70
4.4 Methodenentwicklung: ChaFRADIC zur Anreicherung von Cross-Link Peptiden ... 74
4.4.1 Übertragung von ChaFRADIC auf Cross-Link Peptide ... 74
4.4.2 Alternative Label-Methoden für ChaFRADIC ... 75
4.4.3 ChaFRADIC mit GlyBoc-Labeling (Gly-ChaFRADIC) ... 85
4.4.4 Alternative Enzyme für Cross-Link Analyse ... 89
4.4.5 ChaFRADIC mit zweistufigem Verdau (XL-ChaFRADIC) ... 92
4.4.6 Kombination von Größenausschluss-Chromatographie mit ChaFRADIC ... 101
4.5 Strukturuntersuchung weiterer Proteine und Proteinkomplexe mittels Massenspektrometrie ... 107
4.5.1 BBSome-Komplex ... 107
4.5.1 IbpA-Cdc42 ... 111
4.6 Peptid-Standard für Cross-Link Peptide ... 114
4.6.1 Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden ... 114
4.6.2 Untersuchung der optimalen Fragmentierung für Cross-Link Peptide ... 117

5 Fazit ... 120

6 Literaturverzeichnis ... 125

7 Abkürzungsverzeichnis ... 132

8 Anhang ... 134
8.1 Chemikalien ... 134
8.2 Enzyme ... 135
8.3 Weitere Verbrauchsmaterialien ... 136
8.4 Geräte ... 137

8.5 Computerprogramme 137
8.6 Zu Kapitel 4.2.1 Datenauswertung mi pLink, StavroX und xQuest 138
8.7 Zu Kapitel 4.3.2 Untersuchung der Aktivierungszeit eines Diazirin-Cross-Linkers 139
8.8 Zu Kapitel 4.4.2 Alternative Label-Methoden für ChaFRADIC 141
8.9 Zu Kapitel 4.4.3 ChaFRADIC mit GlyBoc-Labeling 143
8.10 Zu Kapitel 4.4.4 Alternative Enzyme für Cross-Link Analyse 148
8.11 Zu Kapitel 4.4.5 ChaFRADIC mit zweistufigem Verdau (XL-ChaFRADIC) 153
8.12 Zu Kapitel 4.4.6 Kombination von Größenausschluss-Chromatographie mit ChaFRADIC 159
8.13 Zu Kapitel 4.5.1 BBSome-Komplex 164
8.14 Zu Kapitel 4.6.1 Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden 168
8.15 Zu Kapitel 4.6.2 Untersuchung der optimalen Fragmentierung für Cross-Link Peptide 171
8.16 FASTA-Dateien 172
8.16.1 Bovines Serum Albumin 172
8.16.2 IbpA und Cdc42 172
8.16.3 BBSome-Komplex 172
8.16.4 Synthetische Cross-Link Peptide 174
8.17 Lebenslauf 177
8.18 Danksagung 178
8.19 Erklärung 179

B Publikationen, Vorträge und Poster

Publikationen

- Tinnefeld, V., Sickmann, A., Ahrends, R., "Catch me if you can: challenges and applications of cross-linking approaches", *European Journal of Mass Spectrometry* **20**, 99-116 (2014)
- Tinnefeld, V., Venne, A.S., Sickmann, A., Zahedi, R.P., "Enrichment of cross-linked peptides using charge based fractional diagonal chromatography (ChaFRADIC)", *Journal of Proteome Research* 16 (2), 459-469 (2017)

Poster

- Verena Tinnefeld, Steven Verhelst, Albert Sickmann, René P. Zahedi, Enrichment of Cross-Linked Peptides using charge-based fractional diagonal chromatography, *Proteomic Forum 2015*, Berlin
- Verena Tinnefeld, Albert Sickmann, René P. Zahedi, Enrichment of Cross-Links from complex samples by charge-based fractional diagonal chromatography, *HUPO World Congress 2015*, Vancouver
- Verena Tinnefeld, Albert Sickmann, René P. Zahedi, Enrichment of Cross-Linked Peptides from complex samples by charge-based fractional diagonal chromatography, *Symposium on Structural Proteomics 2015*, Halle/Saale

Vorträge

- Verena Tinnefeld, Enrichment of Cross-Links from complex samples by charge-based fractional diagonal chromatography, *HUPO World Congress 2015*, Vancouver
- Verena Tinnefeld, Enrichment of Cross-Linked Peptides from complex samples by charge-based fractional diagonal chromatography, *Symposium on Structural Proteomics 2015*, Halle/Saale

C Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Analyse von Protein Cross-Links systematisch untersucht. Dabei wurde neben der Messung mittels LC-MS/MS auch die Auswertung mit speziellen Suchalgorithmen näher betrachtet. Die drei häufigsten Suchprogramme pLink, xQuest und StavroX wurden dabei miteinander verglichen. Mit diesen Ergebnissen wurden auch Kriterien für die Annahme oder Ablehnung von identifizierten Cross-Links festgelegt.

Neben klassischem, chemischem Cross-Linking wurde auch versucht, photochemisches Cross-Linking zu optimieren. Zunächst wurde die Aktivierung der photoreaktiven Komponente mit einem gepulsten Laser getestet. Aufgrund des mangelnden Erfolgs wurde daraufhin die notwendige Aktivierungszeit des Reagenzes mit einer UV-Lampe bestimmt, um den Misserfolg des ersten Versuchs zu erklären.

Darüber hinaus wurde die Anreicherung von Cross-Link Peptiden optimiert, um deren Identifizierung zu erleichtern. Anhand des bestehenden ChaFRADIC-Protokolls mit Kationenaustauschchromatographie wurden drei neue Anreicherungs-Protokolle für Cross-Link Peptide entwickelt. Da der ursprüngliche ChaFRADIC-Ansatz nicht auf Cross-Link Peptide übertragen werden konnte, wurden neue Modifikationen, Proteasen und Chromatographie-Techniken getestet und erfolgreich eingesetzt. Alle drei entwickelten Anreicherungsmethoden ermöglichten die Identifikation zusätzlicher Cross-Links in BSA mit unterschiedlicher Effizienz.

Daneben wurden in Kooperation mit weiteren Forschungsgruppen weitere Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert, um neue strukturelle Informationen zu erhalten. Erstmalig wurde der BBSome-Komplex aus sechs Proteinen mit Cross-Linking untersucht, um die Interaktion zwischen den einzelnen Protein-Untereinheiten zu bestimmen. Zusätzlich wurde die Interaktion zweier bakterieller Peptide (Cdc42 mit IbpA) über einen neuartigen ATP-Cross-Linker massenspektrometrisch bestimmt.

Abschließend wurde in dieser Arbeit ein Peptid-Standard für Cross-Link Peptide entwickelt. Über ein neuartiges Reaktionsschema konnte eine große Anzahl von Cross-Link Peptide mit beliebiger Sequenz hergestellt werden. Eine Mischung aus 20 Standard-Peptiden wurde anschließend verwendet, um verschiedenen Fragmentierungsmethoden für Cross-Link Peptide miteinander zu vergleichen und die optimale Messmethode zu bestimmen.

D Summary

In this work, the analysis of protein cross-links was systematically investigated. Besides the measurement by LC-MS/MS, the evaluation with special search algorithms was also considered. The three most common search programs pLink, xQuest and StravroX were compared. With these results, criteria for accepting or rejecting identified cross-links were also made.

Besides classical chemical cross-linking, attempts have also been made to optimize photochemical cross-linking. First, the activation of the photoreactive component with a pulsed laser was tested. Due to the lack of success, the necessary activation time of the reagent was then determined with a UV lamp in order to explain the failure of the first experiment.

Additionally, enrichment of cross-link peptides has been optimized to facilitate their identification. Based on the existing ChaFRADIC protocol with cation exchange chromatography, three new enrichment protocols have been developed for cross-link peptides. Since the original ChaFRADIC approach could not be applied to cross-link peptides, new modifications, proteases and chromatography techniques were tested and applied successfully. All developed enrichment techniques enabled the identification of additional cross-links in BSA with varying efficiency.

In addition, further proteins were analyzed by mass spectrometry in cooperation with other research groups to obtain new structural information. For the first time, the BBSome complex with six proteins was investigated with cross-linking to determine the interaction of the individual protein subunits. Additionally, the interaction of two bacterial peptides (Cdc42 with IbpA) was determined by mass spectrometry via a novel ATP cross-linker.

Finally, a peptide standard for cross-link peptides was developed in this work. Using a novel reaction scheme, a large number of cross-link peptides with any sequence could be produced. A mixture of 20 standard peptides was then used to compare different fragmentation methods for cross-link peptides to determine the optimal measurement method.

1 Einleitung

1.1 Die Erforschung der Proteine - Proteomics

Die Proteomforschung umfasst biochemische Untersuchungen von Proteinen hinsichtlich ihrer Eigenschaften, Funktionen und Struktur, um einen Überblick über zelluläre Prozesse auf der Protein-Ebene im großen Umfang (alle Proteine einer Zelle/Gewebe) zu erhalten[1]. Schon 1839 verwendete Geradus Johannes Mulder[2] den Begriff des „Proteins“ erstmals, als er in einer Veröffentlichung die chemische Zusammensetzung von verschiedenen Geweben beschrieb. In Anlehnung an den Begriff „Genom“, der 1920 von Hans Winkler[3] eingeführt wurde, benutzte Marc R. Wilkins auf einem Kongress in Italien jedoch erst 1995 zum ersten Mal den Begriff „Proteom“[4]. Während das Genom die Gesamtheit der genetischen Information einer Zelle beschreibt, ist das Proteom die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, Gewebe oder einer Zelle unter genau definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt. Diese zusätzliche Definition über Bedingungen und Zeitpunkt ist im Gegensatz zum relativ statischen Genom notwendig, da das Proteom deutlich mehr Veränderungen unterliegen kann. Dadurch ist die Erforschung des Proteoms, welche *Proteomics* genannt wird, komplex und sehr anspruchsvoll.

Das Genom kann durch Mutationen, welche keine, negative oder positive Folgen haben können, verändert werden – für Proteine sind allerdings allein 69 posttranslationale Modifikationen bekannt[5], die nur einen Teil von möglichen Modifikationen darstellen (Abbildung 1-1). Proteine gelten daher als die vielseitigsten Makromoleküle in lebenden Systemen[6].

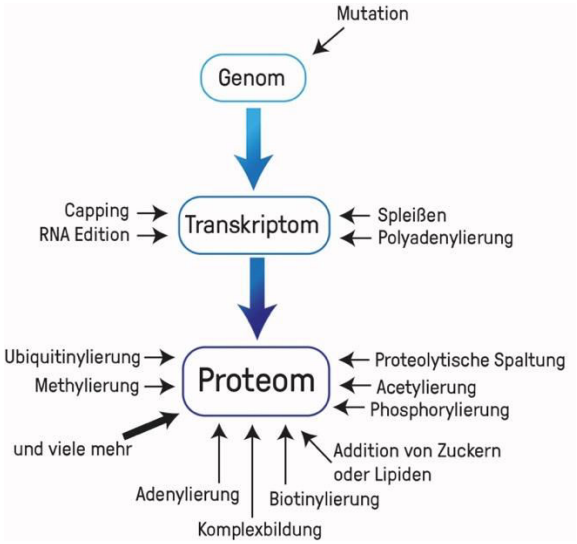

Abbildung 1-1: Verschiedene Einflüsse auf Genom, Transkriptom und Proteom (Abbildung erstellt mit Adobe Illustrator, Verena Tinnefeld).

Proteine dienen in der Zelle unzähligen Aufgaben: Zum Beispiel wirken sie als Katalysatoren (Enzyme), transportieren andere Moleküle (z. B. Sauerstoff an Hämoglobin), verleihen der Zelle Stabilität (Cytoskelett) und erlauben gleichzeitig die Erzeugung von Bewegungen (Muskelproteine). Auch basiert das Immunsystem genauso auf Proteinen (Antikörper) wie die Reizweiterleitung über Nerven (Rezeptoren, Ionenkanäle). Da Proteine so unterschiedliche Aufgaben haben, ist ihr quantitatives Vorkommen in der Zelle ebenfalls sehr variabel. So konnten in einer menschlichen Zelllinie (HeLa) über 10.000 Proteine identifiziert werden, wobei aber nur 600 Proteine rund 75% der Zellmasse ausmachen. Es gibt auch Proteine, die nur mit sehr wenigen Kopien in der Zelle vorliegen[7]. Diese große Varianz in der Abundanz macht die Analyse von Proteinen anspruchsvoller als eine Genomanalyse: Denn verglichen zum Proteom hat das Genom nur wenig Abundanz-Unterschiede – beinahe jede Zelle enthält alle Gene und die gleiche Menge des Erbguts.

Die Grundbausteine der Proteine sind Aminosäuren. Im menschlichen Körper werden 20 verschiedene Aminosäuren, die sogenannten proteinogenen Aminosäuren, zur Proteinbiosynthese genutzt. Aus den linear verketteten Aminosäuren (Primärstruktur) entstehen die dreidimensionalen Proteine durch nicht-kovalente (Wasserstoff-Brückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte) und kovalente Bindungen (z. B. Disulfid-Brücken), die dem Protein Form und Stabilität verleihen (Sekundär- und Tertiärstruktur, siehe Abbildung 1-2). Außerdem können durch den Zusammenschluss von einzelnen Proteinen große Komplexe entstehen (Quartärstruktur).

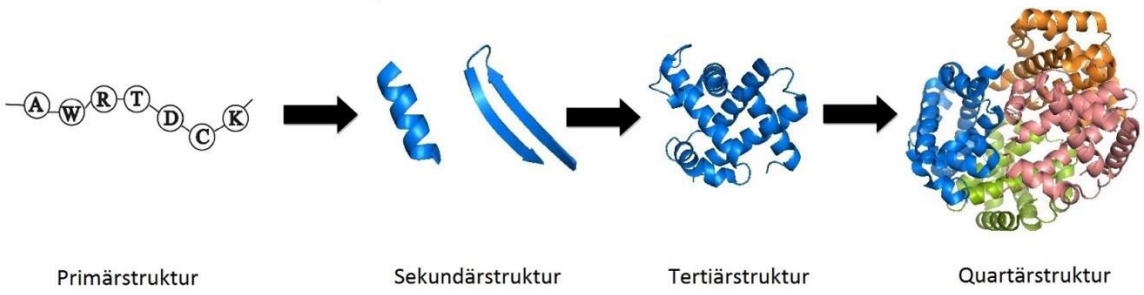

Abbildung 1-2: Aus Aminosäureketten (Primärstruktur) entstehen Strukturelemente wie Helices oder Faltblätter (Sekundärstruktur), die das Protein formen (Tertiärstruktur). Mehrere Proteine zusammen können einen Komplex bilden (Quartärstruktur). (Abbildung erstellt mit Adobe Illustrator und PyMol[89], Verena Tinnefeld).

Eine der wichtigsten Methoden der Proteinanalytik stellt heute die Massenspektrometrie in Kombination mit chromatographischen Trennverfahren dar.

1.2 Massenspektrometrie

In der modernen Proteinanalytik stellt die Massenspektrometrie das wichtigste Analyseverfahren dar. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde mit der Entwicklung des ersten Massenspektrometers der Grundstein der modernen Massenspektrometrie gelegt[8,9].

Im Massenspektrometer (MS) werden Molekülionen über ihr Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) charakterisiert. Dazu müssen die Analyten als gasförmige Ionen vorliegen, die anschließend in einem elektrischen oder magnetischen Feld aufgetrennt werden[10].

Jedes Massenspektrometer hat den gleichen Aufbau aus Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor, wobei bei manchen Gerätetypen Massenanalysator und Detektor in einem Bauteil vereint sind (z.B. Orbitrap, FT-ICR).

Um die störungsfreie Weiterleitung der Ionen durch das gesamte System sicherzustellen, wird im Massenanalysator und Detektor im Hochvakuum gearbeitet. Je nach Art der Ionenquelle findet die Ionisierung bei Atmosphärendruck oder niedrigem Vakuum statt[10].

1.2.1 Ionisierung

Für die Proteinanalytik sind die beiden milden Ionisierungsmethoden Elektrospray-Ionisation (ESI) und Matrix-unterstütze-Laserdesorption-Ionisation (MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionisation*) geeignet, da hierbei weniger Energie als mit anderen Ionisierungsmethoden auf die Analytmoleküle übertragen wird. Die Entwicklung dieser beiden Methoden Mitte der 1980er-Jahre durch John B. Fenn[11] und Franz Hillenkamp/Micheal Karas[12] stellte den Durchbruch der Proteinanalytik mittels Massenspektrometrie dar. Im Folgenden wird nur auf die Ionisierung mittels Elektrospray eingegangen, da ausschließlich diese Methode in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Abbildung 1-3).

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisierung besteht darin, dass Ionen aus geladenen Tropfen heraus schrittweise desolvatisiert werden. Die Ionen-enthaltende Flüssigkeit tritt am Ende einer leitenden Kapillare aus. Durch die angelegte Spannung bleiben die negativen Ionen zurück und die positiven Ionen werden in Richtung Kathode aus der Kapillare gezogen – es entsteht der sogenannte Taylor-Konus. Aus dem Taylor-Konus lösen sich geladene Tröpfchen heraus, die durch Verdampfen der Flüssigkeit kleiner werden. Ist in den Tröpfchen zu viel Flüssigkeit verdampft, wird das Rayleigh-Limit erreicht: die Ladungsdichte ist zu hoch geworden und durch die starke Abstoßung der positiven Ladungen zerfallen die Tröpfchen (Coulomb-Explosion)[4]. Dieser Prozess setzt sich beim weiteren Verdampfen des Lösungsmittels fort.

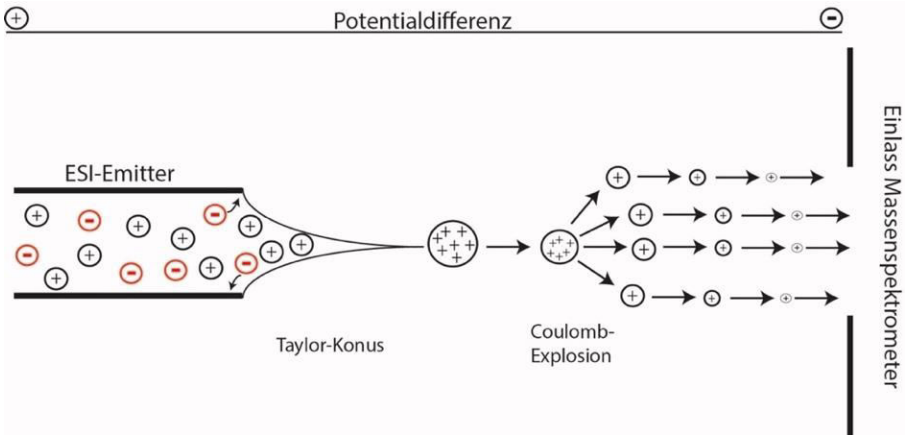

Abbildung 1-3: Schematischer Ablauf der Ionenbildung in einer Elektrospray-Ionenquelle im positiven Modus. Positive, gelöste Ionen treten am ESI-Emitter aus (Spray) und werden in Richtung Kathode gezogen. Aus diesem sogenannten Taylor-Konus lösen sich Tropfen, die durch Verdampfen des Lösungsmittels immer kleiner werden. Aufgrund der zunehmenden Abstoßung der positiven Ladungen in den Tropfen, zerfallen diese in der Coulomb-Explosion in noch kleinere Tropfen. Daraus entstehen anschließend die freien, gasförmigen Ionen. (Abbildung erstellt mit Adobe Illustrator nach Otto[10], Verena Tinnefeld).

Aus diesen verkleinerten Tröpfchen entstehen dann die freien Ionen. Zu diesem Prozess gibt es derzeit zwei Modelle, da der genaue Mechanismus unbekannt ist. Nach dem Charged Residue Model von Dole[13] (CRM) entstehen durch mehrfache Coulomb-Explosionen Tröpfchen, die nur ein Analyt-Ion enthalten. Durch das finale Verdampfen des Lösungsmittels aufgrund der Kollision mit Stickstoff-Molekülen aus dem Gasstrom an der Eintrittsstelle zum Massenspektrometer entsteht dann das freie Ion. Das zweite Modell von Iribane und Thomson heißt Ionenemissionsmodell[14] (Ion Evaporation Model, IEM). Dieses Modell geht davon aus, dass freie Ionen aus Tropfen, die noch viele Ionen enthalten, freigesetzt werden. Die Tropfenverkleinerung durch Verdampfung und die Emission von freien Ionen passieren kontinuierlich, wodurch die Ionenemission aufrechterhalten werden kann und nicht durch Ladungsverarmung abbricht.

1.2.2 Massenanalysatoren

Der Massenanalysator ist das Trennsystem im Massenspektrometer. Die ionisierten Analyten werden hier abhängig von ihren m/z-Verhältnissen aufgetrennt und anschließend im Detektor erfasst[10]. Die ersten Massenspektrometer (1936, Dempster, Bainbridge, Mattauch[9]) waren doppel-fokussierende Magnetsektorfeld-Geräte, bei denen die Ionen mittels Magnetfeldern und elektrostatischen Feldern getrennt wurden. Diese sehr großen und schweren Geräte können hohe Auflösungen erzielen, allerdings wurden sie mittlerweile durch andere Massenanalysatoren abgelöst.

Anfang der 50er Jahre stellte die Gruppe um den Physiker Wolfgang Paul den Quadrupol-Massenfilter vor[15]. Beim Quadrupol liegt auf vier parallelen, stabförmigen Elektroden ein

kombiniertes Wechsel- und Gleichspannungsfeld an, wobei gegenüberliegende Stäbe die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung haben.

Abhängig von der angelegten Geich- und Wechselspannung können nur Ionen mit bestimmten m/z-Verhältnissen den Quadrupol auf einer stabilen Flugbahn (oszillierend) passieren und den Detektor erreichen – Ionen mit anderen m/z-Verhältnissen kollidieren aufgrund einer instabilen Flugbahn mit den Quadrupolstäben. Über die angelegten Spannungen kann dann im Umkehrschluss das m/z-Verhältnis bestimmt werden. Beim Scannen der Massen werden Gleich- und Wechselspannung im Gleichschritt erhöht und es werden die verschiedenen Bereiche für eine stabile Oszillation der verschiedenen m/z-Verhältnisse der Ionen durchlaufen.

Eine besondere Gruppe von Massenspektrometern stellen die Ionenfallen dar: Man unterscheidet elektrische, magnetische (FT-ICR) und Orbitrap-Ionenfallen[4]. Die elektrische Ionenfalle, die nach Wolfang Paul auch Paul-Ionenfallen genannt wird[16], besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endelektroden, die nach dem gleichen Prinzip eines Quadrupols funktionieren.

In der Orbitrap-Ionenfalle (Abbildung 1-4), die Ende der 1990er-Jahre von Alexander Makarov entwickelt wurde, fliegen die Ionen seitlich oszillierend auf einer Kreisbahn um eine zentrale, spindelförmige Elektrode[17]. Die Ionen werden durch das angelegte elektrostatische Feld der zentralen Elektrode, das eine Anziehungskraft erzeugt, und durch die entgegen gerichtete Zentrifugalkraft auf der Kreisbahn gehalten.

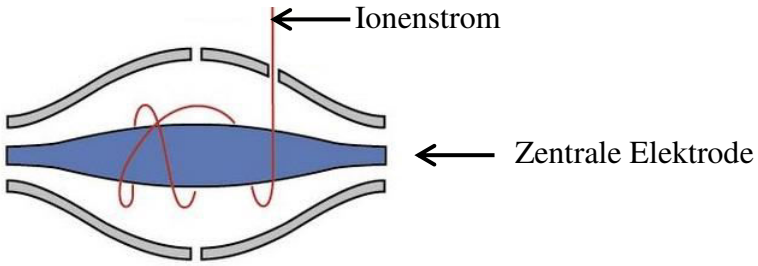

Abbildung 1-4: Schematische Zeichnung einer Orbitrap-Ionenfalle (bearbeitete Abbildung nach Planet Orbitrap[18]: Zoom auf Orbitrap).

Die Frequenz der axialen Oszillation in der Orbitrap, die nur vom m/z-Verhältnis der Ionen abhängig ist, wird als induzierter Strom über eine äußere Elektrode gemessen. Da hier viele verschiedene Ionen gleichzeitig gemessen werden, überlagern sich diese Signale und müssen mittels Fourier-Transformation in Massenspektren umgerechnet werden.

Die Masse-Ladungs-Verhältnisse werden nur über Resonanzfrequenzen detektiert und die Detektion ist zerstörungsfrei. Dies erlaubt längere Messzeiten und dadurch eine bessere Massengenauigkeit und Auflösung.

1.2.3 Detektoren

Der wichtigste Detektor für Massenspektrometer ist der Sekundärelektronenvervielfacher[10] (SEV). Dabei treffen die Ionen auf eine Metallplatte und setzen bei ausreichend hoher Aufprallenergie Sekundär-Elektronen frei. Über eine darauffolgende Kaskade der Sekundärelektronen, die auf weitere Metallplatten einschlagen und immer mehr Elektronen freisetzen, wird das ursprüngliche Signal verstärkt. Nach ausreichender Verstärkung kann das Signal als Strom gemessen werden.

Man unterscheidet den Aufbau mit diskreten Dynoden und den Kanalelektronenvervielfacher (Abbildung 1-5). Beim Aufbau mit den diskreten Dynoden werden spezielle Elektroden mit zunehmender Beschleunigungsspannung in Reihe geschaltet. Zunächst trifft das Ion aus dem Massenanalysator auf eine Konversionsdynode, wo das erste Elektron erzeugt wird. Dieses wird durch die Beschleunigungsspannung auf die nächste Dynode geleitet und schlägt weitere Elektronen aus.

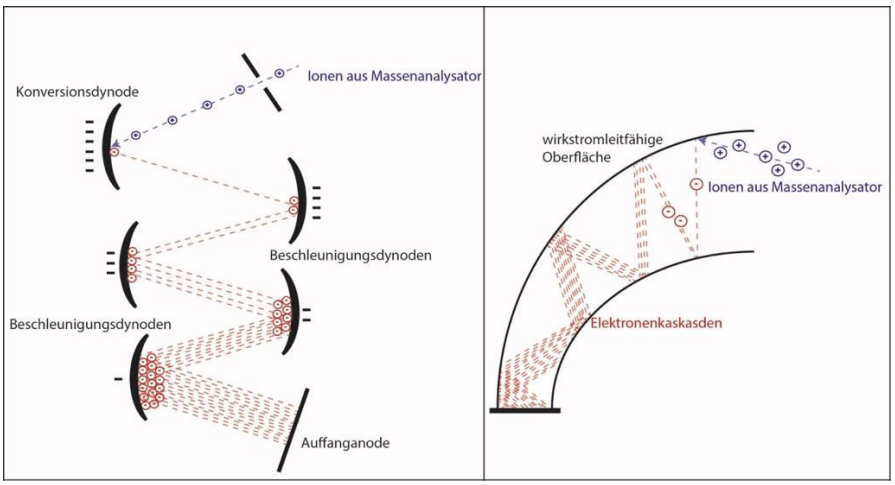

Abbildung 1-5: Schematischer Aufbau eines Sekundärelektronenvervielfachers (links) und eines Kanalionenvervielfachers (rechts). (Abbildung erstellt mit Adobe Illustrator nach Otto[10], Verena Tinnefeld).

Beim Kanalelektronenvervielfacher liegen keine diskreten Dynoden vor, sondern die Elektronenvervielfachung erfolgt in einem kontinuierlichen Röhrchen. Das Röhrchen stellt dabei die Kathode dar, die an einem Ende mit der Anode verschlossen ist.

1.2.4 Hybrid-Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific

In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem die Hybrid-Geräte Orbitrap Velos Pro und Orbitrap Elite der Firma Thermo Fisher Scientific, die aus der Kombination von linearer Ionenfalle (LIT, *linear ion trap*) und Orbitrap bestehen, verwendet (Abbildung 1-6).

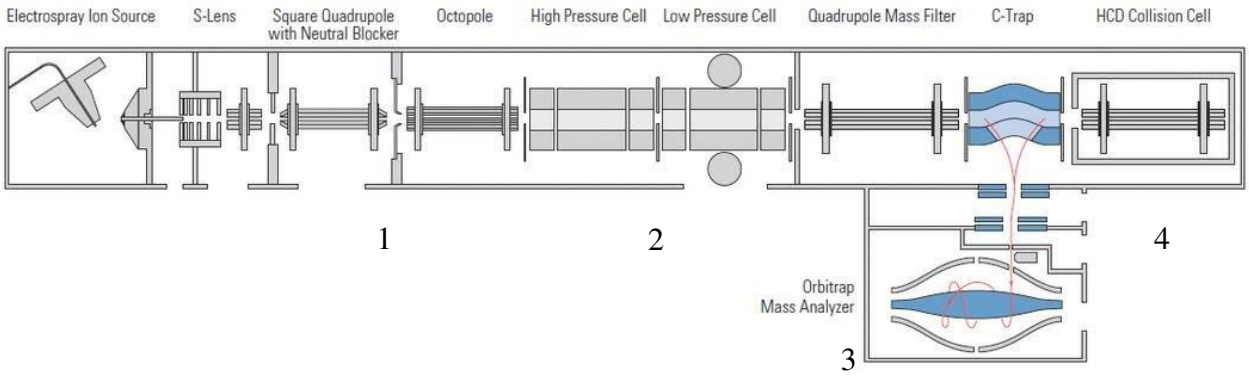

Abbildung 1-6: Schematischer Aufbau eines Hybridmassenspektrometers der Firma Thermo Fisher Scientific bestehend aus linearer Ionenfalle (2) und Orbitrap (3). 1: Ionenoptiken, 4: HCD Kollisionszelle. (Abbildung von Planet Orbitrap[18]).

Nach der Ionisierung in der ESI-Quelle werden die Ionen über verschiedenen Ionenoptiken (Abbildung 1-6, **1**: S-Lens, Quadrupol mit Neutralblocker und Oktopol), die der effektiven Weiterleitung und Fokussierung der Ionen und der Entfernung kontaminierender Neutralteilchen dienen, in die lineare Ionenfalle (Abbildung 1-6, **2**) überführt. Die lineare Ionenfalle ist eine elektrische Ionenfalle, die nach dem Prinzip des Quadrupols funktioniert und durch Endelektroden die Ionen auch speichern kann. Bei den verwendeten Geräten besteht die lineare Ionenfalle aus einer Hochdruck- und Niederdruck-Zelle. In der Hochdruckzelle werden die Ionen abgebremst, fokussiert und isoliert, um anschließend mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (collision-induced dissociation, CID, siehe 1.2.5) fragmentiert zu werden. In der Niederdruckzelle erfolgt die Detektion mittels zwei Elektronenvervielfachern (graue Kreise in Abbildung 1-6).

Über einen weiteren Quadrupol können Ionen zur C-Trap weitergeleitet werden, wo diese erneut abgebremst und fokussiert werden, bevor sie als gebündelte Pakete in die Orbitrap (Abbildung 1-6, **3**) geleitet werden. Eine andere Möglichkeit der Fragmentierung stellt die Hoch-Energie kollisionsinduzierte Dissoziation (higher energy collisional dissociation, HCD, siehe 1.2.5) dar, die nicht in der Ionenfalle, sondern in einer Kollisionskammer (Abbildung 1-6, **4**) hinter der C-Trap stattfindet. Nach der HCD-Fragmentierung werden Fragment-Ionen in der Orbitrap analysiert, wodurch auch Ionen mit niedrigen m/z-Verhältnissen (unter m/z = 300) detektiert werden können, was in der linearen Ionenfalle nicht möglich ist.

Die Kombination aus linearer Ionenfalle und Orbitrap erlaubt die optimale Ausnutzung der Vorteile beider Massenanalysatoren: Während die lineare Ionenfalle sensitiver und schneller als die Orbitrap ist, liefert die Orbitrap eine deutliche höhere Massengenauigkeit und Auflösung. In diesen Hybridgeräten wird im Standard-Modus zunächst ein Scan der intakten Ionen (Precursor oder Parent Ion) in der Orbitrap mit hoher Massengenauigkeit aufgenommen (Survey-Scan). Anschließend wird eine definierte Anzahl von Precursor-Ionen (Top N intensivste Ionen mit N = 3-15) in der linearen Ionenfalle nacheinander isoliert und

fragmentiert. Die generierten Fragmentionen werden durch Veränderung der Spannung mit zunehmendem m/z-Verhältnis aus der Ionenfalle entlassen und über die Elektronenvervielfacher detektiert. Während die Fragmentierung läuft, kann in der Orbitrap schon der nächste Survey-Scan aufgenommen werden.

Die aktuellste Entwicklung im Bereich der Hybrid-Massenspektrometer stellt die Orbitrap Fusion Lumos dar. Dieses Gerät enthält einen Quadrupol, eine lineare Ionenfalle und eine Orbitrap (Tribrid-Architektur). Durch die Verwendung von drei Massenanalysatoren ist es möglich die Scans und Isolierung von Precursor- und Fragmentionen parallel durchzuführen und in gleicher Zeit mehr Spektren zu erhalten. Durch verbesserte Ionenweiterleitung im Massenspektrometer wird außerdem eine sehr hohe Sensitivität erreicht.

1.2.5 Peptidfragmentierung

Intakte Peptid-Ionen können im Massenspektrometer mittels verschiedener Methoden fragmentiert werden, um Informationen über ihre Aminosäuresequenz zu erhalten[4]. Bei Peptiden gibt es verschiedenen Bruchstellen im Peptid-Rückgrat, die je nach gewählter Fragmentierungsmethode vor (a, x), in (b, y) oder hinter (c, z) der Peptidbindung liegen (siehe Abbildung 1-7). Die heute übliche Nomenklatur wurde von Roepstorff, Fohlmann[19] und Biemann[20] etabliert.

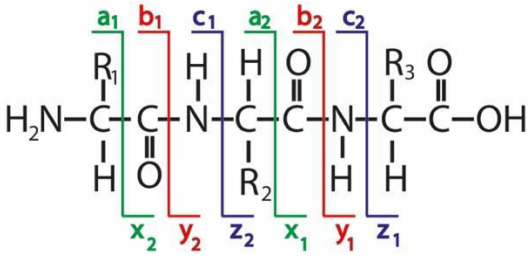

Abbildung 1-7: Roepstorff-Fohlmann-Biemann-Nomenklatur von Ionenserien bei der Fragmentierung von Peptiden[19,20].

Eine Möglichkeit der Fragmentierung ist die Kollisionsinduzierte Dissoziation[21] (collision-induced dissociation, CID, oder collision-activated dissociation, CAD). Hierbei werden neutrale Gasatome bzw. -moleküle verwendet, welche mit den Analytionen kollidieren und durch Energieübertragung die Fragmentierung bewirken. Die Analytionen werden zunächst in der Ionenfalle isoliert. Durch leichte Mehrfachstöße mit dem neutralen Stoßgas, meistens Helium, wird die innere Energie des Analytions so hoch bis es schließlich in Fragmente zerfällt. Die Fragmentionen werden aus der Ionenfalle durch Regulierung der Spannung mit steigendem m/z-Verhältnis entlassen mit den Sekundärelektronenvervielfachern detektiert, wobei auch eine Detektion mittels Orbitrap mit höherer Massengenauigkeit möglich ist. Es entstehen bevorzugt die sogenannten b- und y-Ionenserien.

Die Analytionen können aber auch in einer speziellen Kollisionskammer (Oktopol-Kollisionskammer) fragmentiert werden. Dabei wird eine höhere Spannung eingesetzt, um die fragmentierten Ionen in der Kollisionskammer zu beschleunigen (higher energy collisional dissociation, HCD)[22]. Durch die höhere Energie werden die Analytionen durch nur wenige Kollisionen mit dem Stoßgas fragmentiert. Im Vergleich zur CID-Fragmentierung passieren hier weniger Neutralverluste an den Peptiden, was vor allem labile Modifikationen der Aminosäureseitenketten betrifft und diese besser detektierbar macht. HCD-Fragmente werden dann in der Orbitrap detektiert, was zusätzlich eine höhere Massengenauigkeit und einen erweiterten m/z-Bereich mit sich bringt. Wie bei CID werden ebenfalls b- und y-Ionenserien erzeugt.

Eine andere Möglichkeit zur Fragmentierung ist die Übertragung von Elektronen durch den Einsatz eines stabilen Radikalanions. Bei der electron-transfer dissociation (ETD)[23] wird das ungepaarte Elektron des Flouranthen-Moleküls auf das Analytion übertragen und es kommt zur spontanen Fragmentierung. ETD funktioniert am besten mit hochgeladenen Peptiden – also sehr langen Peptiden bis hin zu ganzen Proteinen. Hier werden c- und z-Ionenserien erzeugt.

1.2.6 Identifizierung von Peptiden durch MS/MS-Spektren

Nach der Messung von Peptiden mittels LC-MS/MS erhält man eine große Zahl von Fragmentionenspektren. Je nach Komplexität der Probe – von einzelnen Proteinen zu komplexen Proteingemischen aus Zelllysaten – werden Hunderte bis Zehntausende Spektren erhalten, die nicht ohne Computerunterstützung ausgewertet werden können. Für lineare Peptide gibt es drei bedeutende Ansätze, um über MS- und MS/MS-Spektren Peptide zu identifizieren[24]. In jedem Fall muss eine Datenbank mit Proteinsequenzen vorliegen, die *in silico* unter Angabe der verwendeten Protease „verdaut“ werden, um die theoretischen Peptide und deren Fragmente zu erhalten.

Die erste Möglichkeit für den Abgleich von Fragmentionenspektren mit einer Datenbank ist die Verwendung von „Peptide Sequence Tags“, die 1994 von Matthias Mann und Matthias Wilm publiziert wurde[25]. Dabei geht man davon aus, dass in jedem Fragmentionenspektrum ein kleiner Teil der Sequenz, meistens die Abfolge von drei bis vier Aminosäuren, sehr leicht zugeordnet werden kann (Sequence Tag). Zusätzlich zu diesem Sequence Tag wird die niedrigste und höchste Masse des Fragmentionenspektrums bestimmt, was Informationen über den „Massen-Abstand“ des Sequence Tags zu den beiden Peptid-Enden liefert. Diese Informationen werden dann mit Peptid-Sequenzen aus der Protein-Datenbank verglichen und zugeordnet.

Ebenfalls 1994 wurde die Methode der „Autokorrelation“ veröffentlicht[26], welche im Programm *Sequest* eingesetzt wird. Hierbei wird ein aufgenommenes Fragmentionenspektrum

mit einem theoretisch erstellten Fragmentionenspektrum aus der Datenbank verglichen. Je besser die Übereinstimmung, desto besser fällt der Score für den Treffer aus.

Die dritte Möglichkeit zur Identifizierung von Peptiden aus Fragmentionenspektren heißt „Wahrscheinlichkeits-basierte Übereinstimmung“[27]. Hierbei werden ebenfalls theoretische Fragmentionenspektren aus Proteindatenbanken berechnet, wobei zusätzlich die Bestimmung der Übereinstimmung zum gemessenen Spektrum mit den Peaks der höchsten Intensität beginnt. Die berechnete Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung zufällig – also inkorrekt – erfolgte, wird dann als Score ausgegeben. Dieser Algorithmus wird in der Software *Mascot* eingesetzt.

Beim Abgleich von Fragmentionenspektren mit der Datenbank können vier Arten von Ergebnissen erhalten werden: true positive (richtige Zuordnung), true negative (richtige Ablehnung), false negative (falsche Ablehnung) und false positiv (falsche Zuordnung). Die ersten beiden Möglichkeiten sind wünschenswert, da eine Zuordnung entweder korrekt erfolgt oder eine Zuordnung nicht möglich ist, da das identifizierte Peptid nicht in der Datenbank vorkommt. Eine falsche Ablehnung führt zum Informationsverlust, da ein Fragmentionenspektrum nicht dem passenden Peptid zugeordnet werden kann. Problematisch sind falsche Zuordnungen, da Fragmentionenspektren einem nicht zugehörigen Datenbank-Peptid zugeordnet werden. Die Qualität einer Datenbanksuche wird meistens über die Bestimmung der *False Discovery Rate* (FDR) bestimmt[28]. Dabei wird die Suche mit einer Decoy-Datenbank wiederholt, in welcher die Sequenzen umgedreht wurden (rückwärts). Da hier keine richtigen Zuordnungen erwartet werden, sind alle Identifizierungen falsch und ergeben die *False Discovery Rate*. Darüber kann dann ein Signifikanz-Schwellenwert des Scores festgelegt werden, ab welchem Treffer als „richtig“ gelten. Üblicherweise werden 5 % FDR akzeptiert.

Nachdem über einen Suchalgorithmus Peptide identifiziert worden sind, werden diese den Proteinen aus der Datenbank zugeordnet und in der Trefferliste angezeigt. Dabei ist die Identifizierung eines Proteins umso besser, je mehr Peptide aus dem Protein gefunden wurden. Da es Peptide gibt, die aus mehreren Proteinen stammen können, ist auch wichtig, ob die zugeordneten Peptide spezifisch für das Protein sind. Die Suche nach gemessenen Peptidsequenzen und den zugehörigen Proteinen wird maßgeblich von den Suchparametern beeinflusst. So entscheiden die gewählte Datenbank (von bekannten Proteinen eines Organismus bis zu allen bekannten Proteinen aller Organismen), die Protease, die Aminosäuremodifikationen, die Fragmentierungsmethode und die Massengenauigkeit welche Peptide überhaupt identifiziert werden können.

1.3 Flüssigchromatographie

In der Massenspektrometrie-basierten Proteinanalytik wird aufgrund der hohen Komplexität der zu untersuchenden Proben zur Trennung der Peptide Flüssigchromatographie eingesetzt, um die Identifizierungsrate zu erhöhen.

Das Wort Chromatographie stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Farbenschreiben“ (chroma „Farbe“ und graphein „schreiben“). Anfang des 20. Jahrhunderts experimentierte Michail Semjonowitsch Zwet mit Pflanzenextrakten und konnte unterschiedliche Farbstoffe auftrennen[29] – er wählte daher den Begriff Chromatographie. Heute versteht man allgemeiner unter Chromatographie die Auftrennung von Stoffgemischen durch einen unterschiedlichen Übergang der Komponenten in zwei nicht mischbare Phasen, die mobile und stationäre Phase[10].

Verschiedene Analyten wechselwirken in unterschiedlichem Maße mit der unbeweglichen stationären Phase und werden durch die flüssige mobile Phase unterschiedlich schnell durch das chromatographische System transportiert. Dadurch ergeben sich die unterschiedlichen Retentionszeiten der verschiedenen Analyten.

1.3.1 Grundlagen der Flüssigchromatographie

Bei der Flüssigchromatographie besteht die stationäre Phase aus kleinen Partikeln, die eine spezifische Oberfläche aufweisen, die mit den Analyten wechselwirkt. Die mobile Phase ist flüssig und wird mit Pumpen durch die stationäre Phase geleitet. Die stationäre Phase liegt bei der Flüssigchromatographie in Form einer Säule vor. Es werden je nach Anwendung verschiedene Größen von dünnen Kapillaren bis zu fingerdicken Metallsäulen eingesetzt. Die Hochleistungsflüssigchromatographie (high pressure/performance liquid chromatography, HPLC) ist heute die am häufigsten eingesetzte Flüssigchromatographie-Methode. Die mobile Phase wird hier mit sehr hohem Druck durch die stationäre Phase gepumpt, was Vorteile bei der Schnelligkeit, dem Auflösungsvermögen und der Automatisierbarkeit mit sich bringt[4].

Am Säulenende können die aufgetrennten Analyten detektiert werden. Häufig wird dabei die UV-Absorption als Detektionsmethode eingesetzt. So entsteht das Chromatogramm, das die verschiedenen Peaks abhängig von ihrer Retentionszeit zeigt (Abbildung 1-8).

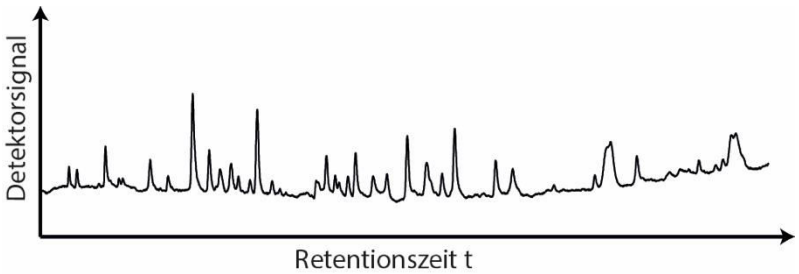

Abbildung 1-8: Ein Chromatogramm zeigt die detektierten Analyten abhängig von ihrer Retentionszeit (Abbildung erstellt mit Adobe Illustrator mit selbst aufgezeichnetem Chromatogramm, Verena Tinnefeld).

1.3.2 Umkehrphasen-Flüssigchromatographie von Peptiden

Je nach Eigenschaften des Materials der stationären Phase unterscheidet man viele verschiedene Arten von Flüssigchromatographien. Heute wird in der Peptidanalytik vorrangig Umkehrphasen-Chromatographie benutzt. Der Name Umkehrphase ergibt sich aus der Definition der Normalphasen-Chromatographie: Man verwendet eine polare stationäre Phase (z.B. Kieselgel) und eine unpolare mobile Phase (z.B. Hexan). In der Umkehrphasen-Chromatographie werden also umgekehrt eine unpolare stationäre Phase und eine polare mobile Phase verwendet.

In der Peptid-Analytik werden häufig Säulen mit einer unpolaren C18-Phase verwendet. Dazu werden die freien Hydroxylgruppen von Kieselgel-Partikeln mit langen, unpolaren Seitenketten (C18 = Seitenkette aus 18 Kohlenstoffatomen) modifiziert.

Eine besondere Art von Säulen sind monolithische Säulen, die nicht aus einzelnen Partikeln, sondern aus einem einzelnen porösen Block bestehen. Sie zeichnen sich im Vergleich zu partikelgefüllten Säulen durch einen geringeren Rückdruck und eine hohe Robustheit aus. Außerdem erlauben monolithische Säulen auch die gleichzeitige Auftrennung von Proteinen und Peptiden und sind dabei unempfindlicher gegen Salze und Detergenzien.

Als mobile Phase wird ein Gradient aus einer wässrigen, polaren Phase und einer Phase mit hohem unpolaren Anteil verwendet. Während der Auftrennung wird der Anteil der unpolaren Phase kontinuierlich erhöht, um die Peptide zu eluieren. Zusätzlich kommt ein Ionenpaar-Reagenz zum Einsatz, z. B. Trifluoressigsäure (TFA). Dieses maskiert die positiven Ladungen der Peptide, die diese beim verwendeten, sauren pH-Wert (~2) haben. Außerdem werden freie, nicht-modifizierte Hydroxylgruppen der Kieselgel-Partikel maskiert. Dadurch wird verhindert, dass neben der hydrophoben Wechselwirkung der Peptide mit der C18-Phase auch hydrophile Wechselwirkungen auftreten. In chromatographischen Systemen, die an ein Massenspektrometer gekoppelt sind, wird TFA durch das schwächere Ionenpaar-Reagenz Ameisensäure (FA) ersetzt, da TFA sehr stark positive Ladungen maskiert und die Ionisierung in der ESI-Quelle beinträchtigen kann.

1.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Eine weitere Methode zur Auftrennung von Peptiden ist die Ionenaustauschchromatographie. Dabei wird die positive Ladung, die Peptide bei niedrigem pH-Wert aufweisen, ausgenutzt. Aufgrund der eingesetzten Salze in der mobilen Phase kann diese Chromatographie nicht direkt mit Massenspektrometrie gekoppelt werden – allerdings stellt die Ionenaustausch-chromatographie eine nützliche, zusätzliche Auftrennungs- und Anreicherungsmethode dar.

Da Peptide bei niedrigem pH-Wert normalerweise netto positiv geladen sind, wird eine negativ geladene stationäre Phase verwendet (Kationenaustauschchromatographie). Je nach Ionenstärke der stationären Phase unterscheidet man starke und schwache Ionenaustauschmaterialien. Für Peptide wird vorrangig starke Kationenaustausch-

chromatographie verwendet (SCX, strong cation exchange), z. B. mit einer stationären Phase aus Polysulfoethyl A™ (Abbildung 1-9). Dieses Material ist nicht nur ein sehr starkes Ionenaustauschmaterial, es ist auch besonders hydrophil und minimiert dadurch unerwünschte hydrophobe Wechselwirkungen[31]. Zusätzlich kommt einer organischer Modifier (z. B. Acetonitril) zum Einsatz, welcher hydrophobe Wechselwirkungen zusätzlich unterdrückt.

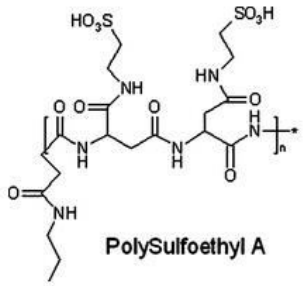

Abbildung 1-9: Struktur der Polysulfoethyl A™- Phase für die starke Kationenaustausch-chromatographie (Abbildung von www.polylc.com[30]).

Als mobile Phase wird ein Gradient mit Eluenten mit steigender Ionenstärke eingesetzt. Dadurch werden im Verlauf des Gradienten die positiven Peptide von der stationären Phase verdrängt und eluiert. Je mehr positive Ladungen ein Peptid aufweist, desto länger wird es an der stationären Phase zurückgehaltenen und dementsprechend später eluiert.

1.3.4 ChaFRADIC

ChaFRADIC steht für **Cha**rge based **Fra**ctional **Di**agonal **C**hromatography, also ladungsbasierte, fraktionierte, diagonale Chromatographie. Diese Methode wurde 2013 von Venne et al.[31] veröffentlicht und basiert wiederum auf dem Prinzip von COFRADIC, **Co**mbined **Fra**ctional **Di**agonal **C**hromatography (kombinierte, fraktionierte, diagonale Chromatographie)[32].

Die Gruppe um Kris Gevaert führte COFRADIC ein, um die Komplexität von Proteomics-Proben zu verringern. Die Idee dahinter war, für jedes Protein aus einer Probe nur bestimmte Signatur-Peptide zu isolieren und zu analysieren. So kann jedes Protein sicher identifiziert werden und die Komplexität der Probe wird drastisch reduziert. COFRADIC basiert auf zwei identischen fraktionierten Umkehrphasen-Chromatographien, zwischen welchen die Peptide aus einer oder mehreren Fraktionen modifiziert werden, um deren Hydrophobizität zu verändern. Dadurch wird in der zweiten fraktionierten Umkehrphasen-Chromatographie eine Verschiebung der Retentionszeit (Shift) induziert, die im Idealfall nur die interessierenden Peptide betrifft (positive oder negative Selektion)[33]. Dadurch können diese vom Gros der restlichen Peptide abgetrennt und analysiert werden. Bisher wurden COFRADIC-Techniken unter anderem für die Anreicherung von Mehtionin-haltigen[34], Cystein-haltigen[34], N-terminalen[34], phosphorylierten[35] und ubiquitinierten[36] Peptiden entwickelt.

ChaFRADIC folgt für die Anreicherung N-terminaler Peptide dem gleichen Prinzip, allerdings mit Ionenaustauschchromatographie bei niedrigem pH-Wert (2,7) anstelle der Umkehrphasen-Chromatographie (Abbildung 1-10). Dies bietet den Vorteil, dass klarer definierte Retentionszeit-Verschiebungen induzierbar sind, da Peptide bei pH 2,7 netto positiv geladen sind: Der N-Terminus und die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin liegen protoniert vor.

Bei ChaFRADIC werden im komplexen Protein-Gemisch vor dem proteolytischen Verdau alle primären Amine (N-Termini und Lysine) dimethyliert, wodurch diese Gruppen für andere Modifikationen geblockt sind, aber ihre Ladung behalten. Im anschließend Verdau mit Trypsin werden die Proteine nur nach Arginin gespalten, da Lysin auch für den Verdau blockiert ist. Die entstandenen Peptide, die sich aus dimethylierten N-terminalen Peptiden und neu generierten internen Peptiden mit freien N-Termini zusammensetzen, werden nun in der ersten SCX-Trennung nach ihren Ladungszuständen fraktioniert und gesammelt. In jeder dieser Fraktionen werden im nächsten Schritt die freien N-Termini acetyliert, wodurch diese ihre Ladung verlieren. Dies betrifft nur die N-Termini der internen Peptide, da die ursprünglichen Protein-N-Termini vorher bereits dimethyliert wurden. Durch den Ladungsverlust eluieren die acetylierten internen Peptide in der zweiten SCX-Auftrennung jetzt früher, wohingegen die ursprünglichen, dimethylierten N-terminalen Peptide wieder zum gleichen Zeitpunkt eluieren. Dadurch können die N-terminalen Peptide effizient von internen Peptiden abgetrennt werden.

Neben ihrer Einfachheit und Robustheit besticht diese Methode dadurch, dass mit kleineren Probenmengen mehr N-terminale Peptide als mit COFRADIC identifiziert werden können. ChaFRADIC kann außerdem auch mit Quantifizierungsmethoden wie iTRAQ kombiniert werden[37]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Protokoll zur Anreicherung von Cross-Link Peptiden mittels ChaFRADIC entwickelt werden.

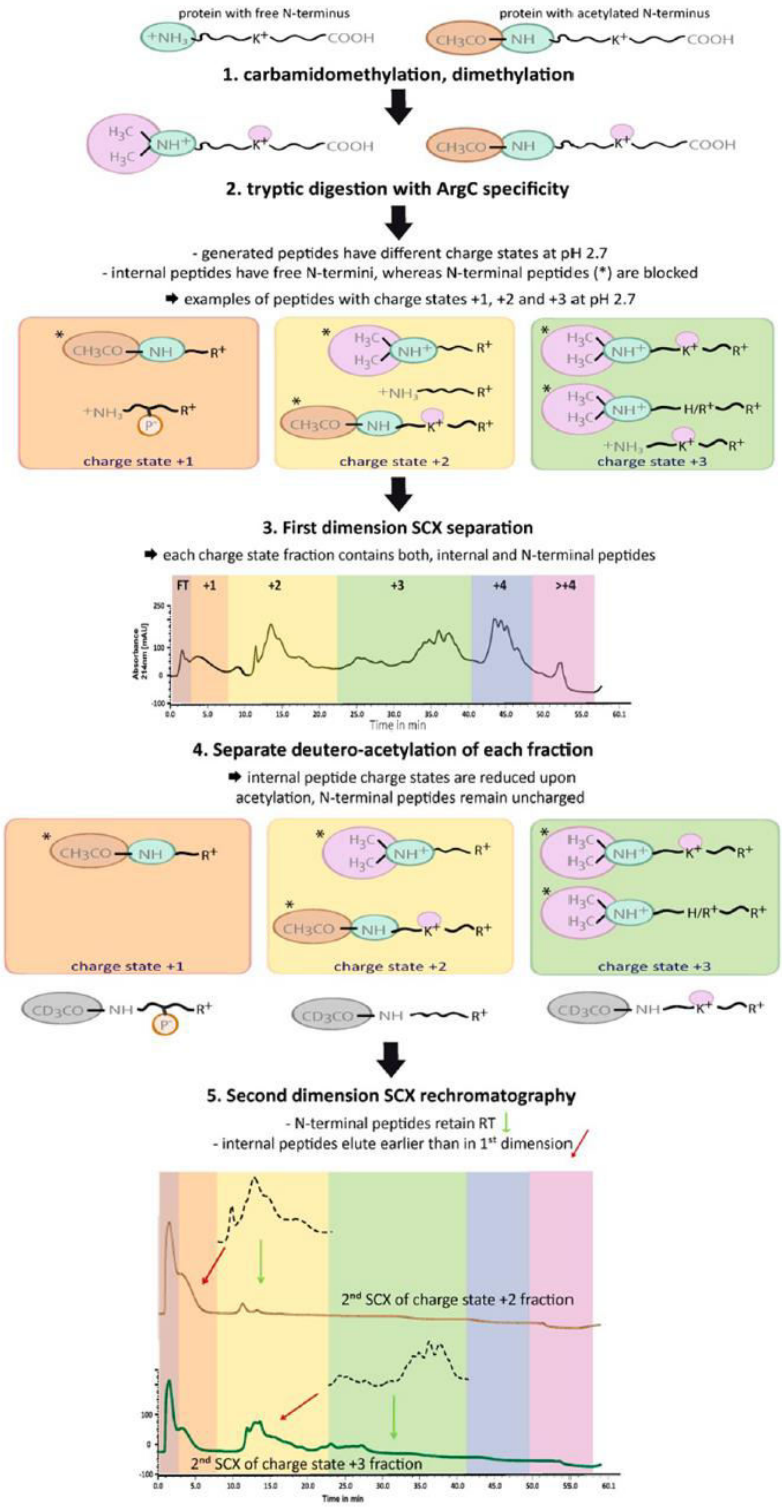

Abbildung 1-10: Schematischer Ablauf von ChaFRADIC[31]. 1. Carbamidomethylierung von Cysteinen und Dimethylierung freier Amin-Gruppen. 2. Verdau mit Trypsin (hier ArgC-Spezifität). 3. SCX-Trennung nach Ladungen. 4. Acetylierung der neuen, freien N-Termini der internen Peptide führt zu Ladungsverlust. 5. Zweite SCX-Trennung mit gleichem Gradienten mit Shift der internen Peptide zu früheren Elutionszeiten, während die N-Terminalen Peptide zum gleichen Zeitpunkt wie in der ersten SCX-Trennung eluieren.

1.4 Strukturuntersuchung von Proteinen und Proteinkomplexen

Die Untersuchung der Struktur von Proteinen ist wichtig, um zelluläre Abläufe auf molekularer Ebene komplett zu verstehen. Erst wenn die detaillierte Struktur von Proteinen, die an wichtigen Prozessen beteiligt sind, bekannt ist, wird nachvollziehbar wie diese Proteine mit anderen Proteinen und kleinen Molekülen interagieren – und es wird auch möglich, Fehlfunktionen zu identifizieren.

Um die Struktur eines Proteins aufzuklären, ist es wichtig, alle Strukturebenen zu kennen. Daher ist es unabdingbar, die Aminosäuren-Abfolge (Primärstruktur) zu bestimmen, bevor eine dreidimensionale Struktur erstellt werden kann.

Die erste Methode zur Bestimmung der Primärstruktur wurde von Frederick Sanger 1945 beschrieben[38]. Ihm gelang unter Verwendung von *1-Fluor-2,4-dinitrobenzol* mittels N-terminaler Markierung die Bestimmung der kompletten Aminosäuresequenz von Insulin. Der Nachteil dieser Methode bestand darin, dass die N-terminale, zu bestimmende Aminosäure durch totale oder partielle Hydrolyse abgespalten werden musste – wodurch auch das restliche Protein zerteilt wurde und nicht mehr zur weiteren Analyse zu Verfügung stand.

1949 veröffentlichte Peer Edman den sogenannten Edman-Abbau[39]. Diese Methode war einfacher durchzuführen, da die Sequenzbestimmung hier im Gegensatz zur Sanger-Methode fortlaufend passiert. Die Peptidsequenz reagiert mit dem Edman-Reagenz *Phenylisothiocyanat*, welches am N-Terminus ein *Thioamid* bildet. Durch eine interne Cyclisierung entsteht daraus das *Anilinothiazolin*, das im folgenden Schritt abgespalten wird. Dadurch verbleiben die N-terminal um eine Aminosäure verkürzte Peptidkette und die als *Hydantoin* abgespaltene N-terminale Aminosäure. Die abgespaltene Aminosäure wird durch chromatographische Methoden analysiert, während die verbleibende Aminosäurekette für den nächsten Abspaltungsschritt zur Verfügung steht.

Beide Methoden finden heute keine Anwendung mehr, da sie zeitaufwendig und wenig sensitiv sind. Es ist beispielsweise deutlich einfacher über DNA-Sequenzierung bestimmte DNA-Abschnitte *in silico* in die Proteinsequenzen zu übersetzen. Bei fehlender DNA-Datenbank kommt die *de-novo*-Sequenzierung mittels Massenspektrometrie zum Einsatz. Dabei werden die aus den Proteinen gewonnenen Peptide mittels Tandem-Massenspektrometrie fragmentiert, wodurch Spektren aller Bruchstücke einer Sequenz erhalten werden[40]. Durch gezieltes Suchen von spezifischen Massendifferenzen können Ionenserien identifiziert und Rückschlüsse auf die Peptidsequenzen getroffen werden, welche durch Überlappungen zu Proteinen zusammengefügt werden können.

Die alleinige Kenntnis der Peptidsequenz eines Proteins erlaubt allerdings nur bedingt Rückschlüsse auf dessen dreidimensionale Struktur. Die wichtigsten Methoden zur Bestimmung dieser sind die Röntgenstrukturanalyse und Kernspinresonanzspektroskopie.

Die Röntgenstrukturanalyse erlaubt die Strukturanalyse mit einer Auflösung von 1 Å (10^{-10} m). Bei der Größe der zu untersuchenden Proteine sind in der Röntgenstrukturanalyse keine Grenzen nach oben gesetzt, allerdings ist die Voraussetzung eine erfolgreiche Kristallisation des Proteins, was oft nicht möglich ist. Außerdem werden für die Kristallisation Glykanstrukturen entfernt, die aufgrund ihrer Größe großen Einfluss auf die Proteinstruktur haben können. Durch die Beugung eines Röntgenstrahls am Proteinkristall kann dann ein Bild der Anordnung der Atome erhalten werden[4]. Sir John Cowdery Kendrew veröffentliche 1958 die Struktur von Pottwal-Myoglobin – die erste Röntgenstrukturanalyse eines Proteins[41]. In der *Protein Data Bank* (PDB) finden sich heute über 100.000 Proteinstrukturen, die mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurden[42]. Weiterentwicklungen stellen die Röntgen-Kleinwinkelmolekülstreuung (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) und der Einsatz von Freien-Elektronen-Lasern (FEL) dar. Diese benötigen keine Proteinkristalle, sondern Proteine in Lösung – allerdings können diese Methoden nicht die hohe Auflösung der klassischen Röntgenstrukturanalyse erreichen[4].

Die Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magentic Resonance, NMR) von Proteinen bietet eine Strukturanalyse mit der gleichen hohen Auflösung wie die Röntgenstrukturanalyse und hat zusätzlich den Vorteil, dass das Protein nicht kristallisiert werden muss, sondern in Lösung verwendet werden kann. Der Nachteil besteht aber darin, dass die Proteingröße auf etwa 30 kDa beschränkt ist. Das Prinzip der NMR-Spektroskopie wurde 1946 durch Felix Bloch und Edward Mills entdeckt, wofür beide 1952 den Nobelpreis für Physik erhielten[43]. Zur Messung wirkt auf eine Probe in einem homogenen Magnetfeld ein senkrechtes, hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld (Radiowellen) ein. Im homogenen Magnetfeld werden die Energieniveaus des Kernspins aufgespalten und ein Übergang zwischen den Energieniveaus kann durch das elektromagnetische Wechselfeld induziert werden, wenn dessen Frequenz der zu überbrückenden Energiedifferenz entspricht[4]. Diese Resonanzfrequenzen geben Rückschlüsse auf die chemische Umgebung des betrachteten Atomkerns. Jeder Atomkern ist von Elektronen umgeben, die dem Atomkern direkt oder benachbarten Atomen zugehörig sind. Die Elektronen erzeugen zusätzliche Felder, welche dem angelegten Magnetfeld entgegengerichtet sind. Die unterschiedlichen effektiven Magnetfelder an den Atomkernen und die dadurch verschiedenen Resonanzfrequenzen der Radiowellen erlauben direkte Rückschlüsse auf die atomare Umgebung der untersuchten Kerne. In der PDB-Datenbank sind heute über 11.000 Proteinstrukturen verfügbar, die mittels NMR-Spektroskopie ermittelt wurden[44].

Diese beiden klassischen Methoden der Strukturanalyse sind mit großem Aufwand in der Probenvorbereitung und Datenauswertung verbunden und daher sehr kompliziert. Trotzdem sind es bis heute die führenden Methoden der Strukturanalyse.

Eine andere, aufstrebende Technik ist die Kryo-Elektronenmikroskopie[45]. Um Proteine zu fixieren, werden diese in einer dünnen Schicht amorphen Eises gefroren. Durch Bestrahlung mit Elektronen werden dann 2D-Projektionsbilder erzeugt. Dabei entstehen viele

verschiedenen Projektionen, da die Proteine ungeordnet in verschiedenen Winkeln fixiert werden. Da Proteine nur mit vergleichsweise schwachen Elektronenstrahlen zerstörungsfrei abgebildet werden können, müssen anschließend Tausende Bilder gleicher Projektionswinkel überlagert werden, um das Rauschen zu verringern. Durch das Zusammenlegen der überlagerten Bilder verschiedener Projektionsrichtungen kann dann eine dreidimensionale Struktur berechnet werden. Mit Kryo-Elektronenmikroskopie können bei deutlich geringerer Probenvorbereitung mittlerweile gleiche Auflösungen wie mit Röntgenstrukturanalyse erreicht werden – der Rechenaufwand für die Bildüberlagerung ist allerdings sehr hoch.

Neben der reinen Strukturanalyse ist auch die Untersuchung der Interaktion mehrerer Proteine, z. B. in Komplexen, von großem Interesse.

Wie zwei Proteine miteinander interagieren, kann man mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) untersuchen. Bei der von Förster 1948 entwickelten Methode[46] wird die Energie eines Fluorophors auf ein zweites Fluorophor übertragen, welches diese Energie als Fluoreszenzlicht wieder abgibt. Dieser Energietransfer kann nur bei sehr kleinen Abständen von wenigen Nanometern stattfinden. Befinden sich nun die beiden Fluorophore an zwei verschiedenen Proteinen, passiert der Energietransfer nur bei der Interaktion der Proteine. Befinden sich beide Fluorophore an einem einzelnen Protein, können verschiedenen Konformationen untersucht werden[4]. Mittels FRET lassen sich die Abstände auch genau messen, da die Effizienz des Energietransfers abhängig von der Distanz der Fluorophore ist. Da die Messung in Echtzeit erfolgt, eignet sich FRET vor allem für Proteine, sich nicht kristallisieren lassen bzw. für NMR-Messungen zu dynamisch sind.

Es gibt heute auch weitere Methoden, die helfen, die Struktur von Proteinen aufzuklären. Allerdings erlauben diese nur Analysen mit geringer Auflösung und dienen eher der Unterstützung der klassischen Methoden. Gerade zur Bestimmung der Interaktion von Proteinuntereinheiten in Komplexen haben sich einige Alternativen etabliert.

Eine dieser Methoden ist das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast-Two-Hybrid, Y2H), das 1989 von Fields und Song veröffentlich wurde[47]. Man bedient sich dabei dem Gal4-Transkriptionsfaktor der Bäckerhefen, der aus zwei Domänen besteht. Die erste Domäne bindet an einen bestimmten DNA-Abschnitt und positioniert den Transkriptionsfaktor. Die zweite Domäne ist die Aktivierungsdomäne, die die Transkription auslöst, sobald der Transkriptionsfaktor auf der DNA platziert ist. Fields und Song fanden heraus, dass diese beiden Domänen nicht in einem Protein vereinigt sein müssen, sondern auch als zwei interagierende Proteine die Transkription starten können. Man nutzt nun also einen Hefestamm, dem der Gal4-Transkriptionsfaktor fehlt, und bringt diesen über zwei Plasmide in die Hefe ein. Das erste Plasmid kodiert die Bindungsdomäne und eine zu untersuchende Proteinsequenz. Über das zweite Plasmid wird die Aktivierungsdomäne mit einem möglichen Bindungspartner für die Proteinsequenz exprimiert. Nur wenn Proteinsequenz und Bindungspartner erfolgreich miteinander interagieren, wird die Transkription gestartet. Die

Detektion erfolgt über das Transkriptionsprodukt – z. B. die Herstellung bestimmter Aminosäuren, wobei die Hefe in einem Medium ohne diese Aminosäure kultiviert wird. Eine Proteininteraktion und daraus folgende Transkription bedeutet dann das Überleben und Wachstum der Hefe. Die Vorteile dieser Methode liegen im günstigen und einfach zu handhabenden Material, sowie der *in vivo* Proteininteraktion. Allerdings erfolgt die Interaktion im Zellkern der Hefe, wodurch je nach zu untersuchendem Protein die Lokalisation in der Zelle und der Organismus selbst verfälschend wirken können. Nachteilig sind die vergleichsweise hohe Zahl der falsch-positiven Ergebnisse und die beschränkte Aussagekraft der Ergebnisse, da bei der Frage der Interaktion nur das *ob* und nicht das *wie* geklärt wird[4].

Nach einem ähnlichen Prinzip funktioniert die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation[48]. Zwei zu untersuchende Proteine werden mit zwei Fragmenten eines fluoreszierenden Proteins versehen. Kommt es zur Interaktion der zu untersuchenden Proteine, können die Fragmente des fluoreszierenden Proteins auch interagieren und werden zur Fluoreszenz befähigt. Nachteilig ist hierbei, dass die Ziel-Proteine und die Fluoreszenz-Fragmente jeweils passend verknüpft sein müssen, da sonst ein falsch-negatives Ergebnis entsteht. Durch alleinige Interaktion der Fluoreszenz-Fragmente kann wiederum ein falsch-positives Signal entstehen.

Eine weitere Methode ist die Co-Immunpräzipitation. Man verwendet Sepharosepartikel, die mit Protein A beschichtet sind, welches wiederum einen Antikörper bindet. Je nach gewähltem Antikörper bleiben an den Partikeln nur bestimmte Proteine und deren Interaktoren aus einem Zellextrakt hängen und können anschließend über Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie analysiert werden[49]. Die größte Einschränkung hierbei ist die beschränkte Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern. Vorteil dieser Methode sind die sehr guten Analysemöglichkeiten der isolierten Proteinkomplexe. Auch bei dieser Methode muss bei einem positiven Ergebnis hinterfragt werden, ob die Protein-Interaktionen wirklich spezifisch oder zufällig im Zell-Lysat passiert sind. Genau wie beim Yeast-Two-Hybrid-Ansatz wird hier ebenfalls nur die Frage, *ob* Proteine interagieren – nicht *wie* – beantwortet.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (tandem affinity purification, TAP) zur Isolation und Bestimmung der Zusammensetzung von Proteinkomplexen[50]. Dazu wird ein Protein eines Komplexes von Interesse mit einem TAP-tag in einer Zelllinie exprimiert und über diesen TAP-tag isoliert. Da der TAP-tag aus zwei Affinitäts-tags besteht, kann die Aufreinigung in zwei Schritte erfolgen, was eine bessere Isolationseffizienz bedeutet. Dieser Ansatz ist sowohl unabhängig von Antikörpern als auch von Hefe-Zellen, da das Protein in jeder gewünschten Zelllinie exprimiert werden kann. Allerdings wird hier ebenfalls nicht beantwortet, *wie* die gefundenen Proteine interagieren.

Zwei Methoden, die etwas mehr über die Struktur von Proteinen und Komplexen preisgeben, sind der Wasserstoff-Deuterium-Austausch[51] (Hydrogen-Deuterium-Exchange, HDX) und die Limitierte Proteolyse.

Beim H/D-Austausch werden dem Namen gemäß Wasserstoffatome durch Deuterium-Atome ausgetauscht. In Proteinen sind Wasserstoffatome an den funktionellen Gruppen der Seitenketten, an Kohlenstoffatomen und in der Peptidbindung zu finden, wobei nur der Austausch der Wasserstoffatome der Peptidbindungen möglich ist[52]. Diese Wasserstoffatome werden unter physiologischen Bedingungen sehr schnell mit Deuterium ausgetauscht, während bei niedriger Temperatur und saurem pH-Wert der Austausch fast zum Erliegen kommt. Bei einem Protein können außerdem nur Atome ausgetauscht werden, die in Lösung zugänglich sind – also nicht im Inneren des Proteins abgeschirmt und nicht in Wasserstoff-Brückenbindungen involviert sind. Nach dem H/D-Austausch werden die Proteine mittels NMR oder Massenspektrometrie analysiert. Dabei erhält man Informationen über die Oberfläche des untersuchten Proteins. Auch Konformationsänderungen können so beobachtet werden.

Bei der Limitierten Proteolyse werden native Proteine und Komplexe für kurze Zeit proteolytischen Enzymen ausgesetzt, die die Proteine abbauen[53]. Da die Zugangszeit begrenzt ist, wird nicht das komplette Protein in Peptide gespalten, sondern nur exponierte und zugängliche Teile des Proteins werden abgebaut. Über den Vergleich von verschiedenen Proteasen und den zeitlichen Verlauf der limitierten Proteolyse lassen sich so Rückschlüsse auf die Struktur von Domänen und des gesamten Proteins gewinnen.

Daneben hat in den letzten Jahren das Protein Cross-Linking an Bedeutung gewonnen. Da Cross-Linking die verwendete Methode dieser Arbeit ist, wird diese im nächsten Kapitel ausführlich besprochen.

1.5 Protein Cross-Linking

1.5.1 Grundlagen des Protein Cross-Linking

Beim Protein Cross-Linking werden Aminosäure-Seitenketten mit einem bifunktionalen Reagenz kovalent verbunden. Die ersten Cross-Linking Experimente wurden schon in den 1970er-Jahren mit Dimethylsuberimidate (DMS, Abbildung 1-11) durchgeführt, welches über zwei Imidoester-Gruppe mit Aminen der Lysin-Seitenkette und dem N-Terminus reagieren kann[54]. Mangels moderner Analysetechnik wie der Massenspektrometrie war die Auswertung dieser Experimente auf Gelelektrophorese begrenzt, die nur wenig Informationen lieferte.

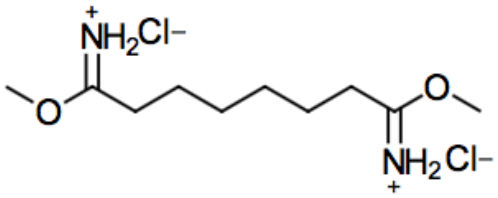

Abbildung 1-11: Strukturformel von Dimethylsuberimidate-dihydrochlorid (erstellt nach Hermanson[59]).

Durch die Verbindung von Cross-Linking mit Massenspektrometrie ist es heute möglich, genauere Informationen über die beteiligten Proteine, deren Struktur und Interaktionspunkte zu gewinnen.

Für ein Cross-Linking Experiment werden meistens gereinigte Proteine oder Proteinkomplexe in einem Puffer verwendet, der die native Form der Proteine sicherstellt und mit dem Cross-Linking Reagenz kompatibel ist. Nach der Inkubation mit dem Reagenz folgt der proteolytische Verdau und die anschließende Analyse mittels LC-MS/MS. Durch spezialisierte Software können dann die verbrückten Cross-Link Peptide identifiziert werden.

Bei der Reaktion der Aminosäure-Seitenketten mit dem Cross-Linking Reagenz können verschiedene Produkte entstehen, die von unterschiedlichem Nutzen sind. Die am häufigsten verwendete Nomenklatur von Schilling et al.[55] wird auch hier verwendet (Abbildung 1-12).

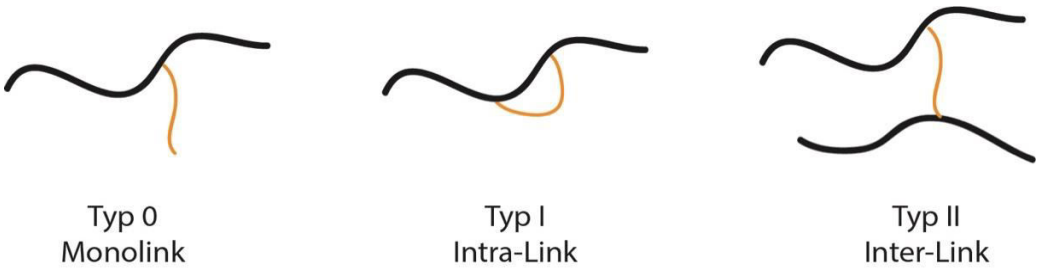

Abbildung 1-12: Verschiedene Typen von Cross-Linking Produkten: Monolinks, Intra-Links und Inter-Links, Nomenklatur nach Schilling et al.[55]. Schwarz = Peptid, Orange = Cross-Linker.

Das gewünschte Reaktionsprodukt ist der Typ II Cross-Link (Inter-Link) zwischen zwei unterschiedlichen Peptiden, da hieraus die meisten Informationen gezogen werden können. Das häufigste Nebenprodukt sind Typ 0 Produkte (Monolink), bei denen nur eine Seite des Cross-Linking Reagenz mit dem Peptid reagiert hat. Da hierbei keine Peptide verknüpft werden, ergeben sich keine Informationen über Interaktionsstellen in einem Protein oder Komplex. Ob eine Aminosäure einen Monolink trägt, kann jedoch Informationen über die Zugänglichkeit der Aminosäure innerhalb eines Proteins liefern. Ein seltenes Nebenprodukt ist der Typ I Cross-Link (Intra-Link), bei dem das Cross-Linking Reagenz innerhalb eines Peptids an zwei sehr nah beieinanderliegenden Aminosäuren bindet. Dieser Typ Cross-Link kann genauso wie ein Mono-Link höchstens Informationen über die Zugänglichkeit der Aminosäuren im Protein liefern.

Cross-Linking beschränkt sich heute nicht nur auf Protein-Protein-Interaktionen: auch andere Zielmoleküle wie DNA/RNA[56] oder Metaboliten[57,58] können mittels Cross-Linking untersucht werden. Auf diese Methoden wird im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht eingegangen.

1.5.2 Chemisches und Photochemisches Cross-Linking

Heute gibt es eine Vielzahl von Cross-Linking Reagenzien, die verschiedene reaktive Gruppen für unterschiedliche Aminosäureseitenketten haben. Dabei unterscheidet man homo-bifunktionale und hetero-bifunktionale Reagenzien, die sowohl rein chemisch als auch photochemisch reagieren können. Außerdem können Cross-Linking Reagenzien spaltbar sein – chemisch oder über MS-Fragmentierung. Auch kann die Länge des Cross-Linking Reagenz variieren, wodurch Aminosäuren mit verschiedenen Entfernungen im Protein(komplex) verbunden werden können. Zusätzlich können die Reagenzien weitere Eigenschaften wie Isotopen-Label oder Affinitäts-Tags aufweisen. Durch diese Vielfältigkeit können für jede Anwendung passende Cross-Linking Reagenzien ausgewählt werden. Eine ausführliche Zusammenstellung findet sich im Buch *Bioconjugate Techniques* von Greg T. Hermanson[59].

Die einfachste Art von Cross-Linking Reagenzien sind „Zero-Length-Linker“ wie EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminpropyl)-carbodiimide), die als reine Kupplungs-Reagenzien zwischen Carboxyl- und Amin-Gruppen dienen, ohne weitere Atome in die Bindung einzufügen[60]. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit einer Bindung geringer, da nur sehr nah beieinanderliegende funktionelle Gruppen verbunden werden können.

Am häufigsten werden Reagenzien mit Amin-Reaktivität eingesetzt, da Lysin eine der häufigsten Aminosäuren in Proteinen ist[61]. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Imidoester und N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester), die schon über 40 Jahren verwendet werden[62,63]. Ein Nachteil dieser Reagenzien ist ihre hohe Reaktivität gegenüber Wasser – dieses deaktiviert das Reagenz. Der pH-Wert im Reaktionspuffer sollte außerdem zwischen 7 und 9 liegen, um Nebenreaktionen mit Hydroxylen zu verringern[64].

Die bis heute am häufigsten verwendeten Reagenzien sind *Disuccinimidylsuberat* (DSS, Abbildung 1-13) und *Bis(sulfosuccinimidimidyl)suberat* (BS^3, Abbildung 1-14), welches durch zusätzliche Sulfatgruppen wasserlöslich ist. Diese Cross-Linker sind homo-bifunktional reaktiv gegenüber Lysinen und dem N-Terminus. Mit einer Spacer-Länge des Linkers von 11.4 Å und den langen, sehr flexiblen Lysin-Seitenketten (6.5 Å), können in Proteinen viele Cross-Links erzeugt werden.

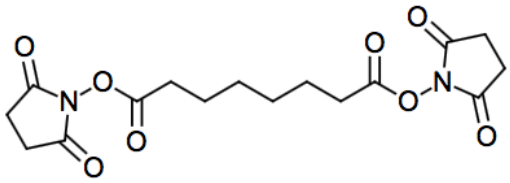

Abbildung 1-13: Strukturformel von DSS (wasserunlöslich, membranpermeabel) (erstellt nach Hermanson[59]).

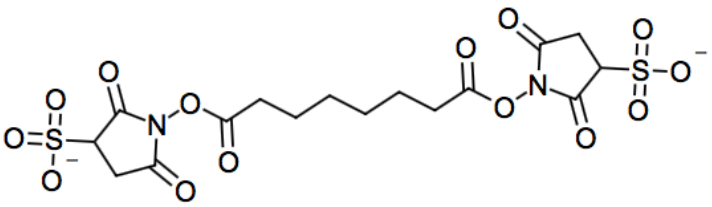

Abbildung 1-14: Strukturformel von BS^3 (wasserlöslich) (erstellt nach Hermanson[59]).

Der Reaktionsmechanismus der NHS-Cross-Linker mit primären Aminen (Lysine und N-Termini) ist in Abbildung 1-15 gezeigt.

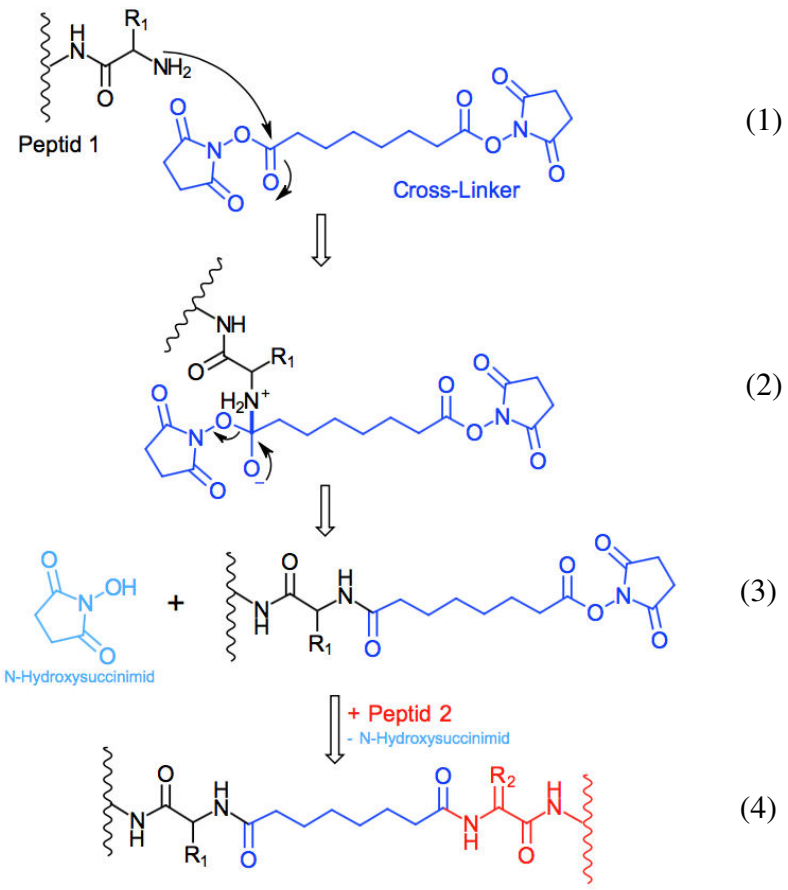

Abbildung 1-15: Reaktionsschema von DSS mit zwei Peptiden. (1) Nucleophiler Angriff des Amin-Elektronenpaars auf die Carbonyl-Gruppe von DSS. (2) Es entsteht eine neue Amid-Bindung unter (3) Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid. (4) Mit dem zweiten Peptid entsteht ein Cross-Link.

Noch reaktiver als die Amin-Gruppe ist aufgrund der höheren Nucleophilität die Thiol-Gruppe von Cysteinen. Allerdings sind Cysteine weniger abundant in Proteinen[61], können zahlreiche Modifikationen tragen (z.B. Palmitoylierung, Prenylierung, S-Nitrierung), bilden untereinander Disulfidbindungen und werden für Experimente aufgrund ihrer Reaktivität häufig irreversibel modifiziert. Deshalb wird Cystein-spezifisches Cross-Linking seltener angewendet. Neben Maleimiden[65] werden hier Methanthiosulfonate[65] und Pyridyldisulfide[59] als Cross-Link Reagenzien eingesetzt. Häufig werden hier hetero-bifunktionale Reagenzien mit Reaktivität gegen Thiol- und Amin-Gruppen verwendet, um die Ausbeute zu erhöhen.

Außerdem gibt es Cross-Linking Reagenzien, die spezifisch für Arginin (1,2-Dicarbonyle), Histidin (Bis-diazonium-Derivate bei pH < 8) und Tyrosin ((Bis-diazonium-Derivate bei pH > 8) sind[59] - diese spielen für Untersuchungen mittels LC-MS aber keine Bedeutung. Auch unspezifische Cross-Linking Reagenzien wie Formaldehyd, das mit primären, sekundären und tertiären Aminen sowie mit Amiden reagieren kann, spielen eine untergeordnete Rolle, obwohl Formaldehyd eine sehr effiziente Fixierung sogar von lebenden Zellen durch Cross-Linking ermöglicht[66].

Neben den oben genannten chemischen Cross-Linking Reagenzien finden auch photoreaktive Reagenzien immer häufiger Anwendung. Diese werden durch UV-Strahlung aktiviert und reagieren dann unspezifisch über Carben- bzw. Nitren-Insertion[59]. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Arylazide, Benzophenone, Antrachinone, Diazo- und Diazirin-Verbindungen[67]. Grundsätzlich werden hier nur hetero-bifunktionale Reagenzien mit Amin-Gruppen-Spezifität auf der einen Seite und unspezifischer Photoreaktivität auf der anderen Seite verwendet. Diazirin-Verbindungen sind dabei eine der neusten Entwicklung: Sie zeichnen sich durch eine sehr hohe Stabilität gegenüber normalem Tageslicht und damit durch eine einfache Handhabung aus[67] (siehe Abbildung 1-16).

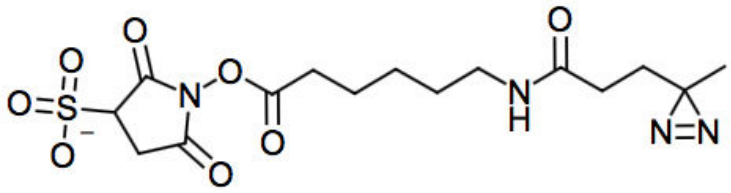

Abbildung 1-16: Sulfosuccinimidyl-6(4,4'-azipentanamido)hexanoat (SDA) (erstellt nach Hermanson[59]).

Eine aufwendigere Anwendung von photoreaktivem Cross-Linking ist die Inkorporation von photoreaktiven Aminosäuren in Proteine *in vivo* durch Kultivierung von Zellen in Photo-Leucin- und Photo-Methionin-haltigem Medium. Dadurch wird *in vivo* Cross-Linking erleichtert[69] und die alle Bereiche eines Proteins – und sogar Membranproteine – werden für Cross-Linking zugänglich[70].

1.5.3 Identifizierung von Cross-Link Peptiden

Die größte Herausforderung beim Cross-Linking stellt die Identifizierung der vernetzten Peptide dar.

Cross-Link Peptide sind über die klassischen Suchalgorithmen (siehe 1.2.6) nicht zugänglich, da diese für die Analyse von linearen Peptiden mit bekannten Modifikationen entwickelt wurden. Bei verlinkten Peptiden finden sich in einem MS/MS-Spektrum die Fragmente von zwei Peptiden (Abbildung 1-17), die durch eine Modifikation - das Cross-Linking Reagenz - verknüpft sind. Zusätzlich sind verlinkte Peptide meistens hochgeladen (+3 oder +4 ist üblich), wodurch im Fragmentionenspektrum auch verschiedene, mehrfach geladene Fragmente entstehen. Zum Vergleich: Lineare Peptide haben oft die Ladung +2 und zerfallen durch die Fragmentierung lediglich in einfach geladene Fragmente. Daher wurden einige Programme entwickelt, die diese speziellen Eigenschaften der Cross-Link Peptide berücksichtigen[71].

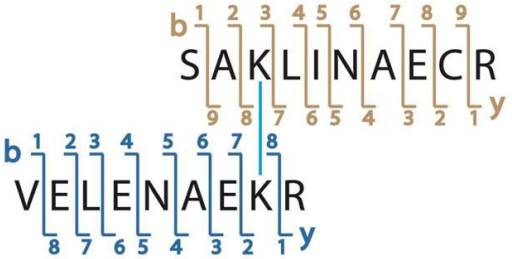

Abbildung 1-17: CID-Ionenserien eines Cross-Link Peptids (braun = b-Ionen, blau = y-Ionen).

Zusätzlich wurden einige Methoden entwickelt, um die Identifizierung von Cross-Link Peptiden zu vereinfachen. Eine sehr einfache Möglichkeit ist der Vergleich der Spektren einer Cross-Link Probe mit den Spektren einer unbehandelten Kontroll-Probe. Alle Peaks, die nur in der Cross-Linking Probe auftauchen, werden als mögliche Cross-Links gewertet[72]. Da die Cross-Linking Reaktion aber auch Nebenprodukte liefert, werden hier viele unspezifische Treffer ausgewählt.

Eine weitere Vereinfachung ist die Verwendung von Isotopen-markierten Cross-Linking Reagenzien, da diese im Spektrum ein typisches Peak-Muster erzeugen (siehe Abbildung 1-18 für ein dreifachgeladenes Peptid). Einige Suchprogramme durchsuchen Peptidspektren speziell nach diesem Muster, um potenzielle Cross-Links zu identifizieren[73,74]. Allerdings verursachen auch Mono- und Inter-Links dieses Isotopen-Muster und werden automatisch in die Suche miteinbezogen. Aber selbst wenn ein Suchprogramm gewählt wird, das nicht gezielt nach Isotopenmustern sucht, können diese trotzdem der manuellen Validierung der gefundenen Treffer dienen. Cross-Link Peptide aus zwei tryptischen Peptiden sind üblicherweise 3- oder 4-fach geladen und weisen bei einem Cross-Linking Reagenz mit 4 Da Massendifferenz ein Isotopenmuster mit 1,33 bzw. 1,00 m/z auf (siehe Abbildung 1-18).

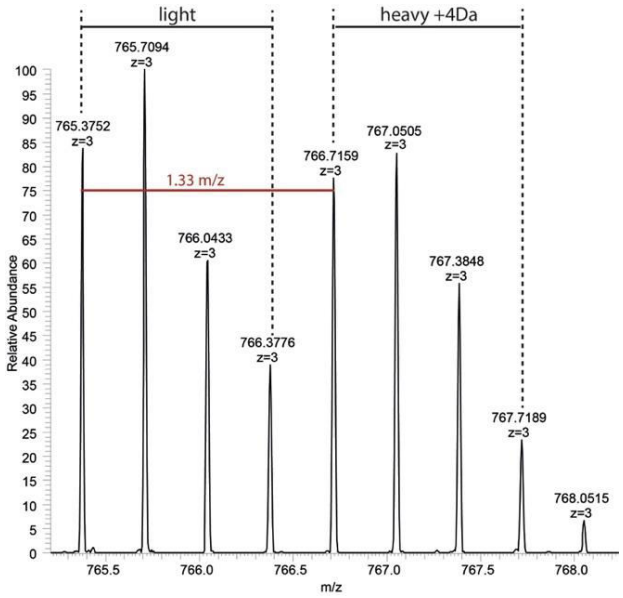

Abbildung 1-18: Typisches Isotopenmuster, das ein Cross-Linking Reagenz mit 4 Da Massendifferenz erzeugt. Bei einem dreifach geladenen Peptid haben die Peaks einen Abstand von 1,33 m/z.

Es können auch spezielle Cross-Linking Reagenzien verwendet werden, die bei der Fragmentierung im Massenspektrometer ein spezifisches Reporter-Ion (PIR, protein interaction reporter[75]) freisetzen. Nur Spektren, die dieses Reporter-Ion beinhalten, werden dann weiter berücksichtig. Nachteilig ist hier, dass ein spezielle Cross-Linking Reagenz verwendet werden muss und so die Flexibilität bei der Experiment-Gestaltung eingeschränkt wird.

Da üblicherweise die involvierten Proteine bekannt sind, wird meistens der gleiche Ansatz wie bei linearen Peptiden verwendet: Das Suchprogramm berechnet die Fragmentionenspektren aller möglichen Kombinationen von verlinkten Peptiden (anstatt aller möglichen linearen Peptide) aus der eingespeisten Datenbank und vergleicht die theoretischen mit den gemessenen Spektren – unter Berücksichtigung der verwendeten Proteasen und des Cross-Linking Reagenz. Somit unterscheiden sich die meisten Programme von klassischen Suchmaschinen nur dadurch, dass Spektren verknüpfter Peptide identifiziert werden können. Die größte Limitation ist hierbei heute die Größe der Proteindatenbank, die das Programm bewältigen kann.

Die zurzeit am häufigsten verwendeten Suchprogramme sind pLink[76], StavroX[77] und xQuest[78].

StavroX berechnet zur Datenauswertung alle möglichen Peptide, die durch die Datenbank, die definierten Modifikationen und proteolytischen Schnittstellen gegeben sind. Daraus werden unter Berücksichtigung der Cross-Linker-Spezifität alle potenziellen Cross-Link Peptide berechnet. Diese möglichen Peptide werden mit den Precursor-Massen aus den gemessenen MS-Spektren verglichen – jeder Treffer ist ein Cross-Link-Kandidat. Diese Kandidaten werden weiter analysiert: StavroX berechnet alle Fragmentionen und vergleicht diese mit dem MS/MS-Spektrum des Cross-Link-Kandidaten, wobei auch Neutralverluste von Wasser und Ammoniak einbezogen werden. Aus dem Grad der Übereinstimmung der theoretischen und gemessenen MS/MS-Spektren wird ein Score für jeden Treffer berechnet. Der Score ist von der Anzahl der identifizierten Fragmentionen und der Anzahl und Länge der Ionenserien abhängig[77].

xQuest durchsucht die MS-Daten zunächst nach Isotopenpaaren, die durch die Verwendung von isotopenmarkierten Cross-Linkern wie BS^3-$d_{0/4}$ entstehen. Die dazugehörigen MS^2-Spektren werden dann ebenfalls nach Isotopenpaaren durchsucht. Die Fragmentionen werden anschließend in zwei Kategorien eingeteilt: „Common“ für Fragmentionen ohne Isotopenpaarung, die durch Peptid-Fragmente ohne Cross-Linker entstehen und „Cross-Link“ für Fragmentionen mit Isotopenpaarung aus Peptidfragmenten, die durch einen Cross-Link verbunden sind. Diese Vorsortierung erlaubt die Reduzierung der zu durchsuchenden Spektren. xQuest bietet zwei Suchmodi für Datenbanken bis 100 Proteinen (*enumeration mode*) und über 100 Proteine (*ion-tag mode*). Im *enumeration mode* werden wie bei StavroX alle möglichen Cross-Link Peptide berechnet und mit den MS-Daten verglichen. Für größere

Datenbanken wird der *ion-tag mode* verwendet, bei welchem zuerst nach Cross-Link Kandidaten in den gemessenen Spektren gesucht wird, bevor aus diesen die theoretischen Cross-Links berechnet werden. Die Bewertung der Treffer erfolgt über einen Score, der auch hier von der Anzahl der übereinstimmenden theoretischen und gemessenen Fragmentionen abhängt[78].

Ähnlich zu xQuest gibt es auch bei pLink eine Vorsortierung der Fragmentionen der gemessenen Spektren: Hauptpeaks (monoisotopisch), Isotopenpeaks der Hauptpeaks, Peaks aus Neutralverlusten von Ammoniak und Wasser, Precursor-Ionen und Rauschen. Alle Peaks außer den Hauptpeaks werden entfernt und nicht für die Suche verwendet. Abhängig von der Datenbankgröße (weniger/mehr als 100 Proteine) hat pLink genau wie xQuest zwei Suchmodi, die wie bei xQuest funktionieren: *combinatorial mode* für kleine Datenbanken (< 100 Proteine) mit allen theoretischen Cross-Link-Peptiden und *open search mode* für große Datenbanken (> 100 Proteine) mit einer vorangestellten Suche von Peptid-Kandidaten zur Berechnung aller theoretischen Cross-Links. Der gegebene Score hängt auch hier von der Übereistimmung der theoretischen und gemessenen Fragmentionenspektren ab. Im Gegensatz zu xQuest sucht pLink nicht gezielt nach Isotopenmustern in den Spektren, sondern sucht die leicht und schwere Variante des Cross-Linking-Reagenz als unabhängige Modifikationen[76].

1.5.1 Anreicherung von Cross-Link Peptiden

Cross-Link Peptide sind verglichen mit linearen Peptiden relativ gering abundant, wodurch die Identifizierung erschwert wird. Daher ist es erstrebenswert die besonderen Eigenschaften wie Größe und Ladung von Cross-Link Peptiden zu nutzen, um diese vom Gros der linearen Peptide abzutrennen.

Eine Möglichkeit ist die eindimensionale Größenausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) von Cross-Link Peptiden. Da zwei miteinander verbundene Peptide generell größer sind als lineare Peptide, können diese mit SEC voneinander getrennt werden. 2012 von Leitner et al. vorgestellt[79], wird diese Anreicherungsmethode heute häufig eingesetzt[80,81]. Vorteilhaft ist hier die universelle Einsetzbarkeit, da die Methode unabhängig vom Cross-Linking Reagenz ist.

Eine weitere Möglichkeit ist die eindimensionale Ionenaustauschchromatographie (SCX), da Cross-Link Peptide, bedingt durch die Verknüpfung zweier Peptide, die doppelte Ladung im Vergleich zu linearen Peptiden aufweisen. Tryptische, lineare Peptide haben bei niedrigem pH-Wert oft zwei Ladungen (am N-Terminus und an der Seitenkette des C-terminalen Lysins/Arginins). Bei verlinkten Peptiden treten diese Ladungen auch auf, wodurch sich vier Ladungen ergeben. Über SCX-Chromatographie lassen sich diese verschieden geladenen Peptide leicht voneinander trennen. Fritzsche et al.[82] betonten schon 2011 das Potenzial von SCX-Anreicherung und stellten heraus, dass noch viel Raum für Verbesserungen gegeben ist.

Eine Weiterentwicklung der eindimensionalen SCX-Anreichung ist das Konzept von Buncherd et al.[83], das diagonale SCX-Chromatographie zur Anreicherung verwendet. Dabei werden die Cross-Link-Peptide in der ersten SCX-Dimension von den niedrig geladenen, linearen Peptiden abgetrennt. Um die Abtrennung von hochgeladenen linearen Peptiden zu verbessern, werden die Cross-Link Peptide anschließend chemisch gespalten und erneut mittels SCX-Chromatographie aufgetrennt: die jetzt linearen Cross-Link Peptide werden in frühere Fraktionen mit niedriger Ladung verschoben während die zuvor coeluierten, hochgeladenen linearen Peptide in den späteren Fraktionen verbleiben. Nachteilig sind bei diesem Konzept die zwingende Verwendung eines speziellen Cross-Linkers und die erschwerte Zuordnung der Peptide zu den Cross-Links durch das Aufspalten vor der zweiten Dimension.

Andere Ansätze verwenden spezielle Cross-Linking Reagenzien, die über bestimmte chemische Gruppen angereichert werden können. Dabei wurden bisher zum Beispiel Biotin-Tags[84,85,86] und Azido-Gruppen[87] verwendet. Hier ist ebenfalls nachteilig, dass spezielle Cross-Linker zum Einsatz kommen müssen, was die Flexibilität bei der Versuchsplanung einschränkt.

2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die systematische Evaluierung der Analyse von Cross-Links mittels Massenspektrometrie.

Dazu sollte zunächst ein Cross-Linking Protokoll anhand des Modell-Proteins Bovine Serum Albumin (BSA) entwickelt werden, mit welchem anschließend gängige Such-Programme verglichen werden sollten. Daneben sollten zusätzlich verschiedene Cross-Linker mit unterschiedlichen Eigenschaften auf ihre Anwendbarkeit getestet werden. Neben dem klassischen, chemischen Cross-Linking sollte dabei auch das photochemische Cross-Linking untersucht werden. Die Anregung der photochemisch aktiven Komponente, die üblicherweise mit einer UV-Lampe erfolgt, sollte hier durch eine neuartige Photoaktivierung mit sehr kurzen Laserpulsen ersetzt werden. Die verkürzte Bestrahlungsdauer würde sich positiv auf das Probenmaterial und mögliche Nebenreaktionen auswirken.

Das Hauptziel dieser Arbeit lag dann in der Entwicklung einer universellen Anreicherungsmethode für Cross-Link Peptide basierend auf ChaFRADIC, um deren Analyse durch die Massenspektrometrie zu verbessern. Die entwickelte Methode sollte insofern universell sein, dass die Anreicherung unabhängig vom verwendeten Cross-Linking Reagenz anwendbar ist. Eine Anreicherung mittels SCX-Chromatographie, wie sie bei ChaFRADIC verwendet wird, war sehr vielversprechend, da Cross-Link Peptide eine höhere Ladung aufweisen als nicht-verlinkte Peptide. Dabei sollten verschiedene Ansätze evaluiert und miteinander verglichen werden.

Abschließend sollte eine Möglichkeit zur Entwicklung eines Peptid-Standards für Cross-Link Peptide untersucht werden. Dabei sollten spezielle Peptide verwendete werden, die über einen Zwischenschritt zu Cross-Link Peptiden verdaut werden können. Die effiziente Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden wäre für die Überprüfung von Suchalgorithmen, die Kontrolle von Anreicherungsschritten und zur Untersuchung von optimalen Messbedingungen sehr hilfreich.

Neben der Methodenentwicklung für die Anreicherung von Cross-Links sollten zur Demonstration der Anwendbarkeit von Cross-Linking und Massenspektrometrie auch andere Proteine und Proteinkomplexe untersucht werden, um neue strukturelle Informationen über diese Proteine zu erhalten.

3 Methoden

Informationen zu den verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräten und Computerprogrammen befinden sich im Anhang (Kapitel 8.1 – 8.5).

3.1 Protein-Cross-Linking

3.1.1 Cross-Linking Reaktion

Chemisches Cross-Linking

Für die Cross-Linking-Reaktion wurde das zu untersuchende Protein unmittelbar vor der Reaktion in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4 eingestellt mit 5 M NaOH) mit einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst. Das Cross-Linking-Reagenz, gelöst in DMSO (5-25 mM), wurde je nach Anwendung und Protein in einem 10- bis 100-fachen molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben und durch invertieren gemischt. Die Zugabe von DMSO wurde dabei so gering wie möglich gehalten, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Die Mischung wurde bei 37 °C und 300 rpm im ThermoMixer für 30 min inkubiert. Danach wurde die Cross-Linking-Reaktion für 10 min mit dem 10-fachen molaren Überschuss von Ammoniumhydrogencarbonat (ABC) zum Cross-Linking-Reagenz inkubiert und gestoppt.

Zum Beispiel wurde für das Cross-Linking von BSA dieses mit 1 µg/µL in HEPES (20 mM, pH 7,4) gelöst und BS^3-$d_{0/4}$ wurde mit 25 mM in DMSO gelöst. 500 µL der BSA-Lösung (entspricht 500 µg bzw. 7,75 nmol BSA) wurden mit 10-fachem Überschuss von BS^3-$d_{0/4}$ (77,5 nmol bzw. 3,1 µL aus 25 mM) wie oben beschrieben gemischt und inkubiert.

Photoreaktives Cross-Linking

Für die Verwendung von photoreaktiven Cross-Linking Reagenzien ist ein zweistufiges Protokoll notwendig, da die Reagenzien zwei verschiedene Reaktionsspezifitäten haben. Zunächst reagiert der NHS-Ester mit den freien Aminen der Proteine. Anschließend müssen die Reagenz-Moleküle, die nicht an das Protein gebunden haben, entfernt werden, da diese sonst bei der UV-Aktivierung über die Diazirin-Seite an das Protein binden und eine große Anzahl unerwünschter Mono-Links erzeugen können.

Die Durchführung folgte dem klassischen Cross-Linking-Ablauf: die zu untersuchenden Proteine wurden direkt vor dem Versuch in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) gelöst (1 mg/mL). Das Cross-Linking-Reagenz Sulfosuccinimidyl-6(4,4‘-azipentanamido)hexanoat (SDA) wurde gelöst in DMSO in 10- bis 100-fachem molaren Überschuss zugegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert (300 rpm im Thermomixer). Auch hier wurde die DMSO-Zugabe so gering wie möglich gehalten, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern.

Für einige Versuche wurden hier synthetische Peptide anstelle von Proteinen verwendet. Diese wurden ebenfalls in 20 mM HEPES (pH 7,4) gelöst. SDA in DMSO wurde in 1- bis 10-

fachem Überschuss zugegeben und bei 37 °C für 30 min in Thermomixer bei 300 rpm inkubiert.

Anschließend wurde überschüssiges Cross-Linking Reagenz durch Zeba Spin Desalting Columns (MWCO 7 kDa) entfernt. Diese Säulen funktionieren nach dem Größenausschluss-Prinzip: Kleine Moleküle, wie Salze oder Reagenzien dringen in die Poren ein, während die großen Proteine die Säule durchlaufen und gereinigt eluiert werden. Der Lagerungspuffer wurde durch Zentrifugation bei 1000x g für 1 min entfernt und verworfen. Danach wurden die Säulchen viermal mit 300 µL Puffer der Reaktionslösung (20 mM HEPES, pH 7,4) konditioniert und abgesättigt (jeweils 1000x g, 1 min), wodurch erreicht wurde, dass die eluierte Proteinlösung wieder in diesem Puffer vorlag. Anschließend wurde die Reaktionslösung (130 µL) aufgetragen und bei 1000x g für 2 min eluiert.

Das überschüssige Reagenz wurde bei den synthetischen Peptiden durch Entsalzen mittels Microcolumns mit C18-Material entfernt (siehe 3.1.5). Die Peptide wurden anschließend wieder in 20 mM HEPES (pH 7,4) oder in Wasser gelöst.

Die so gereinigte Peptid-/Proteinlösung wurde anschließend mit UV-Licht bestrahlt, um die zweite reaktive Seite des Cross-Linking Reagenz reagieren zu lassen. Die optimale Wellenlänge zur Aktivierung von Diazirinen liegt zwischen 330 und 370 nm[70]. Es kam sowohl ein gepulster Laser als auch eine UV-Lampe zum Einsatz.

Für die Laser-Aktivierung der Diazirine wurde ein gepulster Laser mit einer Wellenlänge von 355 nm und einem Durchmesser von 3 mm verwendet. Die Energie eines Laserpulses konnte durch Filter von 2 - 6000 µJ reguliert werden (siehe Abbildung 3-1). Die Proben wurden zur Bestrahlung in eine 96-Well-Platte überführt (25 µL je Well) und mit einer unterschiedlichen Anzahl von Laserpulsen und verschiedenen Energien des Lasers bestrahlt.

Zur Aktivierung der Diazirin-Seite mit einer UV-Lampe wurde eine Lampe mit einer Längenwelle von 365 nm und einer Leistung von 8 Watt verwendet. Bevor Proben bestrahlt wurden, wurde die Lampe für mindestens zwei Stunden angeschaltet und vorgeheizt, um eine stabile UV-Emission zu erreichen. Die zu bestrahlenden Proben wurden in 96-Well Platten überführt (25 µL pro Well) und mittig unter die Lampe geschoben (Abstand 1,5 cm).

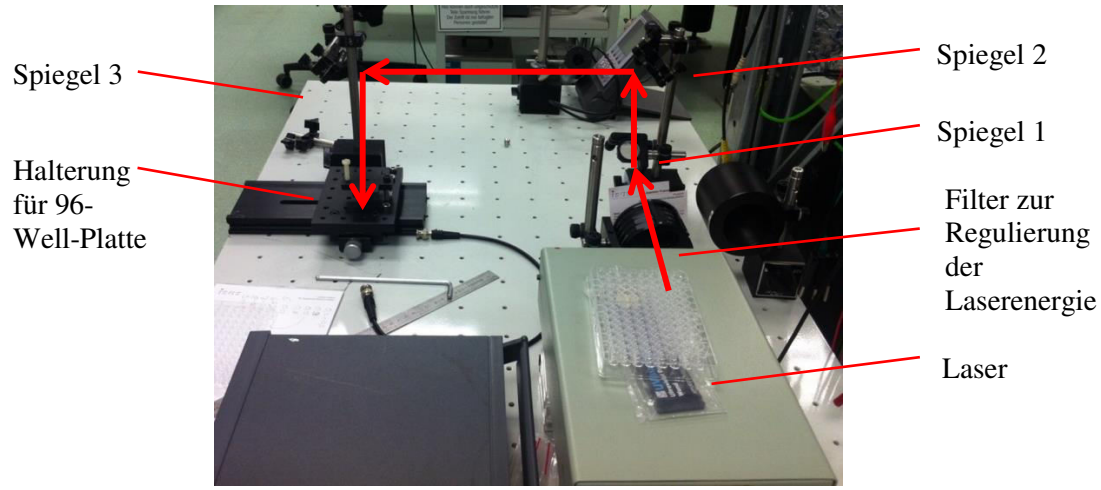

Abbildung 3-1: Aufbau des Lasers zur Bestrahlung von photoreaktiven Cross-Linking Proben mit Verlauf des Laserstrahls (rote Pfeile).

3.1.2 Kontrolle der Cross-Linking Reaktion mit Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Erfolg der Cross-Linking Reaktion wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE[90]) verwendet.

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine vor der Auftrennung durch Aufkochen mit SDS denaturiert. SDS legt sich dabei gleichmäßig um die linearisierten Proteine und belädt diese mit negativer Ladung. Das Gel besteht aus einem Sammelgel, das die Proteine vor der Auftrennung fokussiert, und dem eigentlich Trenngel. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Proteine im Gel nach unten in Richtung Anode. Das Gel hat dabei eine Siebwirkung: kleine Proteine können schneller durch das Gel laufen und legen eine weitere Strecke zurück[4]. Bei der klassischen SDS-PAGE wird ein Tris-Glycin-Puffer-System bei basischem pH-Wert verwendet. Für diese Arbeit kamen Novex® NuPAGE® Bis-Tris/HCl-Gele (4-12%, 12 Probentaschen) von Thermo Fisher Scientific zum Einsatz, die bei neutralem pH-Wert laufen. Im Vergleich zur klassischem SDS-PAGE zeigen diese Gele schärfere Banden und eine verbesserte Auflösung[91]. SDS wird hier mit Lithium-Dodecylsulfat (LDS) ersetzt.

Direkt nach dem Stoppen der Cross-Linking-Reaktion wurde der Lösung 1,5 µg Protein entnommen. Die Proben wurde mit 2,5 µL 4x LDS-Puffer und einem variablen Anteil Wasser gemischt, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µL erreicht wurde. Die Proben wurden dann für 15 min auf 85 °C erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zur Vorbereitung der Laufkammer wurde 1x MOPS-Puffer (50 mL 20x MOPS-Puffer und 950 mL Wasser) hergestellt, welcher in die innere und äußere Kammer gefüllt wurde. Die abgekühlten Proben wurden jeweils in eine separate Probentasche des Gels gefüllt. Mindestens eine Tasche wurde mit 3 µL Proteinmarker (Mark 12™) befüllt, um später das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können.

Das Gel lief bei 4 °C mit einem zweistufigen Spannungsverlauf: Für 20 min wurde eine Spannung von 50 Volt angelegt – hier liefen die Proteine durch das Sammelgel und wurden fokussiert. Danach wurde für mindestens 45 Minuten eine Spannung von 200 Volt angelegt – für die eigentliche Auftrennung der Proteine. Die Laufzeit hing von den jeweiligen Proben ab und betrug zwischen 45 und 70 min. Sobald die blaue Lauffront das Ende des Gels fast erreicht hatte, wurde die Spannung abgestellt und das Gel aus der Laufkammer entnommen.

Um die Proteine zu fixieren, wurde das Gel für eine Stunde mit 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 60 % Wasser inkubiert. Danach wurde das Gel zweimal kurz mit Wasser gewaschen und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Coomassie-Färbung zur Visualisierung von Proteinen in Gelen

Eine Möglichkeit zur Färbung ist die Coomassie-Färbung. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau lagert an basische Seitenketten von Aminosäuren an. Das hier verwendete Protokoll von Kang et al.[92] erlaubt die Detektion ab 1 ng Protein pro Bande. Weitere Vorteile sind das Ersetzen von giftigem Methanol durch Ethanol und die kurze Inkubationszeit: Schon nach zwei Stunden sind erste Banden zu erkennen. Zusätzlich wird mit dieser Coomassie-Färbung der Hintergrund des Gels kaum gefärbt, sodass kein oder nur wenig Entfärben notwendig ist.

Zur Herstellung der Lösung wurden 18,4 g Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat ($Al_2(SO_4)_3$ x 16 H_2O, 0,3 mol) in 60 mL Wasser gelöst. Es wurden 20 mL Ethanol zugefügt und sehr gut gemischt. Anschließend wurden 40 mg Coomassie-Brilliant Blau G-250 in einem Schwung zugegeben. Das Coomassie löst sich nicht komplett und bildet eine kolloidale Suspension. Danach wurden 4 mL Phosphorsäure zugegeben und die Mischung wurde mit Wasser auf 200 mL aufgefüllt. Ein SDS-Gel wurde in 100 mL Lösung für mehrere Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert bis die Banden deutlich zu erkennen waren.

Zum Entfärben, falls nötig, wurde das Gel in 8 % Essigsäure inkubiert.

3.1.3 Enzymatischer Verdau

Für den enzymatischen Verdau wurden die Protein-Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 4 M Guanidin-Hydrochlorid (GuHCl) gelöst. GuHCl unterstützt als chaotropes Reagenz die Denaturierung der Proteine und damit die Zugänglichkeit für die Protease. Die Protein-Lösung wurde anschließend mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) für 30 min bei 56 °C inkubiert, um Cysteine (u.a. Disulfidbrücken) zu reduzieren und das Protein weiter zu entfalten. Um zu verhindern, dass sich die Disulfid-Brücken wieder schließen, wurden die reduzierten Cysteine mit Iodoacetamid (IAA) alkyliert (20 mM IAA für 30 min, Raumtemperatur, im Dunkeln).

Danach wurde die Lösung mit entsprechendem Verdaupuffer (siehe Tabelle 3-1) auf eine finale Konzentration von 0,2 M GuHCl verdünnt, da eine zu hohe Konzentration von GuHCl die Aktivität der Proteasen vermindert.

Anschließend wurde die Protease im Verhältnis 1:20 (Protease/Protein, w/w) zugegeben und je nach Protease mit unterschiedlichen Bedingungen inkubiert (siehe Tabelle 3-1). Der Verdau wurde durch die Zugabe von TFA (finale Konzentration 1 %) gestoppt.

Tabelle 3-1: Übersicht der Konditionen des proteolytischen Verdaus mit verschiedenen Proteasen.

Protease	Puffer	Zeit	Temperatur
Trypsin	50 mM ABC 1 mM $CaCl_2$ pH 8,0	Über Nacht (16 Stunden)	37 °C
LysC	25 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,5	Über Nacht (16 Stunden)	37 °C
Chymotrypsin	100 mM Tris-HCl 10 mM $CaCl_2$ pH 7,8	Über Nacht (16 Stunden)	25 °C
Subtilisin	50 mM ABC pH 8,0	20 min	56 °C

3.1.4 Kontrolle des enzymatischen Verdaus mit monolithischer Umkehrphasen-Säule

Zur Kontrolle der Effizienz des proteolytischen Verdaus wurde 1 µg jeder Probe nach Verdau mit einer monolithischen Säule aufgetrennt. Durch ihre speziellen Eigenschaften sind monolithische Säulen ideal, um den Verdau von Proteinen auf Vollständigkeit und Reproduzierbarkeit mit wenig Probenmaterial (≤ 1 µg) in kurzer Zeit zu prüfen. In Abbildung 3-2 erkennt man den Unterschied zwischen einer nicht-verdauten (Protein, blau) und einer erfolgreich verdauten Probe (Peptide, rot).

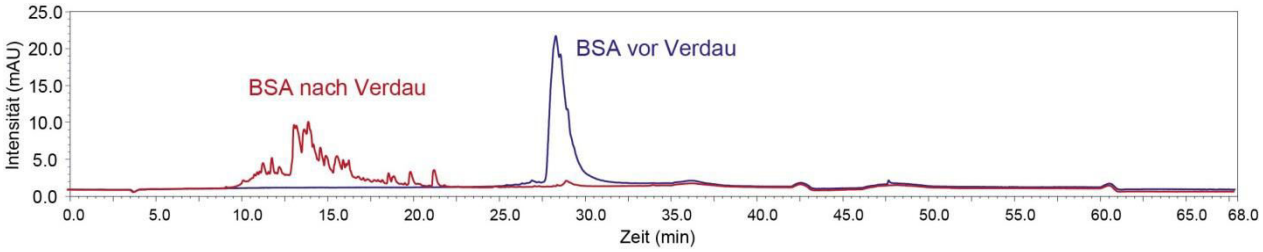

Abbildung 3-2: Schematische Abbildung einer Verdau-Kontrolle eines Proteins mit einer monolithischen Säule. Das blaue Chromatogramm zeigt nicht-verdautes BSA, das rote Chromatogramm verdautes BSA in gleichen Mengen (Gradient siehe unten).

Hier wurden PepSwift-Vorsäulen (200 µm ID, 5 mm) in Kombination mit PepSwift-Hauptsäulen (200 µm ID, 5 cm) in einer NCS-HPLC (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Puffer bestanden aus 0,1 % TFA (A) und 0,08 % TFA/84 % Acetonitril (B). Der Gradient verlief linear von 5 bis 50 % B in 31 min. Da diese Flüssigchromatographie nicht mit einem Massenspektrometer gekoppelt war, wurde TFA anstelle von FA als Ionenpaarreagenz im Puffer verwendet, da TFA eine bessere Trennleistung hat und die Nachteile bei der Ionisierung nicht zum Tragen kommen.

3.1.5 Entsalzen der Peptide mittels Festphasenextraktion

Als finale Probenvorbereitung vor der Messung mittels LC-MS wurden die peptidhaltigen Proben entsalzt, da Bestandteile aus Probenpuffern die Haltbarkeit der chromatographischen Säulen verringern.

Probenmengen bis 20 µg

Für geringe Probenmengen bis 20 µg wurden zum Entsalzen sogenannte Microcolumns aus Pipettenspitzen selbst hergestellt (Abbildung 3-3).

Abbildung 3-3: Schematische Abbildung (links) und Foto (rechts) einer selbst hergestellten C18-Säule zum Entsalzen.

Dazu wurde zunächst aus einer C18-Disk mit einer gelben Pipettenspitze eine Fritte ausgestochen und in eine weitere gelbe Pipettenspitze gedrückt. Anschließend wurde die Pipettenspitze mit C18- bzw. C4-Chromatographie-Partikeln gefüllt (250 µg). Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Zentrifuge bei 1000x g für (2 min) durchgeführt.

Zunächst wurden die Beads mit 50 µL 60 % Acetonitril/0,1 % TFA aktiviert und gewaschen. Anschließend folgte die Konditionierung mit zweimal 50 µL 0,1 % TFA. Die zu entsalzenden Proben wurden mit TFA auf eine finale Konzentration von 1% angesäuert und zweimal auf die Beads geladen (600x g, 5 min). Anschließend wurde die Probe zweimal mit 50 µL 0,1% TFA gewaschen. Danach wurden die Proben zuerst mit 50 µL 60 % Acetonitril/0,1 % TFA und anschließend mit 50 µL 100 % Acetonitril eluiert (600x g, 5 min). Die eluierten Peptide wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Probenmengen bis 400 µg

Für größere Probenmengen bis 400 µg wurden kommerziell erhältliche Entsalzungs-Kartuschen eingesetzt (C18 Spec Tips, Agilent). Diese wurden mit einer Vakuumstation bei einem Unterdruck von 125 mmHg (0.16 bar) verwendet.

Die Beads in der Kartusche wurden zunächst dreimal mit 100 µL 100 % Acetonitril aktiviert und anschließend dreimal mit 100 µL 0.1 % TFA konditioniert. Die Proben, angesäuert auf 1 % TFA, wurden zweimal aufgeladen. Nach dem Waschen der Probe (3x 100 µL 0,1 % TFA) wurden die Peptide mit zuerst mit 100 µL 60 % Acetonitril/0,1 % TFA und danach mit 100 µL 100 % Acetonitril eluiert. Die eluierten Peptide wurden anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

3.2 Isolierung von Proteinen aus HeLa-Zellen

3.2.1 Lyse von HeLa-Zellen

Um für Proben einen komplexen Probenhintergrund zu simulieren, wurden HeLa-Zelllysate verwendet, die nach folgendem Verfahren erhalten wurden.

Dazu wurden Pellets von HeLa-Zellen (1-2 Millionen Zellen, ~ 800 µg Zellen) in 400 µL Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% SDS, complete Mini EDTA free, pH 7.8) aufgenommen und durch abwechselnde Behandlung im Ultraschallbad und mit dem Vortexer lysiert. Danach wurde die Lösung bei 37 °C und 500 rpm mit 150 U Benzonase und 2 mM Magnesiumchlorid im ThermoMixer für 30 min inkubiert, um die DNA der Zellen zu verdauen. Die Protein-Lösung wurde anschließend bei 4 °C mit 18.000x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

3.2.2 Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Lyse von HeLa-Zellen wurde der Bicinchoninsäure-Assay[93] (BCA-Assay) verwendet. BCA reagiert mit einwertigen Kupfer-Ionen zu einem violetten Komplex. Beim BCA-Assay wird eine Lösung aus zweiwertigen Kupfer-Ionen mit einer BCA-Lösung und der Protein-Lösung gemischt. Die Proteine (vor allem Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Peptidbindungen) reduzieren im alkalischen Medium die zweiwertigen Kupfer-Ionen, die erst dann den farbigen Komplex mit BCA bilden können. Je mehr Protein in der Lösung vorliegt, desto dunkler färbt sich die Reaktionslösung. Der BCA-Assay erlaubt die Konzentrationsbestimmung im Bereich von 5-250 µg/mL. Die zu bestimmenden Proben werden innerhalb dieses Bereichs in drei Verdünnungen gemessen und jede Verdünnung wird wiederum dreifach gemessen, um verlässlichere Ergebnisse zu erhalten.

Die Proben (25 µL) wurden wie der Proteinstandard für die Kalibrierkurve (0, 5, 25, 50, 125 und 250 µg/mL Bovines Serum Albumin) in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Die BCA-Lösung, bestehend aus Lösung A (Bicinchoninisäure) und Lösung B (Kupfersulfat), wurde im Verhältnis 1:50 (B/A, v/v) hergestellt und zu den Proben gegeben (200 µL pro Well). Die 96-Well-Platte wurde mit einer selbstklebenden Plastikfolie luftdicht verschlossen und bei 56 °C für 30 min inkubiert.

Nach Abkühlen der 96-Well-Platte auf Raumtemperatur wurde die Farbintensität der entstandenen einwertigen Kupfer-BCA-Komplexe photometrisch bei 570 nm bestimmt.

3.2.3 Ethanol-Fällung zur Entfernung von Detergenzien aus Proteinlösungen

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration der HeLa-Zell-Lysate wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt, um SDS aus den Proben zu entfernen. Das Detergenz SDS bindet an Proteine und zerstört nicht kovalente Bindungen, was der Entfaltung und Denaturierung des Proteins dient. Allerdings ist dies zum einen nicht kompatibel mit dem darauffolgenden enzymatischen Verdau, zum anderen zeigt SDS bei der späteren Ionisierung in der Massenspektrometrie deutlich bessere Eigenschaften als Peptide und wirkt unterdrückend auf die Peptidionisierung. Zusätzlich verändert SDS die Retentionszeit von Peptiden (eluieren später) und schädigt die HPLC-Säulen, wodurch deren Haltbarkeit verringert wird. Aufgrund der guten Löslichkeit von SDS in Ethanol kann die Ethanol-Fällung zum Entfernen von SDS herangezogen werden.

Für die Ethanol-Fällung wurde die Protein-Lösung 10-fach mit eiskaltem Ethanol verdünnt und bei -40 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C und 18.000 g für 30 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Protein-Pellet in einer Vakuumzentrifuge für wenige Minuten getrocknet. Für die weitere Verwendung wurde das Protein-Pellet mit einer Konzentration von 20 µg/µL in 4 M GuHCl gelöst.

3.3 Derivatisierung von freien Aminen für ChaFRADIC-Anreicherung

3.3.1 Phenylacetyl-N-hydroxysuccinimidester

Für diese Derivatisierung wurden die Peptide an freien Aminen von Lysin und N-Termini mit einem Phenylacetyl-Rest modifiziert, welcher anschließend mit dem Enzym Penicillin-Acyclase wieder abgespalten werden kann[94]. Die Peptide wurden in 20 mM HEPES (pH = 7.4) gelöst und mit 15-fachem Überschuss einer Phenylacetyl-N-hydroxysuccinimid-Lösung gemischt. Die Probe wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 60 mM Glycin gestoppt (10 min bei Raumtemperatur). Da bei dieser Reaktion unerwünschte Nebenreaktionen beobachtet wurden, wurden zusätzlich 130 mM Hydroxylamin für 10 min bei Raumtemperatur zugegeben, um unspezifische Reaktionsprodukte mit anderen Aminosäureresten (z. B. Hydroxiden) zu verhindern. Anschließend wurden die Proben mittels Festphasenextraktion entsalzt.

Zur Abspaltung des Phenylacetyl-Restes wurde die Probe in 70 mM Phosphatpuffer (57.8 mM Na_2HPO_4, 29,9 mM NaH_2PO_4, pH = 7,5) gelöst. Penicillin-Acyclase wurde in 10-fachem molarem Überschuss zugegeben. Laut Hersteller handelte es sich um eine Penicillin-Acyclase-Lösung mit 1,25 mg/µL, wobei 1 mg 5-10 U hatte (1 U setzt 1 µmol Substrat pro Minute um). Die nötige Enzym-Menge ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$\frac{1\,\frac{mU}{nmol}\cdot S}{\frac{5\,\frac{mU}{\mu g}}{1.25\,\frac{\mu g}{nL}}} = 0.16\cdot S\,\frac{nl}{nmol}$$

mit der Substratmenge S (= 10-fache Peptidmenge in nmol). Zur Berechnung wurde für die Enzymaktivität der niedrigere Wert von 5 U/mg angenommen.

Nach der Abspaltung wurden die Peptide mittels Festphasenextraktion entsalzt, um das Enzym und Phosphatpuffer zu entfernen.

3.3.2 Boc-Glycin-N-Hydroxysuccinimidester

Um freie Amine von Peptiden mit Boc-Glycin zu modifizieren, wurden die Peptide in 40 % HEPES-Puffer (20 mM, pH 7.4) und 60 % Isopropanol gelöst. In DMSO gelöster Boc-Glycin-N-succinimidester wurde zu einer finalen Konzentration von 20 mM zugegeben und bei 37 °C und 500 rpm für 30 min inkubiert. Die Zugabe wurde einmal wiederholt.

Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde die getrocknete Probe in 20 µL 30 % TFA gelöst und für 30 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Zum Beenden der Abspaltung wurde die Probe mit Wasser auf eine finale TFA-Konzentration von 2 % verdünnt (300 µL final).

3.4 Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden

Die synthetischen Peptide wurde in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) mit einer Konzentration von 0,01 nmol/µL gelöst. Das Cross-Linking-Reagenz wurde in 10-fachem molarem Überschuss zugegeben und für 30 min bei 37 °C und 500 rpm in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 3 pmol der Reaktionslösung ohne weitere Vorbereitung im Massenspektrometer gemessen, um die Reaktion zu überprüfen.

Danach wurden die Peptide in einer Vakuumzentrifuge komplett getrocknet und in 125 µL ABC-Puffer mit 1 mM Calciumchlorid gelöst. Anschließend wurde 0,2 µg Trypsin zugefügt und die Probe wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Verdau wurde mit einer finalen Konzentration von 1 % TFA gestoppt.

3.5 Kationenaustauschchromatographie (SCX)

Für die Kationenaustauschchromatographie wurde ein Puffersystem mit steigender Salz-Konzentration und Ionenstärke verwendet (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Pufferzusammensetzung der SCX-Chromatographie.

Puffer	Zusammensetzung
SCX A	10 mM KH_2PO_4, 20 % Acetonitril, pH 2,7
SCX B	10 mM KH_2PO_4, 250 mM KCl, 20 % Acetonitril, pH 2,7
SCX C	10 mM KH_2PO_4, 600 mM NaCl, 20 % Acetonitril, pH 2,7

Für verschiedene Probenmengen kamen zwei unterschiedliche Säulen mit Polysulfoethyl A-Partikeln (PolyLC INC, Columbia, USA) in U3000-HPLC-Systemen (Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Beschreibung der verwendeten SCX-Säulen.

Säulendimension	verwendete Probenmenge	Partikelgröße/Porengröße	Flussrate
150 x 0,3 mm	14 µg	5 µm/ 200Å	5 µL/min
150 x 1,0 mm	300 µg	5 µm/ 200Å	80 µL/min

Es wurden lineare Gradienten folgender Zusammensetzung verwendet (Tabelle 3-4):

Tabelle 3-4: Beschreibung der SCX-Gradienten für die kleine (links) und große (rechts) SCX-Säule.

150 x 0.3 mm (kleine Säule)		150 x 1.0 mm (große Säule)	
Zeit (min)	Pufferzusammensetzung	Zeit (min)	Pufferzusammensetzung
0-15	100 % SCX A	0-10	100 % SCX A
15-25	linear auf 15 % SCX B	10-19.3	linear auf 15 % SCX B
25-35	15 % SCX B	19.3-28	15 % SCX B
35-45	linear auf 30 % SCX B	28-36	linear auf 30 % SCX B
45-55	30 % SCX B	36-47	30 % SCX B
55-56	linear auf 100 % SCX B	47-52	linear auf 100 % SCX B
56-65	100 % SCX B	52-57	100 % SCX B
65-74	100 % SCX C	57-62	100 % SCX C
74-105	100 % SCX A	62-86	100 % SCX A

3.6 Größenausschluss-Chromatographie

Für die Größenausschluss-Chromatographie wurden PD SpinTrap G-25-Säulen von GE Healthcare verwendet. Die Säulchen enthalten ein Sephadex G-25-Medium, welches einen molekularen Ausschluss von 5 kDa hat: Moleküle über 5 kDa können nicht in die Poren eindringen und werden sofort eluiert. Kleinere Moleküle dringen in die Poren ein und werden später eluiert.

Vor der Verwendung wurde das Sephadex-Material in den Säulchen durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden der untere Verschluss und der Deckel entfernt. Durch Zentrifugation (1 min, 800 x g) wurde die Lösung zur Lagerung entfernt. Anschließend wurde das Säulchen fünf Mal mit 400 µL 0,1 % TFA äquilibriert (1 min, 800 x g). Die Probe, gelöst in 180 µL 0,1 % TFA, wurde auf das Sephadex-Material aufgetragen. Laut Herstellerangaben ist ein Elutionsschritt bei 800 x g für 1 min vorgesehen – um eine Fraktionierung zu erreichen, wurde allerdings ein neues Elutionsschema entwickelt: 15 Sekunden mit 50x g und anschließend jeweils 30 Sekunden bei 100x, 200x, 300x, 400x, 500x und 600x g. Zum Schluss erfolgte eine Elution mit 800x g für 1 min. Jeder Elutionsschritt wurde in einem neuen Eppendorfgefäß aufgefangen.

Die Proben wurden ohne weitere Vorbereitung für die nächsten Schritte verwendet, da durch die Größenausschluss-Chromatographie auch Salze entfernt wurden.

3.7 Umkehrphasen-Flüssigchromatographie

Die Umkehrphasen-Flüssigchromatographie wurde mit NCS-HPLC-Systemen von Thermo Fisher Scientific durchgeführt.

Dabei kamen Acclaim PepMap-Vor- (100 µm Innendurchmesser, 2 cm Länge) und Hauptsäulen (75 µm Innendurchmesser, 25 oder 50 cm Länge) zum Einsatz. Das Puffersystem bestand aus 0,1 % FA und 84 % Acetonitril/0,1 % FA. Die Gradienten unterschieden sich abhängig von den gemessenen Proben (Tabelle 3-5). Jeder Gradient hat einen ID-Buchstaben, um im Ergebnisteil übersichtlich auf die verwendete Methode verweisen zu können.

Tabelle 3-5: Beschreibung der verwendeten Gradienten für die Umkehrphasen-Flüssigchromatographie, ID = Identifizierungsbuchstabe.

ID	Gradient	Zeit
A	3-40 % B	60 min
B	3-50 % B	35 min
C	3-45 % B	100 min
D	3-42 % B	20 min

3.8 MS-Methoden

Die verwendeten MS-Methoden sind in Tabelle 3-6 wiedergegeben. Jeder Gradient hat eine ID-Nummer, um im Ergebnisteil übersichtlich auf die verwendete Methode verweisen zu können.

Wurden MS/MS-Spektren für die Identifizierung von Cross-Link Peptiden aufgenommen, wurden nur Peptide mit Ladungszuständen $\geq +3$ fragmentiert, um lineare Peptide mit Ladungszustand +2 auszuschließen. Sollten auch lineare Peptide identifiziert werden, wurden Ladungszustände ab +1 oder +2 fragmentiert.

Tabelle 3-6: Beschreibung der verwendeten MS-Methoden für Orbitrap XL, Orbitrap Velos Pro und Orbitrap Elite. IT = Ionenfalle, OT = Orbitrap, ID = Identifizierungsnummer.

Massenspektrometer	**Orbitrap XL**	**Orbitrap Velos Pro oder Elite**	**Orbitrap Velos Pro oder Elite**	**Orbitrap Elite**	**Orbitrap Elite**
ID	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Fragmentierung	CID	CID	CID	HCD	CID
TOP N Fragmentierung	5	10	10	10	10
Ladungszustände für Fragmentierung	+2 bis +7	+2 bis +7	+3 bis +7	+3 bis +7	+3 bis +7
normalisierte Kollisionsenergie	35	35	35	32	35
Auflösung MS1	60 000	60 000	60 000	60 000	60 000
max. Ionenzahl MS1	500 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000
max. Füllzeit MS1 (ms)	100	100	100	100	100
Auflösung MS2	2 000 (IT)	2 000 (IT)	2 000 (IT)	15 000 (OT)	15 000 (OT)
max. Ionenzahl MS2	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
max. Füllzeit MS2 (ms)	100	100	100	100	100

3.9 Datenauswertung

3.9.1 Lineare Peptide

Um lineare, Nicht-Cross-Link Peptide zu identifizieren, wurde Mascot 2.4 (Matrix Science) im Proteom Discoverer (Version 1.3) von Thermo Fisher Scientific verwendet. Hier wurden direkt RAW-Files prozessiert und mit bestehenden Datenbanken analysiert. Für humane Proben wurde eine Datenbank von Uniprot mit dem Humanproteom verwendet (Stand 30.07.2012 mit 20232 Proteinen), für nicht-humane Proben wurde eine Datenbank von Uniprot mit allen Proteinen verwendet (Stand 11.12.2013 mit 541.954 Proteinen).

Für die Suchen mit Mascot im Proteom Discoverer wurden unterschiedliche Massentoleranzen abhängig von der MS-Methode verwendet: CID-Fragmentierung in der Ionenfalle mit 10 ppm Precursor Mass Tolerance und 0,5 Da Fragment Mass Tolerance; HCD-Fragmentierung in der Orbitrap mit 10 ppm Precursor Mass Tolerance und 0,02 Da Fragment Mass Tolerance.
Je nach Probenvorbereitung wurden verschiedene Aminosäuremodifikationen für die Datenbanksuche ausgewählt (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Verwendete Aminosäuremodifikationen für Datenbanksuchen von linearen Peptiden mit Mascot.

Aminosäuremodifikation	Modifizierte Aminosäure	Massendifferenz (Da)
Carbamidomethylierung	Cystein	+ 57,0215
Oxidation	Methionin	+ 15,9994
BS^3-$d_{0/4}$-Monolink	Lysin, N-Terminus	+ 156,0786/160,1038
BS^2G-$d_{0/4}$-Monolinks	Lysin, N-Terminus	+ 114,0317/118,0568
Glycin-Addukt	Lysin, N-Terminus	+ 57,0215
SDA-Monolinks	Lysin, N-Terminus	+ 213,1365

In den Ergebnissen wurden alle Peptide berücksichtigt, die 5 % False Discovery Rate hatten.

3.9.2 Cross-Link Peptide

Für die Datenauswertung der Cross-Link Proben wurden die Programme pLink, StavroX und xQuest verwendet. Für diese Programme wurden die RAW-Dateien der Massenspektrometer mit ProteoWizard[95] in mgf- bzw. mzXML-Dateien umgewandelt. Außerdem wurden FASTA-Dateien, die die zu untersuchenden Proteinsequenzen enthielten, als Datenbank für die Programme zusammengestellt (siehe Anhang 8.16). Für alle drei Suchprogramme wurden die gleichen Einstellungen wie für die Mascot-Suchen vorgenommen: CID-Fragmentierung in der Ionenfalle mit 10 ppm Precursor Mass Tolerance und 0,5 Da Fragment Mass Tolerance; CID- oder HCD-Fragmentierung in der Orbitrap mit 10 ppm Precursor Mass Tolerance und 0,02 Da

Fragment Mass Tolerance. Die verwendeten Cross-Linker sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Tabelle 3-8: Verwendete Cross-Linker mit verknüpften Aminosäuren und der Massendifferenz für die Datenbanksuchen mit pLink, StavroX und xQuest.

Cross-Linker	Modifizierte Aminosäuren	Massendifferenz (Da)
BS^3-$d_{0/4}$	Lysin + N-Terminus	+ 138,0681/142,0932
BS^2G-$d_{0/4}$	Lysin + N-Terminus	+ 96,0211/100,0462
SDA1	Lysin + ACDEFGHIKL	+ 195,1259
SDA2	Lysin + MNPQRSTVWY	+ 195,1259
ATP-Derivat	Cystein + Tyrosin	+ 332,0522

Je nach Experiment wurden auch unterschiedliche Aminosäuremodifikationen für die Suche festgelegt (Tabelle 3-9). Bei allen weiteren Einstellungsmöglichkeiten wurden die ursprünglich definierten Werte beibehalten.

Tabelle 3-9: Verwendete Aminosäuremodifikationen für die Datenbanksuchen von Cross-Links mit pLink, StavroX und xQuest.

Aminosäuremodifikation	Modifizierte Aminosäuren	Massendifferenz (Da)
Carbamidomethylierung	Cystein	+ 57,0215
Oxidation	Methionin	+ 15,9994
Alanin-Addukt	Lysin, N-Terminus	+ 71,0371
Glycin-Addukt	Lysin, N-Terminus	+ 57,0215

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bovines Serum Albumin als Modellprotein

Bovines Serum Albumin wurde als Modellprotein gewählt, da es ein großes monomeres Protein ist, das zahlreiche Lysine enthält und daher viele Cross-Links ausbilden kann. Außerdem ist es sehr gut wasserlöslich, günstig und einfach zu handhaben. Auch in der Literatur wird BSA als gutes Modellprotein erwähnt[96].

4.1.1 Bestimmung des optimalen Reagenz-Protein-Verhältnisses

Zur Bestimmung des optimalen Reagenz-Überschusses wurde BSA mit verschiedenen BS^3-$d_{0/4}$-Konzentrationen inkubiert. Solch ein Vor-Versuch muss für jedes zu untersuchende Protein durchgeführt werden, um die optimale Reagenz-Konzentration zu bestimmen[96]. Verwendet man zu wenig Reagenz, erhält man nur sehr wenige Cross-Links und damit sehr wenige strukturelle Informationen. Verwendet man zu viel Reagenz wird das Protein zu sehr verlinkt – möglicherweise verknüpft man sogar mehrere Proteinmoleküle miteinander, obwohl dies nicht erwünscht ist. Befinden sich innerhalb eines Proteins zu viele Cross-Links, also kovalente Verbindungen, können diese durch den proteolytischen Verdau nicht mehr in einzelne Peptide getrennt werden und das Identifizieren der Cross-Link Peptide in MS-Spektren wird damit unmöglich.

Die SDS-PAGE ist eine optimale Kontrolle für die Überprüfung der Cross-Linking Reaktion auf Protein-Ebene. Im Gel ist erfolgreiches Cross-Linking durch breitere Banden zu erkennen, da das Protein durch die Cross-Links nicht mehr komplett denaturiert wird. Durch die vielen unterschiedlichen Cross-Links, die sich in einem Protein bilden können, haben die Proteinmoleküle keine einheitliche entfaltete Form mehr, sondern bleiben partiell auf unterschiedliche Weise gefaltet – die Banden werden undefinierter. Je mehr Reagenz zugegeben wird, desto deutlicher wird dieser Effekt, da die einzelnen Cross-Links gehäufter auftreten und auch insgesamt mehr Cross-Links entstehen können. Bei Proteinkomplexen ist das erfolgreiche Cross-Linking durch das Verschwinden von Banden von Untereinheiten und dem Auftauchen von neuen Banden mit höherem Molekulargewicht noch eindeutiger zu bewerten.

In Abbildung 4-1 ist der Einfluss der Reagenz-Konzentration auf BSA zu erkennen. Während die Kontrolle ohne Reagenz bei etwa 55 kDa eine scharfe Bande zeigt, werden die Banden mit zunehmender Reagenz-Konzentration breiter und verschmierter. BSA läuft in dieser SDS-PAGE bis 55 kDa anstatt der erwarteten 66 kDa, da in der Probenvorbereitung keine Reduktion der Disulfidbindungen durchgeführt wurde. Dies führt zu einer nicht-vollständigen Entfaltung, da BSA 17 Disulfidbindungen hat. Dadurch erschien es in der SDS-PAGE kleiner als es tatsächlich war. Dies war auch der Grund, dass die Bande schon ohne Cross-Linker Zugabe nicht ganz scharf war.

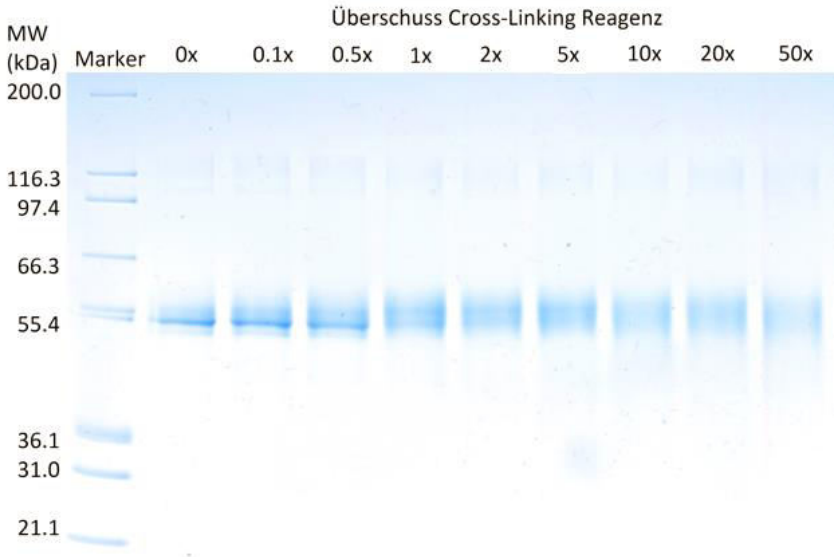

Abbildung 4-1: SDS-PAGE von BSA mit steigendem molaren Überschuss des Cross-Linking Reagenzes BS^3-$d_{0/4}$ mit Coomassie-Blau gefärbt. MW = Molekulargewicht in kDa.

Man erkennt, dass sich ab einem Protein-Reagenz-Verhältnis von 1:1 die Bande verbreiterte und der definierte dunkle Bereich in der Mitte der Bande verschwand. Die Banden mit einfachem, zweifachem und fünffachem Überschuss waren im Gel nicht zu unterscheiden. Erst ab 10-fachem Überschuss des Reagenzes wurden die Banden noch etwas undeutlicher. Der 10-fache Überschuss wurde daher als optimal angesehen, da dies der niedrigste Reagenzüberschuss war, bei dem die Bande sehr breit war. Da beim Cross-Linking eine zu geringe Anzahl von Cross-Links einer zu hohen vorzuziehen ist, wurde nicht der 20- oder 50-fache Überschuss gewählt, um die oben genannten Schwierigkeiten bei der Analyse zu vermeiden.

Generell ist anzumerken, dass die Bewertung der optimalen Reagenz-Kontrolle für monomere Proteine wie BSA schwieriger ist als für Proteinkomplexe, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen. Bei monomeren Proteinen muss die Bewertung der optimalen Reagenzmenge immer im Vergleich mit der Kontrolle ohne Cross-Linking erfolgen. Sobald die entsprechende Bande gleichmäßig verblasst ist, ist davon auszugehen, dass das Protein in gewünschten Maß verlinkt ist.

4.1.2 Vergleich mit anderen Modellproteinen: Hämoglobin

Ein auf den ersten Blick ebenfalls geeignetes Modellprotein ist Hämoglobin. Wie Albumin ist es ein globuläres Protein aus dem Blut, das eine ähnliche Größe von 65 kDa hat. Vorteilhaft erschien außerdem, dass es aus vier fast identischen Untereinheiten (2 α- und 2 β-Untereinheiten) besteht, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Für Hämoglobin wurde ebenfalls eine Titrationsreihe für die Bestimmung des optimalen Überschusses des Cross-Linking Reagenzes durchgeführt.

In Abbildung 4-2 ist zu erkennen, dass Hämoglobin in der SDS-PAGE ohne Cross-Linking Reagenz hauptsächlich in die monomeren Untereinheiten von 16 kDa zerfällt, da zwischen diesen keine kovalente Bindung vorliegt. Die dimere Form aus zwei Untereinheiten bei 31 kDa war nur schwach zu erkennen. Bei geringen Konzentrationen von BS^3-$d_{0/4}$ von 0.1- bis 1-fachem Überschuss war kein Cross-Linking zu beobachten, die Banden veränderten sich nicht. Ab 2- und 5-fachem Überschuss wurde sowohl die Bande des Monomers breiter und undeutlicher, als auch die Bande des Dimers stärker. Zusätzlich wurden die Banden des Trimers (47 kDa) und des Tetramers (65 kDa) erstmalig sichtbar. Dies deutete darauf hin, dass nun ausreichend Reagenz vorhanden war, um alle Untereinheiten miteinander zu verbinden. Der 10-fache Reagenz-Überschuss verdeutlichte dies: Die monomere Bande verschwamm zunehmend, während die Banden von Dimer, Trimer und Tetramer etwas deutlicher und ebenfalls breiter wurden. Auch hier wurde die optimale Reagenz-Konzentration bei einem 10-fachen molaren Überschuss zum Protein festgelegt, da hier gerade genug Reagenz vorhanden war, um die Untereinheiten zu verbinden.

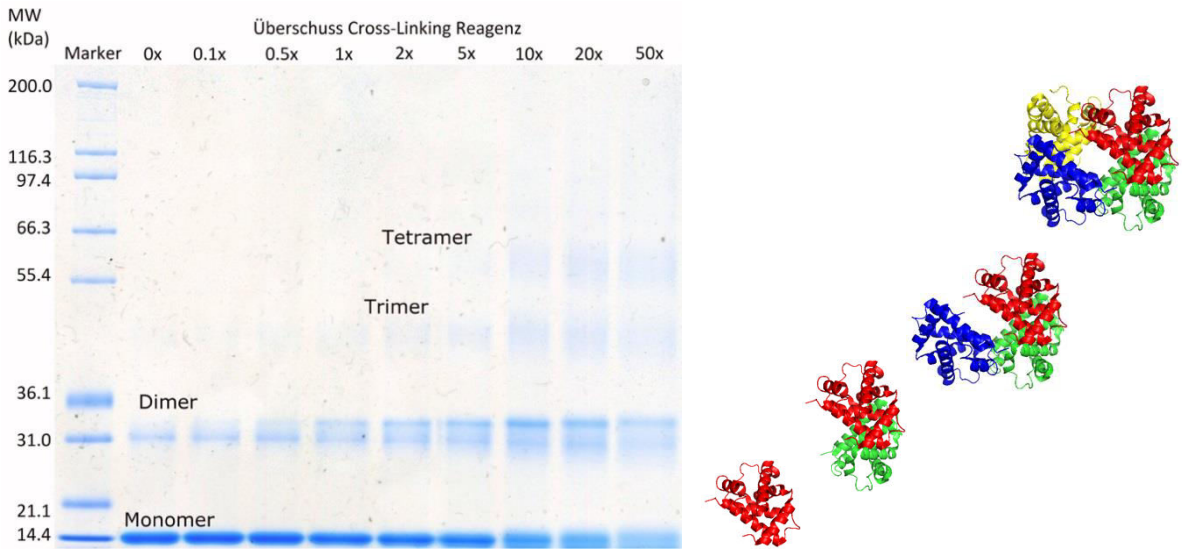

Abbildung 4-2: links: SDS-PAGE von Hämoglobin mit steigendem molaren Überschuss des Cross-Linking Reagenzes BS^3-$d_{0/4}$, mit Coomassie-Blau gefärbt. MW = Molekulargewicht (kDa). Rechts: Struktur von Hämoglobin-Untereinheiten als Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer (rot = α_1, grün = β_2, blau = α_2, gelb = β_2).

Für Hämoglobin war es durch die einzelnen Untereinheiten leichter zu bestimmen, welche Reagenz-Konzentration optimal war. Genau wie bei BSA war ein 10-facher Cross-Linking Reagenz-Überschuss größeren Reagenz-Mengen vorzuziehen. Für die Datenauswertung stellten aber die gleichartigen Untereinheiten in Hämoglobin ein Problem dar. Da in jedem Molekül Hämoglobin zweimal die gleiche Untereinheit vorkommt, ist es in den MS-Ergebnissen unmöglich zu unterscheiden, ob der gefundene Cross-Link innerhalb einer einzelnen oder zwischen zwei identischen Untereinheiten entstanden war. Dies machte Hämoglobin als Modell-Protein ungeeignet, da die Ergebnisse nicht eindeutig waren.

Es gibt generell die Möglichkeit, Proteinkomplexe mit mehreren identischen Untereinheiten für Cross-Linking zugänglich zu machen: Dabei werden beispielsweise vor dem Cross-Linking bei Homodimeren jeweils Untereinheiten mit ^{15}N und mit ^{14}N im 1:1 Verhältnis gemischt[97]. In den MS-Spektren erscheinen Cross-Links zwischen zwei Untereinheiten dann mit einem charakteristischen Isotopenmuster (Triplet/Quadruplet), während Cross-Links innerhalb der Untereinheiten dieses Muster nicht aufweisen. Diese sehr aufwendige Methode ist für ein Modellprotein allerdings zu kosten- und zeitintensiv.

4.2 Optimierung der Analyse von Cross-Link Peptiden mittels LC-MS/MS

4.2.1 Datenauswertung mi pLink, StavroX und xQuest

Für den Vergleich der drei Suchprogramme wurde BSA mit 10x BS^3-$d_{0/4}$ dreimal gemessen (2 pmol mit Orbitrap Velos Pro, ID: A3) und alle mgf-Dateien wurden jeweils mit den Programmen pLink, StavroX und xQuest nach Cross-Link Peptiden durchsucht. Die Programme wurden hinsichtlich der Ergebnisse und der Handhabung beurteilt, um das beste Programm für die folgende Datenauswertung festzulegen. Alle Suchen wurden auf einem Desktop-Computer (Windows 7 Enterprise 64-bit, 4 GB RAM, Intel® Core™ i5-2410M CPU @ 2.30 GHz) ausgeführt.
Eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften der Programme sind in Tabelle 4-1 (S. 51) zusammengefasst. Auf einzelne Punkte wird im Folgenden genauer eingegangen.

StavroX

StavroX[77] (Version 3.6.0) ist ohne Installation über eine ausführbare Datei verwendbar. Es gibt auch eine Webanwendung, die direkt über die Website gestartet wird. Das Programm hat eine einfache Benutzeroberfläche und vor der eigentlichen Suche müssen eine Datenbank mit Proteinsequenzen (FASTA-Datei) und die MS-Daten (mgf-Datei mit Peaklisten von MS/MS-Spektren und den zugehörigen Precursor-m/z und z) geladen sowie die Suche-Optionen eingestellt werden. In StavroX können beliebige Cross-Linking-Reagenzien, dynamische/statische Modifikationen der Peptide und enzymatische Schnittstellen definiert werden. Allerdings kann nicht definiert werden, dass verlinkte Lysine als Schnittstelle für Trypsin blockiert sind: Dadurch tauchen viele Treffer mit dieser fraglichen Schnittstelle auf und machen die Ergebnisse unübersichtlicher. Die Suche dauert für BSA nur wenige Minuten. Die Dateien können nur nacheinander analysiert werden – eine automatische Abfolge muss zunächst programmiert werden.

Die Ergebnisse der Suche werden in StavroX in einer Tabelle mit detaillierten Informationen dargestellt (Abbildung 4-3). Zur weiteren Auswertung müssen die Daten manuell in Excel kopiert werden.

Bei StavroX wird jedes Treffer-Spektrum einzeln einem Cross-Link zugeordnet, was die Ergebnis-Liste unübersichtlich macht, da gleiche Treffer mehrfach an unterschiedlicher Position in der Liste auftauchen. Diese Treffer müssen in Excel anschließend sortiert und zusammengefasst werden.

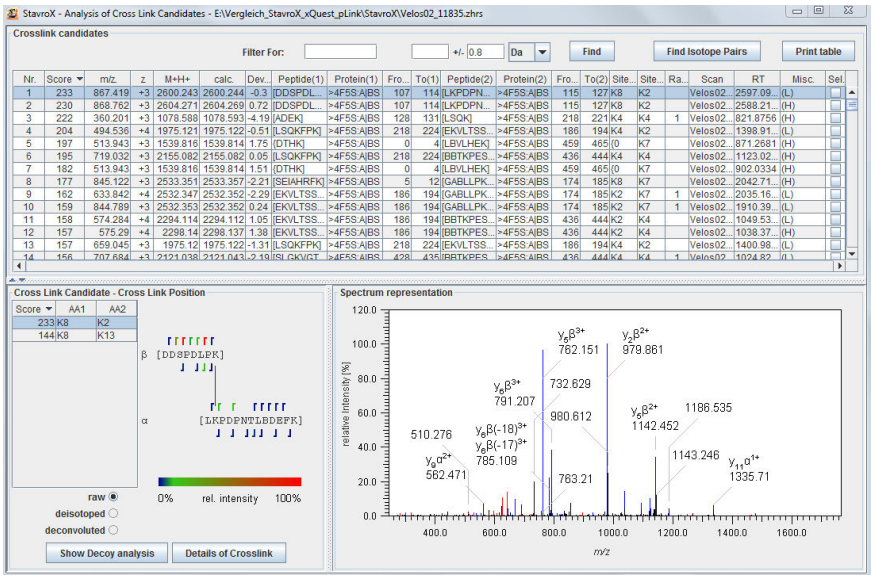

Abbildung 4-3: Ergebnispräsentation von StavroX.

Nach jeder Suche zeigt StavroX eine Decoy-Analyse, die für einen bestimmten FDR-Wert (False Discovery Rate) angibt, ob die Scores der Treffer für einen richtigen oder falschen Treffer sprechen. StavroX sucht dazu die gemessenen MS-Spektren nicht nur gegen die eingespeiste Datenbank, sondern auch gegen eine daraus zufällig generierte Decoy-Datenbank. Treffer in der Decoy-Datenbank sind falsch positiv, da die Proteinsequenz in einer zufälligen Reihenfolge vorliegt. Der festgelegte FDR-Wert gibt an, wie viele falsche Treffer in den Ergebnissen akzeptiert werden. Üblich ist ein Wert von 0.05, was 5 % falsch positiven Treffern entspricht. Dabei wird ein Cut-off Score festgelegt, welcher als Untergrenze für richtige Treffer dient.

Darüber hinaus können in StavroX Detailinformationen für jeden Treffer („Details of Cross-Link“) abgefragt werden. Hier wird das zugehörige Fragment-Spektrum mit den zugeordneten Peaks und deren Intensität gezeigt. Auch werden alle theoretischen Fragment-Peaks berechnet und in einer Tabelle angezeigt.

Tabelle 4-1: Vergleich der drei Programme StavroX, pLink und xQuest zur Suche von Cross-Links.

	StavroX	pLink	xQuest
Website	www.stavrox.de	www.pfind.ict.ac.cn	www.proteomics.ethz.ch
Programmbeschreibung	Version 3.6.0	Version 1.23	Version 2.1.1
Betriebssystem	Windows	Windows	Linux
Webanwendung	möglich	nein	möglich
Registrierung/Lizenz nötig	nein/nein	ja/ja	ja/nein
regelmäßige Updates	ja	selten	nein
Kontaktmöglichkeit für Hilfe	ja	ja	ja
Installation	nicht nötig	einfach	schwierig
Benutzeroberfläche	ja	nein	nein
Bedienbarkeit	einfach	schwierig	sehr schwierig
mehrere Dateien durchsuchen	nein	ja	ja
Suchdauer für BSA-Daten	sehr schnell	sehr schnell	schnell
benötigte Dateien			
MS-Datei-Format	mgf	mgf	mzXML
FASTA-Dateien	forward	forward	forward und decoy
Einstellungsmöglichkeiten			
XL-Reagenzien	beliebig	beliebig	nur vorgegebene
Modifikationen	beliebig	beliebig	begrenzt
Enzyme	beliebig	beliebig	nur vorgegebene
Ergebnis-Präsentation			
gleiche Treffer gruppiert	nein	ja	ja
Ergebnistabelle	Programmfenster	Excel	Excel
Spektren-Anzeige	ja	nein	nein
Scoring System	ja	ja	ja
Cutoff-Werte für Scores	anhand FDR	nein	anhand FDR
Programm sucht nach			
Cross-Links	ja	ja	ja
Monolinks	ja	ja	ja
Intralinks	ja	ja	ja
lineare Peptide	nein	ja	nein

pLink

pLink[76] (Version 1.23) kann nach einer kostenlosen Registrierung und der Zusendung eines Lizenz-Codes installiert werden. Die Lizenz erlischt nach einem Jahr, sodass ein neuer Code angefordert und das Programm neu installiert werden muss. Jede Aktualisierung bedingt ebenfalls eine Neuinstallation.

pLink ist Command-Line basiert und hat keine grafische Benutzeroberfläche (Abbildung 4-4). In einer ini-Datei müssen alle Eckpunkte für die Suche angepasst werden: Speicherort der mgf- und FASTA-Dateien, Art des Cross-Linkers, der Modifikationen und der verwendeten Proteasen. Über weitere Definitions-Dateien können wie bei StavroX beliebige Modifikationen, Proteasen und Cross-Linking Reagenzien hinzugefügt werden.

Über eine ausführbare Datei wird dann die Suche gestartet, die im Command-Line Fenster verfolgt werden kann. Die Suche für BSA dauert nur wenige Minuten.

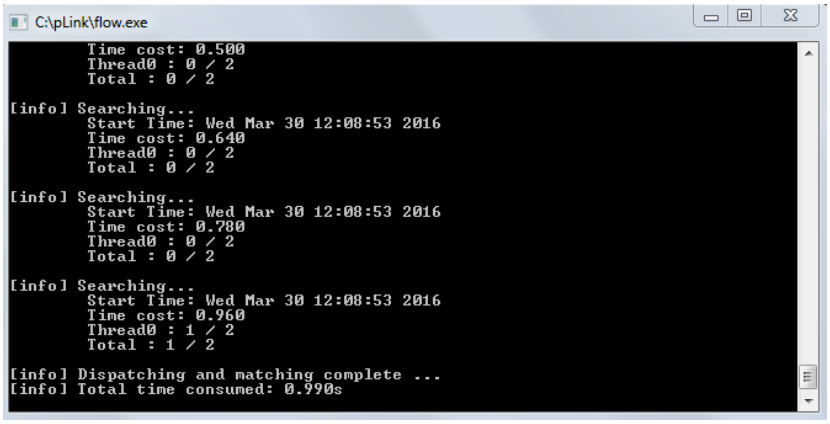

Abbildung 4-4: Command-Line Ansicht während der Suche mit pLink.

Die html-Datei mit den Ergebnissen kann mit einem Browser aufgerufen und in Excel gespeichert werden. Vorteilhaft ist im Vergleich zu StavroX, dass gleiche Treffer direkt gruppiert und zusammengefasst werden.

Für die Bewertung der Treffer wird wie bei StavroX eine Decoy-Datenbank verwendet. Bei pLink erhält man im Vergleich zu StavroX aber keine Angaben über einen empfohlenen Cut-off-Wert für die Treffer-Scores. Bei den Ergebnissen gilt, je kleiner der Score ist, desto sicherer handelt es sich um eine richtige Identifizierung. Einen Cut-off muss der Benutzer selbst festlegen. Auch gibt es keine Visualisierung der Ergebnisse (z. B. Fragmentionenspektren) wie bei StavroX.

xQuest

xQuest[78] (Version 2.1.1) ist wie pLink ein Command-Line basiertes Programm, das allerdings nur auf Linux-Systemen läuft. Es gibt drei Möglichkeiten xQuest zu verwenden: Installation auf einem Linux-System, die Verwendung einer virtuellen Maschine auf einem Windows-System oder eine Web-Anwendung. Die Installation auf einem Linux-System setzt gute Programmierkenntnisse voraus. Die Verwendung einer virtuellen Maschine, die nach Download mittels VMware Player abgespielt wird, ist etwas einfacher, da ein komplettes Linux-System mit vorinstalliertem xQuest simuliert wird. Alle Versionen sind nach der Registrierung aus dem Internet kostenlos ladbar. Am einfachsten ist theoretisch die Verwendung der Web-Anwendung – allerdings wird hier ein spezifisches Format der mgf-Dateien mit bestimmten Kopfzeilen verlangt, das mit üblichen RAW-to-mgf Umwandlungs-Tools nicht kompatibel ist. Außerdem müssen die eigenen Daten dazu auf einem externen Server gespeichert werden und sind eventuell nicht vor fremdem Zugriff geschützt. Für diesen Vergleich wurde die Ausführung einer virtuellen Maschine mit VMware Player gewählt (Abbildung 4-5).

Im Vergleich zu pLink muss der Benutzer bei xQuest die Befehle für die Suche in mehreren Schritten manuell eingeben, was fehleranfälliger ist als die ausführbare Datei bei pLink. Die Suchkriterien werden wie bei pLink in separaten Dateien geändert und gespeichert. Es können keine eigenen Modifikationen, Cross-Linker und Proteasen hinzugefügt werden, wodurch die Nutzung für bestimmte Experimente nicht möglich ist. Außerdem kann nur maximal eine dynamische Modifikation definiert werden. Im Gegensatz zu den anderen Programmen müssen die MS-Daten im mzXML-Format sein, welches aber ebenfalls durch ProteoWizards *msconvert* erzeugt werden kann. Neben der Datenbank im FASTA-Format muss auch eine Decoy-Datenbank vorgelegt werden, die von den anderen beiden Programmen während der Suche automatisch erstellt werden.

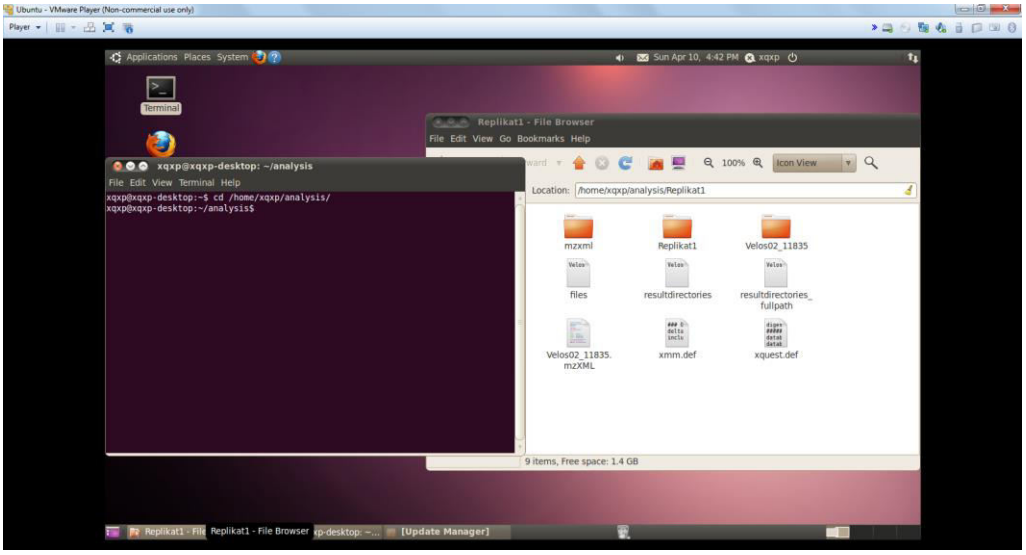

Abbildung 4-5: Ausführung von xQuest in einer Virtuellen Maschine.

Die Suche mit xQuest dauerte für BSA rund 20 min, wobei der Nutzer durch sequenzielles Eingeben der richtigen Befehle die Suche aktiv fortführen muss.

Die Ergebnisse werden wie bei pLink im Browser dargestellt und können als Excel-Datei exportiert werden. Für jeden gefundenen Cross-Link wird nur das beste MS/MS-Spektrum angezeigt, sodass die Ergebnis-Tabelle sehr übersichtlich ist. In der Tabelle werden auch die Treffer aus der Decoy-Suche anzeigt, worüber abgeschätzt werden kann, welche Scores eher für falsche Identifizierungen sprechen.

Ergebnisse

Für den Vergleich der drei Suchprogramme wurden alle gefundenen Treffer manuell überprüft.

Unter Berücksichtigung der Scores, dem Vorhandensein der Isotopenmuster im MS^1-Spektrum und der Massenabweichung (in ppm) wurde ein Treffer bewertet und anschließend akzeptiert oder abgelehnt. Schlechte Scores (im Vergleich zur gesamten Skala von gegebenen Scores), eine hohe Massenabweichung (außerhalb ± 3 ppm) sowie das Fehlen des Isotopenmusters im MS^1-Scan geben Hinweis darauf, einem Spektrum ein falsches Peptid zugeordnet wurde – insbesondere wenn ein Treffer mindestens zwei dieser Merkmale aufwies.

Bei allen Suchprogrammen gab der Score die Übereinstimmung eines theoretisch berechneten Fragmentionenspektrums mit einem real gemessenen Fragmentionenspektrum wieder. Je besser der Score war, desto mehr Fragment-Peaks konnten den theoretisch berechneten Fragmenten zugeordnet werden. Bei der Suche wurde eine Massenabweichung von 10 ppm im MS^1-Scan erlaubt, allerdings waren Treffer mit Werten außerhalb ±3 ppm Abweichung mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht richtig, da die verwendeten Massenspektrometer üblicherweise eine Massenabweichung von unter 3 ppm aufwiesen. Ausnahmen gab es hierbei, da teilweise nicht die monoisotopischen Precursormoleküle fragmentiert wurden und die Suchprogramme dies nicht erkannten. Das fehlende Isotopenmuster deutete darauf hin, dass es sich beim identifizierten Peptid nicht um einen Cross-Link handelte: Bei der Verwendung von BS^3-$d_{0/4}$ im 1:1 Verhältnis würden alle modifizierten Peptide dieses Isotopenmuster aufweisen (Abbildung 1-18, S. 26). Dabei war aber zu beachten, dass durch die schweren Isotope eine minimale Retentionszeitverschiebung auftreten kann.

Zusätzlich wurde verglichen, wie viele PSM (Peptide Spectrum Match) vom jeweiligen Programm einem gefundenen Cross-Link zugeordnet werden konnten und ob es sich jeweils um die gleichen PSM handelte. Je mehr Spektren einem Cross-Link zugeordnet werden konnten, desto höher war die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung korrekt war. Im Gegenzug bedeutete es aber nicht, dass ein Treffer automatisch falsch war, wenn nur wenige PSM vorhanden waren – das betreffende Peptid kann aufgrund geringer Abundanz tatsächlich nur einmal fragmentiert worden sein. Dies kann auch mit der Lage des Cross-Links im Protein zusammenhängen – je schlechter die verlinkten Aminosäuren zugänglich sind, desto weniger Cross-Link Peptide werden ausgebildet.

Abschließend wurden die Abstände der verlinkten Aminosäuren mit pyMol[89] in der 3D-Struktur von BSA (PDB-Eintrag 4F5S) überprüft. Der akzeptierte maximale Abstand von 28,4 Å zwischen den α-Kohlenstoffatomen der Lysine ergab sich aus der Länge der Lysin-Seitenketten (2x 6 Å) und der Länge des Cross-Linkers (BS^3-$d_{0/4}$ 11,4 Å) mit einer Zugabe von 5 Å, da die Lysin-Seitenketten durch ihre Länge bedingt sehr flexibel sind. Durch die hohe Flexibilität der beteiligten Strukturen war es nicht möglich, einen minimalen Abstand zu definieren.

In der Ergebnis-Tabelle sind von pLink alle Treffer, von StavroX alle Treffer, die über dem Cut-off bei 5 % FDR lagen, und von xQuest alle Treffer ohne Decoy-Treffer (mit Hinweis auf den durchschnittlichen Decoy-Score) aufgelistet (Tabelle 4-2, S. 56). Die Peptidsequenzen zu den gefundenen Cross-Links finden sich im Anhang (Tabelle 8-1).

Im ersten Replikat (Replikat 1, Tabelle 4-2, S. 56) zeigten die Ergebnisse von StavroX und xQuest große Übereinstimmung. pLink identifizierte deutlich weniger Cross-Links und unter den Treffern waren zwei falsche Zuordnungen. Die falschen Zuordnungen waren hier aber auch verständlich, da in den Ergebnissen von pLink alle Werte ohne Cut-off anzeigt wurden und die Entscheidung für richtige und falsche Treffer letztlich beim Benutzer lag.

Der Treffer AA524-AA544 von xQuest wies einen relativ niedrigen Score bei einer hohen Massenabweichung auf. Zusätzlich tauchte dieser nur bei den Ergebnissen von xQuest auf und wurde mit nur einem PSM identifiziert. Dieser Treffer wurde daher als unsicher markiert (violett). Beim Vergleich mit den anderen beiden Replikaten zeigte sich allerdings, dass dieser Treffer immer – zum Teil mit sehr guten Scores – von allen Programmen identifiziert wurde. Die hier eher geringe Anzahl identifizierter Spektren deutete auf ein niedrig abundantes Peptid hin.

Tabelle 4-2: Ergebnisse der drei gemessenen Replikate von BSA-BS^3-$d_{0/4}$ analysiert mit pLink, StavroX und xQuest mit Angabe der Scores, des Vorhandenseins des MS^1-Isotopenmusters ($d_{0/4}$) und der Massenabweichung in ppm. Die verlinkten Aminosäuren (Lysin) werden als AA_1 und AA_2 angegeben. Rot markierte Treffer wurden aufgrund von niedrigen Scores, fehlendem Isotopenmuster und/oder zu großen Abständen abgelehnt. Violett markierte Treffer wurden als unsicher eingestuft.

			Replikat 1									Replikat 2									Replikat 3								
			pLink			StavroX			xQuest			pLink			StavroX			xQuest			pLink			StavroX			xQuest		
Cut –off Score			-			91			7.4			-			111			7.2			-			104			5.9		
AA_1	AA_2	Abstand (Å)	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm	Score	$d_{0/4}$	ppm
180	187	11,0	1.72E-04	ja	1.0	162	ja	-0.3	32,69	ja	-1.1	3.67E-05	ja	-0.6	167	ja	0.0	29,94	ja	-1.9	6.62E-05	ja	-0.5	179	ja	0.4	24,87	ja	-1.4
187	221	20,3	3.56E-05	ja	1.0	204	ja	-1.3	39,23	ja	-1.6	7.09E-04	ja	-0.3	171	ja	-1.3	39,57	ja	-1.4	1.75E-04	ja	-1.2	154	ja	-1.2	30,12	ja	-2.1
187	439	18,2	9.78E-07	ja	0.3	158	ja	0.3	32,97	ja	0.1	7.97E-07	ja	0.2	183	ja	0.2	36,57	ja	0.1	8.18E-08	ja	-3.2	155	ja	-0.6	28,88	ja	0.4
221	439	20,5	4.37E-05	ja	0.5	195	ja	-0.5	32,62	ja	-1.5	2.26E-04	ja	0.1	190	ja	-1.0	34,75	ja	-1.7	2.74E-04	ja	0.4	197	ja	-0.9	24,8	ja	-1.3
350	474	18,0	5.14E-06	ja	0.7	109	ja	-1.2	36,05	ja	-1.4	4.98E-08	ja	0.0	135	ja	-0.5	38,19	ja	0.1	1.80E-05	ja	-1.8	-	-	-	29,04	ja	1.1
187	431	13,7	-	-	-	132	ja	-1.4	36,75	ja	-1.2	3.57E-04	ja	0.7	166	ja	-1.1	43,69	ja	-1.1	4.05E-04	ja	-1.6	148	ja	-1.6	29,54	ja	0.5
116	431	21,3	-	-	-	132	ja	-0.3	21,77	ja	-1.2	1.15E-03	ja	-2.4	142	ja	-2.4	47,83	ja	-1.0	3.10E-04	ja	0.0	139	ja	-3.6	-	-	-
431	439	13,5	-	-	-	156	ja	-2.2	35,21	ja	-1.5	3.94E-07	ja	-2.7	166	ja	-2.0	36,74	ja	-1.5	8.28E-05	ja	-0.7	161	ja	-1.5	28,34	ja	-1.2
524	544	14,3	-	-	-	-	-	-	14,44	ja	-3.0	2.43E-04	ja	-0.4	113	ja	-0.4	24,54	ja	-0.9	2.62E-06	ja	4.3	110	ja	-2.2	23,92	ja	3.7
204	350	16,4	-	-	-	99	ja	-1.9	40,69	ja	-2.6	5.43E-03	ja	-2.8	-	-	-	25,31	ja	-1.2	6.97E-03	ja	1.0	-	-	-	-	-	-
1	12	19,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.34E-03	ja	-2.2	-	-	-	-	-	-	1.80E-04	ja	-1.1	-	-	-	-	-	-
221	232	14,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.46E-02	ja	-0.5	-	-	-	-	-	-	3.32E-04	ja	-1.5	-	-	-	-	-	-
136	221	35,1	9.18E-01	x	9.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	275	27,2	1.93E-05	x	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	535	35,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.38E-03	x	-3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	221	36,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.57E-02	x	-3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
396	439	16,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.16E-01	x	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
396	474	32,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.63E-03	ja	8.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
431	537	26,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.17E-02	x	-7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	93	30,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.86E-02	x	-4.1	-	-	-	-	-	-
12	556	65,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.82E-02	x	7.1	-	-	-	-	-	-
136	180	18,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.26E-02	x	-2.4	-	-	-	-	-	-
173	465	41,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.01E-02	x	-4.0	-	-	-	-	-	-
187	280	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.69E-03	ja	-3.5	-	-	-	-	-	-
187	465	25,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,38	x	6.3
204	316	30,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,78	x	-1.5
211	439	29,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,32	x	0.5

Bei der Anzahl der zugeordneten Spektren (Tabelle 4-3, S. 58) hatten xQuest und StavroX die größten Übereinstimmungen, wobei xQuest häufig nochmal deutlich mehr Spektren zuordnen konnte. Da bei xQuest nur der beste PSM angezeigt wurde, konnte nur dieser mit allen PSM von pLink und StavroX verglichen werden. Interessant war hier, dass der beste PSM von xQuest bei den Treffern von pLink überhaupt nicht auftauchte – bei den Ergebnissen von StavroX lag die Übereinstimmung bei fast 100 % (Abbildung 4-6).

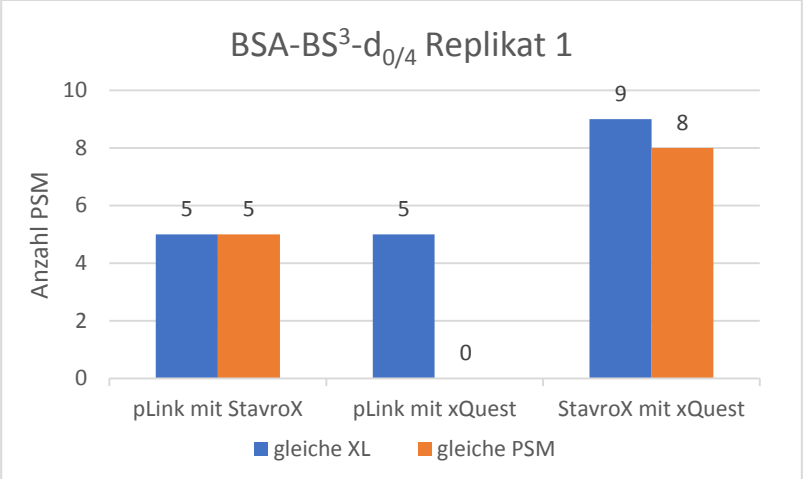

Abbildung 4-6: Übereinstimmung der zugeordneten Spektren (PSM) gleicher Cross-Links von pLink, StavroX und xQuest beim ersten Replikat von BSA-BS^3-d$_{0/4}$. Blau: gleiche XL = gleicher Cross-Link identifiziert; Orange: gleiche PSM = gleiches Fragmentionenspektrum wurde dem gleichen Cross-Link zugeordnet.

Dies bedeutete nun nicht, dass xQuest generell andere Fragmentionenspektren identifizierte: Da xQuest nur den besten PSM angibt, zeigte dies nur, dass die Bewertung der Spektren zwischen den Programmen deutlich unterschiedlich ist. Ob zwischen allen PSM zwischen pLink und xQuest gar keine Übereinstimmung vorlag, konnte durch die fehlende Angabe weiterer PSM von xQuest nicht geprüft werden – allerdings ist es sehr unwahrscheinlich, keine Übereinstimmung zu finden.

Tabelle 4-3: Anzahl zugeordneten Fragmentionenspektren (PSM) zu einem Cross-Link der drei Replikate von BSA-BS^3-d$_{0/4}$ analysiert mit pLink, StavroX und xQuest. gelb = wenige zugeordnete Spektren, dunkelblau = viele zugeordnete Spektren.

			Anzahl PSM			Anzahl PSM			Anzahl PSM		
AA$_1$	AA$_2$	Abstand (Å)	pLink	StavroX	xQuest	pLink	StavroX	xQuest	pLink	StavroX	xQuest
180	187	11,0	2	17	47	12	11	26	12	12	27
187	221	20,3	2	2	2	4	2	2	3	3	2
187	439	18,2	3	4	4	6	4	3	7	3	10
221	439	20,5	1	4	8	7	4	3	3	3	15
350	474	18,0	1	3	2	5	2	3	3		2
187	431	13,7		4	5	4	4	6	5	3	8
116	431	21,3		2	2	2	2	2	1	3	
431	439	13,5		4	5	4	3	2	5	2	7
524	544	14,3			1	3	1	1	5	1	3
204	350	16,4		2	1	2		1	1		
1	12	19,5				1			2		
221	232	14,9				1			2		
136	221	35,1	1								
180	275	27,2	1								
106	535	35,6				1					
131	221	36,0				1					
396	439	16,3				1					
396	474	32,7				1					
431	537	26,1				1					
1	93	30,5							1		
12	556	65,2							1		
136	180	18,4							1		
173	465	41,7							1		
187	280	20,0							1		
187	465	25,7									1
204	316	30,0									1
211	439	29,6									1

Beim zweiten Replikat wurden mit pLink deutlich mehr Treffer als mit den beiden anderen Programmen gefunden (Replikat 2, Tabelle 4-2, S. 56). Entfernte man allerdings die falschen Treffer von pLink, die vor allem durch schlechte Scores (> 1.00E-02), das fehlende Isotopenmuster und hohe Massenabweichungen auffielen, zeigten alle drei Programme beinahe identische Ergebnisse.

Der Treffer AA1-AA12 von pLink hatte einen niedrigen Score mit nur einem PSM. Allerdings fand sich dieser Treffer auch in Replikat 3 in den Ergebnissen von pLink und wurde daher als korrekt angenommen.

Der Treffer AA221-AA232 hingegen wurde nur von pLink in Replikat 2 mit sehr schlechtem Score identifiziert. Da die Zahl der zugeordneten Spektren ebenfalls sehr niedrig ist, wurde dieser Treffer abgelehnt.

Bei der Anzahl der PSM zeigten sich auch hier ähnliche Werte zwischen allen Programmen (Tabelle 4-3, S. 58). Die zugeordneten Spektren waren bei pLink und StavroX wieder die gleichen. Auch bei xQuest waren die besten angegebenen Spektren in dieser Messung bis auf zwei Treffer identisch mit den Treffern von pLink und StavroX (Abbildung 4-7).

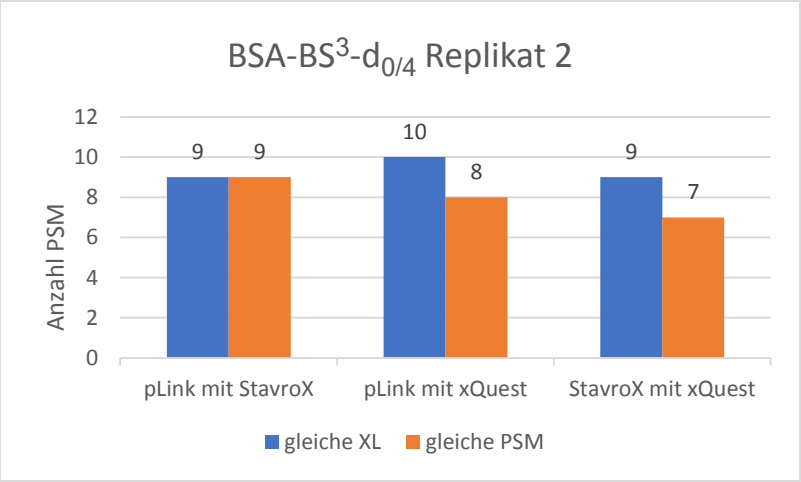

Abbildung 4-7: Übereinstimmung der zugeordneten Spektren (PSM) gleicher Cross-Links von pLink, StavroX und xQuest beim zweiten Replikat von BSA-BS^3-d$_{0/4}$. Blau: gleiche XL = gleicher Cross-Link identifiziert; Orange: gleiche PSM = gleiches Fragmentionenspektrum wurde dem gleichen Cross-Link zugeordnet.

Mit pLink konnten beim dritten Replikat wieder die meisten Cross-Links identifiziert werden – selbst nach Entfernen der falschen Zuordnungen (Replikat 3, Tabelle 4-2, S. 56). Darunter waren allerdings einige Spektren mit relativ schlechten Scores, die von keinem anderen Programm identifiziert wurden.

Der Treffer AA1-AA12 hatte einen relativ guten Score, eine niedrige Massenabweichung und fand sich auch in Replikat 2 von pLink mit zwei Spektren. Vermutlich handelte es sich um einen wahren Treffer mit niedriger Abundanz – daher wurde die Identifizierung akzeptiert. Der Treffer AA136-AA180 hatte ebenfalls einen schlechten Score und wurde nur über einen PSM identifiziert. In keinem der anderen Replikate tauchte dieser Treffer auf, weswegen dieser verworfen wurde. Die Massenabweichung lag hier im akzeptablen Bereich – es überwogen allerdings die Argumente gegen eine richtige Identifizierung.

Der Treffer AA204-AA350 wurde auch in anderen Replikaten von allen Programmen mit akzeptabler Massenabweichung identifiziert. Dabei waren die Scores ebenfalls sehr niedrig, genau wie die Anzahl der zugeordneten Spektren. Aufgrund der Häufigkeit der

Identifizierung war aber anzunehmen, dass es sich um einen korrekten Treffer mit niedriger Abundanz handelte.

Auch in den Ergebnissen von xQuest waren falsche Zuordnungen zu finden, die sich über die niedrigen Scores unterhalb des durchschnittlichen Decoy-Scores leicht ausschließen ließen. Nach Entfernen der falschen Identifizierungen zeigten xQuest und StavroX wieder identische Ergebnisse.

Auch hier war erneut zu sehen, dass der beste PSM eines Cross-Links von xQuest häufig nicht in den Treffer-Listen von pLink und StavroX auftauchten – vor allem wenn xQuest nur wenige PSM hatte. Zwischen pLink und xQuest war die Übereinstimmung erneut sehr groß (Abbildung 4-8). Bei der Anzahl der zugeordneten Spektren stachen die Ergebnisse von xQuest wieder durch deutlich mehr Zuordnungen heraus, während pLink und StavroX wiederum sehr ähnliche Zahlen aufwiesen (Tabelle 4-3, S. 58).

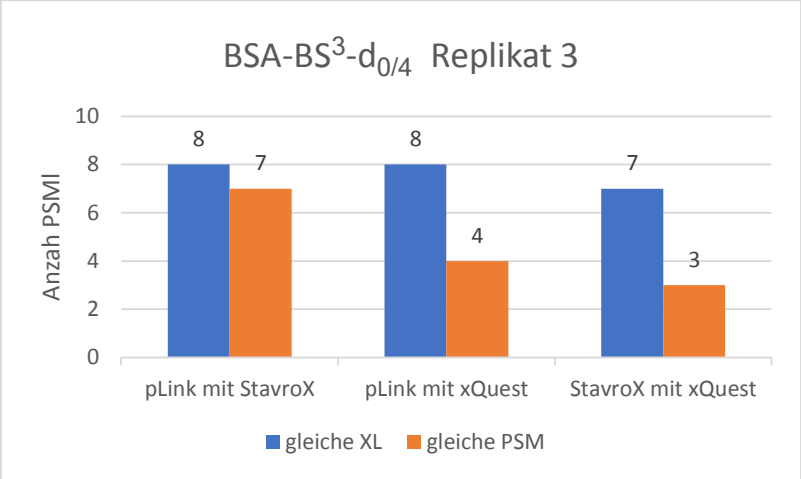

Abbildung 4-8: Übereinstimmung der zugeordneten Spektren (PSM) gleicher Cross-Links von pLink, StavroX und xQuest beim dritten Replikat von BSA-BS^3-d$_{0/4}$. Blau: gleiche XL = gleicher Cross-Link identifiziert; Orange: gleiche PSM = gleiches Fragmentionenspektrum wurde dem gleichen Cross-Link zugeordnet.

Zusammenfassend zeigten die drei Programme bei den Identifizierungen große Übereinstimmungen. Es gelang keinem der Programme alle Cross-Links zu finden, die unter Betrachtung der Gesamtergebnisse möglich gewesen wären. Interessant war, wie häufig xQuest zur Identifizierung von Cross-Links Fragmentionenspektren heranzog, die bei den anderen Programmen nicht zugeordnet wurden. Dies zeigte noch mal, wie unterschiedlich die Suchalgorithmen und Bewertungen der Programme waren.

Die Ergebnisse von pLink enthielten die meisten falschen Identifizierungen, was allerdings nicht verwunderlich war, da die Ergebnis-Listen von pLink immer alle Treffer ohne Cut-off anzeigen. Es ist zu erwarten, dass die niedrigsten Ergebnisse falsch sind.

Im Venn-Diagramm in Abbildung 4-9 sind die Ergebnisse aller drei Replikate dargestellt. Es werden für jedes Programm die Treffer gezählt, die in mindestens zwei von drei Replikaten gefunden wurden. Nur wenige Cross-Links wurden ausschließlich von einem einzigen Programm identifiziert. Daher waren alle drei Programme in Hinsicht auf ihre Kompetenz beim Auffinden von Spektren, die durch Cross-Link Peptide entstanden sind, als gleichwertig betrachtet. Die minimalen Unterschiede der identifizierten Cross-Links sind schwierig zu erklären, da dies vermutlich von mehreren Faktoren wie dem Suchalgorithmus, der Spektrenqualität und deren Bewertung durch das Programm zusammenhängt.

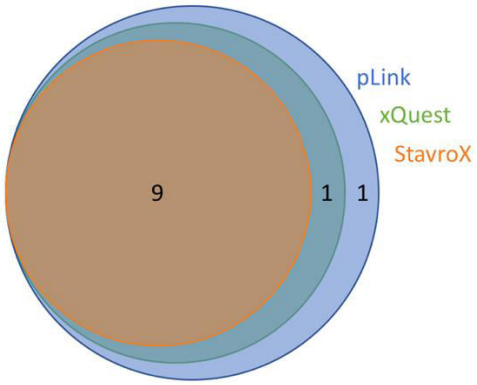

Abbildung 4-9:Venn-Diagramm der identifizierten Cross-Links durch pLink, xQuest und StavroX aus drei Replikaten. Angegeben sind alle Cross-Links, die in drei Replikaten mindestens zweimal gefunden wurden.

Deutliche Unterschiede ergaben sich jedoch bei der Benutzung und Aufbereitung der Ergebnisse der einzelnen Programme. Während StavroX als anwenderfreundlichstes Programm bewertet wurde, ist xQuest ein sehr herausforderndes Programm – vor allem für Nutzer ohne Programmierkenntnisse. pLink bildete dabei eine Zwischenlösung, die zwar ohne Benutzeroberfläche, aber mit sehr simpler Command-Line basierter Anwendung auskommt.

Bei den möglichen Einstellungen der Suchparameter waren alle Programme fast identisch, jedoch war bei xQuest die geringe Auswahl der möglichen Cross-Linker, Proteasen und Modifikationen nachteilig. Die Präsentation der Ergebnisse fiel für die drei Programme sehr unterschiedlich aus. Am wenigsten informativ waren die Ergebnis-Listen von xQuest, da für jede Identifizierung nur der beste Treffer angezeigt wurde. StavroX hingegen gab alle identifizierten Spektren an, allerdings in ungeordneter Weise ohne Zusammenfassung gleicher Treffer. Bei pLink war die Ergebnis-Liste am übersichtlichsten: Gleiche Treffer wurden automatisch zu Gruppen zusammengefasst und die Ergebnisse lagen direkt in einer Excel-Tabelle vor.

Aufgrund dieser Tatsachen wurde für die weitere Datenauswertung das Programm pLink als Suchprogramm verwendet. pLink überzeugte durch eine einfache Handhabung und die

übersichtlichste Präsentation der Ergebnisse, die ohne weitere Bearbeitung (z. B. Sortierung) weiterverwendet werden können.

Im Folgenden wurden Regeln zusammengefasst, welche Parameter zur Datenauswertung mit pLink für die weitere Datenanalyse ausgewählt wurden:

1. Score: Treffer mit sehr hohen Scores werden ohne weitere Prüfung ausgeschlossen (im Bereich von 0.01 bis 0.99)
2. MS^1-Spektren: verbleibende Treffer werden auf Vorhandensein des Isotopenmusters überprüft.
3. Massenabweichung: Verbleibende Treffer mit Massenabweichungen größer/kleiner als +3/-3 ppm werden markiert. Es wird überprüft, ob pLink für die Berechnung der Massenabweichung den richtigen (monoisotopischen) Peak verwendet hat.
4. Treffer, bei denen sowohl das Isotopenmuster fehlt als auch die Massenabweichung des monoisotopischen Peaks außerhalb des ±3 ppm-Bereich liegt, werden ausgeschlossen.
5. Verbleibende Treffer werden als richtige Identifizierungen angenommen.

Im folgenden Ergebnisteil werden nur Treffer gezeigt, die nach diesen Regeln als richtig bewertet wurden.

4.2.2 Vergleich von Cross-Linkern mit verschiedenen Längen

Da es viele verschiedenen Cross-Linker gibt, bietet sich die Verwendung von mehreren Cross-Linking Reagenzien zur Untersuchung einer Probe an. Beispielsweise können durch die Verwendung von Cross-Linkern mit verschiedenen Distanzen unterschiedliche Cross-Links erhalten werden. Daher wurde hier für BSA evaluiert, ob der Einsatz eines weiteren Cross-Linkers zusätzliche Informationen liefern würde. Es kam BS^2G-$d_{0/4}$ zum Einsatz, der mit einer Spacer-Länge von 7,7 Å als kurzer Cross-Linker gilt (maximaler Abstand 24,7 Å, siehe S. 55). Im Vergleich dazu hat der Standard-Cross-Linker BS^3-$d_{0/4}$ eine Spacer-Länge von 11,4 Å (maximaler Abstand 28,4 Å, siehe S. 55).

Es wurden drei Replikate von BSA mit BS^2G-$d_{0/4}$ hergestellt und gemessen (2 pmol mit Orbitrap Elite, ID: A3). In Tabelle 4-4 sind die Ergebnisse im Vergleich mit dem längeren Cross-Linker BS^3-$d_{0/4}$ zusammengefasst (Ergebnisse von pLink aus Kapitel 4.2.1). Es wurden mit dem kürzeren Reagenz BS^2G insgesamt 12 Cross-Links identifiziert (in mindestens zwei von drei Replikaten), wovon 8 Cross-Links auch mit BS^3 identifiziert wurden. Außerdem wurden vier Cross-Links gefunden, die nicht mit BS^3 entstanden sind. Zwei Cross-Links konnten hingegen nur mit BS^3 identifiziert werden. Alle Cross-Links (bis auf eine Ausnahme) hatten eine Distanz der α-Kohlenstoffatome, die sowohl mit BS^3 und BS^2G überbrückt werden können. Von den vier zusätzlichen Cross-Links mit BS^2G war nur einer besonders kurz (AA221-AA294, 4,3 Å) und im Gegensatz dazu ein Cross-Link sogar länger als die maximale Distanz (AA204-AA221, 26,4 Å). Aufgrund der guten Scores, der geringen

Massenabweichung und der Identifizierung in zwei von drei Replikaten, wurde dieser Treffer nicht verworfen. Diese beiden Extreme sind nur über die Stellung der Lysin-Seitenketten zu erklären, die näher bzw. weiter voneinander entfernt liegen als dies über die α-C-Atome zu erwarten wäre. Ideal wäre hier die Überprüfung der Distanz zwischen den Stickstoff-Atomen der Lysin-Seitenketten – allerdings sind verfügbare 3D-Strukturen für die Lage der Seitenketten zu ungenau, um Distanzmessung zwischen den Lysin-Stickstoffatomen möglich zu machen.

Tabelle 4-4: pLink-Ergebnisse der Probe BSA-BS_2G-$d_{0/4}$ (drei Replikate) im Vergleich mit drei Replikaten BSA-BS^3-$d_{0/4}$ (Ergebnisse von pLink aus Kapitel 4.2.1). AA1/2: Aminosäure 1/2, ppm = Massenabweichung, MS^1 = MS^1-Isotopenmuster. x = Identifizierter Cross-Link mit BS^3-$d_{0/4}$. Nur Treffer, die in mindestens zwei von drei Replikaten identifiziert wurden, sind aufgeführt.

			BS^2G-$d_{0/4}$ (24,7 Å)									BS^3-$d_{0/4}$ (28,4 Å)
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**Score**	**ppm**	**MS^1**	**Score**	**ppm**	**MS^1**	**Score**	**ppm**	**MS^1**	**3 Replikate**
1	12	19,5	1.61E-04	-1.7	ja	8.80E-05	0.4	ja	1.75E-05	-0.9	ja	x
116	431	21,3	5.05E-04	0.2	ja	3.21E-04	-0.6	ja	7.17E-07	0.4	ja	x
180	187	11,0	-	-	-	5.21E-04	1.3	ja	3.39E-05	-0.0	ja	x
187	221	20,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
187	431	13,7	2.26E-05	-1.5	ja	3.32E-04	-0.7	ja	3.68E-06	1.0	ja	x
187	439	18,2	1.01E-06	-1.7	ja	3.72E-07	-0.6	ja	5.83E-07	-0.7	ja	x
204	221	26,4	-	-	-	1.69E-05	1.1	ja	7.58E-05	2.2	ja	-
204	350	16,4	7.42E-05	0.5	ja	1.49E-06	-1.4	ja	1.62E-04	-2.4	ja	x
211	350	13,5	-	-	-	8.95E-04	0.4	ja	1.13E-05	-0.3	ja	-
221	294	4,3	4.18E-03	-2.3	ja	-	-	-	9.12E-04	-0.6	ja	-
221	439	20,5	2.93E-05	-0.2	ja	-	-	-	5.91E-04	-1.9	ja	x
350	474	18,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
431	439	13,5	2.99E-04	-1.9	ja	1.74E-07	-0.2	ja	1.34E-04	-0.4	ja	x
520	524	6,4	1.26E-03	-0.1	ja	1.72E-04	-1.6	ja	1.95E-06	0.3	ja	-
524	544	14,3	-	-	-	-	-	-	5.16E-05	-1.6	ja	x
			12									11

Insgesamt war zu erkennen, dass schon in einem einzelnen Protein wie BSA durch den Einsatz von Cross-Linking Reagenzien verschiedener Länge zusätzliche Informationen gewonnen werden konnten. Im Vergleich zur Einzel-Verwendung wurden insgesamt 15 Cross-Links gefunden, was einer Steigerung der identifizierten Cross-Links um +25 % (BS^2G) bzw. +36 % (BS^3) entsprach.

4.2.3 *Auswertung der Cross-Linking Effizienz in BSA*

Um zu sehen, wie effizient die Cross-Linking Reaktion ist, wurden drei Proben BSA vor und nach Cross-Linking mit 10-fachem Überschuss von BS^3-$d_{0/4}$ mit LC-MS/MS gemessen und mit pLink nach Cross-Link Peptiden durchsucht (jeweils 2 pmol, Orbitrap Velos Pro. ID: A3). Von diesen Cross-Link Peptiden wurden drei Peptide ausgewählt, die nur in einem spezifischen Cross-Link vorkamen und auch in der Kontrolle identifiziert werden konnten (ECCDK(280)PILEK, FK(12)DLGEEHFK, LAK(350)EYEATLEECCAK).

Die durchschnittlichen relativen Intensitäten der ausgewählten Peptide in drei Replikaten vor und nach Cross-Linking sind in Abbildung 4-10 gezeigt. Die Intensitäten vor dem Cross-Linking wurden dabei auf 100 % festgelegt und die Intensitäten nach der Reaktion relativ dazu berechnet. Es ist zu erkennen, dass verschiedene Intensitätsunterschiede für die einzelnen Peptide und somit für verschiedene Cross-Links gefunden wurden.

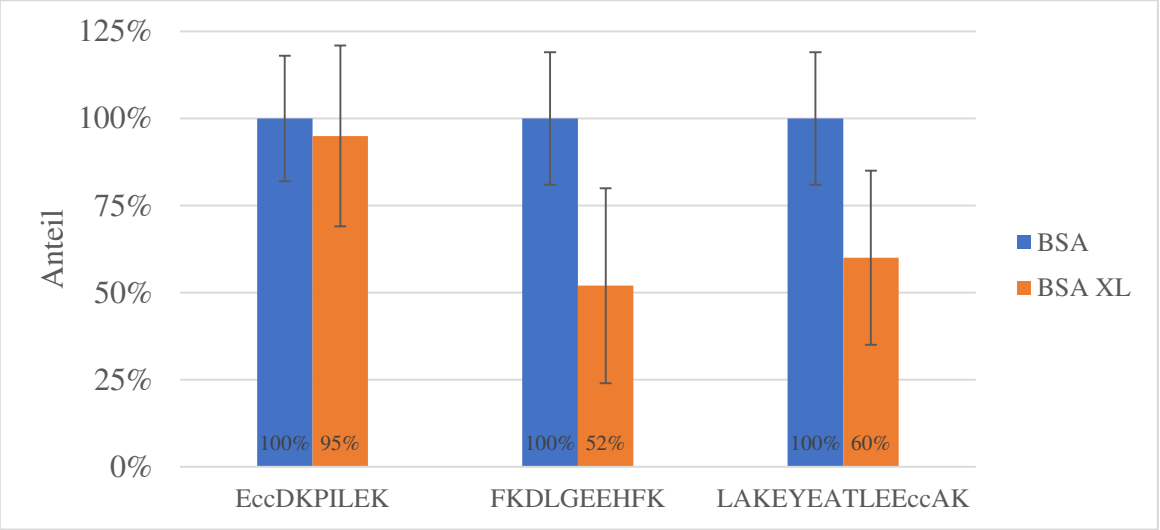

Abbildung 4-10: Relative Intensität von drei BSA-Peptiden vor und nach Cross-Linking Reaktion. Peptide ECCDKPILEK aus Cross-Link AA187-AA280, FKDLGEEHFK Aus Cross-Link AA1-AA12, und LAKEYEATLEECCAK aus Cross-Link AA204-AA350). Blau: BSA = ohne Cross-Linking; Orange: BSA-XL = mit Cross-Linking. Die Intensitäten ohne Cross-Linking wurden auf 100 % festgelegt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von drei Replikaten.

Die relativen Intensitäten nach dem Cross-Linking lagen zwischen 52 % und 95 % vom Ausgangswert. Betrachtete man nun, wo die zugehörigen Cross-Links in BSA räumlich lagen, zeigte sich, dass die Effizienz der Reaktion von der Lage der Lysine des Proteins abhängig war. Die beiden Cross-Links, die sich eher an der Oberfläche von BSA befanden, hatten eine Cross-Linking Effizienz von rund 50-60 % - d.h. diese Lysine werden in 50 % der vorhandenen BSA-Moleküle verlinkt (AA1-AA12 und AA204-AA350). Der andere ausgewählte Cross-Link lag eher im Inneren von BSA und diese Lysine haben eine verringerte Zugänglichkeit für das Lösungsmittel und somit auch für das Cross-Linking

Reagenz (AA187-AA280). Dies spiegelte sich auch in der geringeren Effizienz der Reaktion wider: Nur maximal 5 % der Peptide waren an den Lysinen modifiziert.

Zusätzlich zu den Intensitätsunterschieden war die Standardabweichung der drei Replikate sehr hoch, was insgesamt für eine geringe Reproduzierbarkeit der Reaktion sprach. Dies zeigte die Variabilität der Cross-Linking Effizienz zwischen verschiedenen Proben, die unter gleichen Bedingungen reagierten. Trotzdem ließ sich hiermit zeigen, dass eine Tendenz der Reaktionseffizienz vorhanden ist, die sehr mit der Zugänglichkeit der Lysine im BSA-Molekül korreliert. Diese Information könnte bei unbekannten Proteinen zusätzliche Erkenntnisse über hydrophobe und hydrophile Bereiche der Struktur liefern.

4.3 Photo-reaktives Cross-Linking

Die Aktivierung von UV-aktiven Komponenten für Protein Cross-Linking wird normalerweise mit UV-Lampen durchgeführt, da es die einfachste Art ist, eine Probe mit monochromatischem Licht zu bestrahlen. Oft werden Proben dabei aber bis zu einer Stunde dem UV-Licht ausgesetzt, was nachteilige Auswirkungen auf die Probe haben kann. Insbesondere bei *in-vivo* Cross-Linking Anwendungen sollten etwaige Einflüsse von langer UV-Exposition auf lebende Zellen vermieden werden.

Daher entstand die Idee, die Aktivierung der UV-aktiven Komponente mit einem gepulsten Laser durchzuführen. Zum einen kann bei einem Laser ein engeres Wellenlängenband im Vergleich zu einer herkömmlichen UV-Lampe erreicht werden, sodass weniger unspezifische Veränderungen an Zellen oder Proteinen zu erwarten sind. Zusätzlich erlaubt ein sehr kurzer Laser-Puls die Bestrahlungszeit stark zu verkürzen, was wiederum ungewollte Nebenreaktionen und induzierte zelluläre Prozesse verringern würde.

4.3.1 UV-Aktivierung mittels gepulstem Laser

Für den ersten Versuch wurde Hämoglobin mit 20-fachem Überschuss SDA an freien Aminen modifiziert, überschüssiges Reagenz entfernt und die Hämoglobin-SDA-Probe anschließend in eine 96-well Platte überführt. Je 25 µL der Probe wurden jeweils mit einem Laserpuls (3-5 ns Dauer) zunehmender Energie bestrahlt (Tabelle 4-5). Hier wurde Hämoglobin anstelle von BSA verwendet, da der Grad der Vernetzung durch Cross-Linking in der SDS-PAGE besser kontrolliert werden konnte (Entstehung von Dimeren, Trimeren und Tetrameren, vgl. Abbildung 4-2, S. 47). Die massenspektrometrische Auswertung stand zu Beginn im Hintergrund, weswegen die schlechteren Eigenschaften als Standardprotein von Hämoglobin in Kauf genommen wurden.

Tabelle 4-5: Übersicht der übertragenen Energie pro Laserpuls bei der Bestrahlung von Hb-SDA.

Probe	**Hb + SDA + λ**									
Puls-Energie (µJ)	2	8	30	80	130	72	330	1230	3900	6000

Das Ausmaß der Aktivierung und damit des stattgefundenen Cross-Linking wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 4-11). Die ersten beiden Banden zeigen Hämoglobin ohne SDA vor und nach einem Laserimpuls mit 6000 µJ. Diese Proben dienten der Überprüfung, ob der Laserimpuls auf der höchsten Stufe von 6000 µJ dem Protein einen Schaden zufügte. Konformationsänderungen konnten so zwar nicht erfasst werden, aber es konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein beispielsweise durch den Energieübertrag gespalten wurde. Es war zu erkennen, dass sich die Banden glichen und keine Veränderung eingetreten war. Die weiteren Banden zeigen dann Hämoglobin, modifiziert mit SDA, vor und nach der

Bestrahlung mit jeweils einem Laserimpuls von unterschiedlicher Stärke. Hier waren entgegen der Erwartungen ebenfalls keine Änderungen der Banden zu erkennen. Eine Vernetzung innerhalb der Untereinheiten (16 kDa) bzw. zwischen den Untereinheiten (32 kDa, 48 kDa, 64 kDa), die durch Verschmieren der Banden bzw. durch neue Banden identifizierbar wäre, war nicht eingetreten. Für die fehlende Reaktion gab es zwei mögliche Erklärungen: Zum einen könnte das Diazirin nicht zur Stickstoffabgabe angeregt worden und damit nicht in den reaktiven Status übergegangen sein; zum anderen könnte der Cross-Linker schon im ersten Schritt nicht erfolgreich eingebracht worden sein.

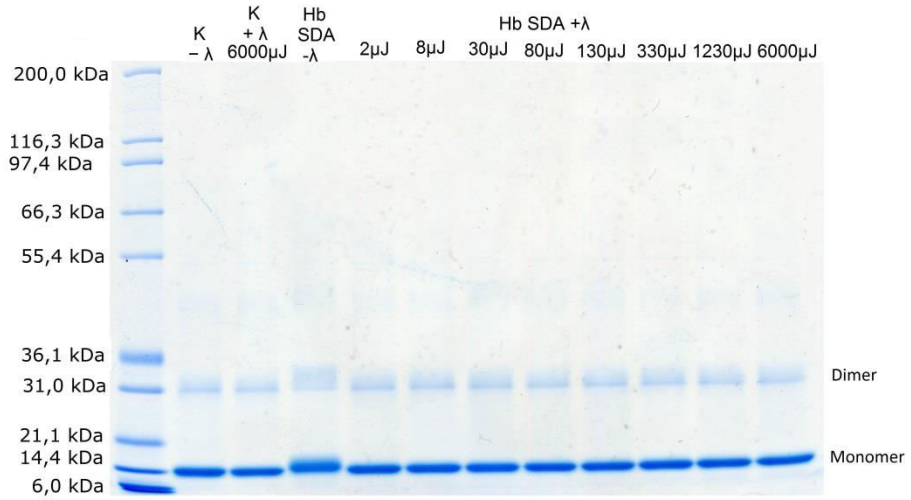

Abbildung 4-11: SDS-PAGE von Hämoglobin mit SDA zur Überprüfung der Diazirin-Aktivierung mittels Laserpuls. -λ = ohne Laserpuls, +λ = mit Laserimpuls. K = Kontrolle ohne SDA.

Ob die Diazirin-Komponente von SDA durch den Laserpuls aktiviert wurde, kann über ein einzelnes SDA-modifiziertes, synthetisches Peptid bestimmt werden. Dabei entstehen wahrscheinlich keine Cross-Links zwischen den Peptiden, sondern nur Monolinks mit Wasser und Intralinks innerhalb des Peptids (Abbildung 4-12): Das nach UV-Aktivierung entstandene, sehr reaktive Carben reagiert mit den nächstmöglichen Molekülen: mit Wasser (Monolinks) oder mit dem Peptid, an dem der Cross-Linker hängt (Intralinks).

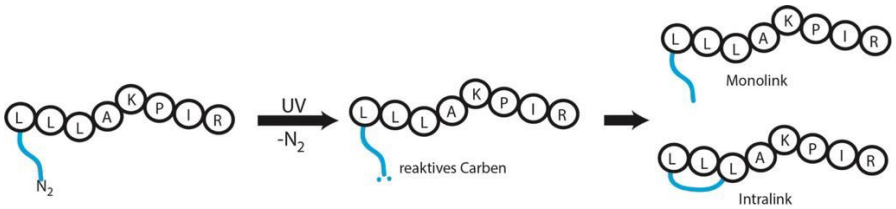

Abbildung 4-12: Schematische Abbildung der UV-Aktivierung von SDA (blau) am Peptid LLLALPIR (nur am N-Terminus modifiziert). Durch UV-Aktivierung wird Stickstoff abgespalten und es entsteht ein reaktives Carben. Das Carben reagiert mit Wasser zu einem Monolink oder mit dem Peptid zu Intralinks

Es wurde das Peptide LLLAKPIR verwendet, das am N-Terminus und am Lysin mit SDA modifiziert werden konnte. Da das Reagenz im 1:1-Verhältnis zum Peptid gegeben wurde, wurde nur das einfach modifizierte Peptid für die Ergebnisse herangezogen. Da beim vorherigen Versuch auch mit der höchsten Energie keine Aktivierung beobachtet wurde, wurde das Peptid mit zwei Laserpulsen der höchsten Energie (2x 6 mJ) bestrahlt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit zu erhalten. Es wurde jeweils 1 pmol des Peptids gemessen (Orbitrap XL, ID: D1).

Abbildung 4-13 zeigt die Ergebnisse des ersten Replikats in Form der Chromatogramme der MS-Messungen vor und nach der Laser-Aktivierung. Im oberen Chromatogramm ist das Gesamt-Ionen-Chromatogramm der Messungen (TIC (total ion current), schwarz) zu sehen. Die interessanten m/z-Verhältnisse wurden in den weiteren Chromatogrammen extrahiert: das nicht-modifizierte Peptid (rot, m/z = 462.32358), das Peptid mit intakter (nicht-aktivierter) SDA-Modifikation (grün, m/z = 573.88965), das Peptid mit aktivierter SDA-Modifikation als Monolink (blau, m/z = 568.89209) und das Peptid mit aktivierter SDA-Modifikation als Intralink (gelb, m/z = 559.88708).

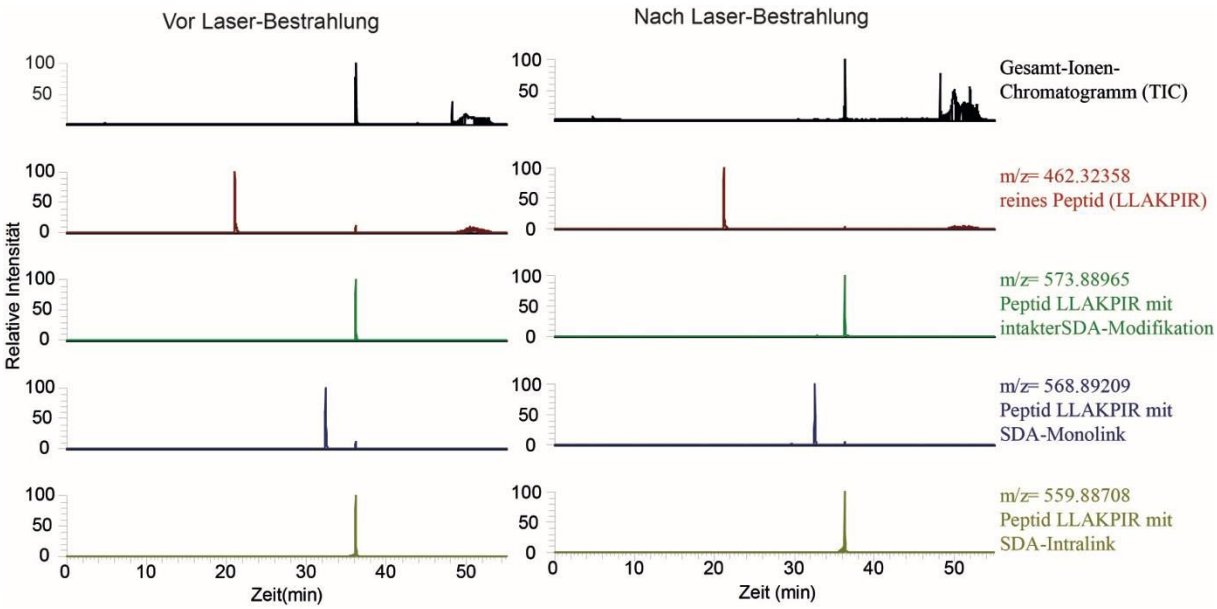

Abbildung 4-13: Chromatogramme des Peptids LLAKPIR mit SDA-Modifikation vor und nach Laser-Aktivierung (2 Pulse mit 6 mJ). Von oben nach unten: TIC der Messung, reines Peptid (rot, m/z = 462.3236), das Peptid mit der nicht-aktivierten SDA-Modifikation (grün, m/z = 573.8897), das Peptid mit aktivierter SDA-Modifikation als Monolink (blau, m/z = 568.8921) und das Peptid mit aktivierter SDA-Modifikation als Intralink (gelb, m/z = 559.8871).

Die Peak-Flächen beider Replikate sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst. Über die Intensitäten wurde die relative Abundanz der Peptide verglichen – allerdings ist dies nur eine

Abschätzung, da die Intensitäten zueinander aufgrund unterschiedlicher Ionisierungseffizienz nicht quantitativ sind.

In der Ausgangsprobe vor Laseraktivierung lagen relativ zum modifizierten Peptid nur 0,14 % bzw. 0,53 % des Peptids als nicht-modifizierte Form vor. Dieser geringe Anteil war zu vernachlässigen und zeigte eine sehr effiziente Bindung von SDA an das Peptid. Interessant war, dass die aktivierte Form des SDA-Peptids als Monolink mit Wasser und als Intralink vor der Laser-Bestrahlung vorlag. Der Intralink war dabei mit rund 20 % relativer Intensität zur nicht-aktivierten Form in beiden Replikaten sehr stark präsent, während der Monolink weniger als 1 % ausmachte. Vor der Laser-Aktivierung mit Laser bzw. UV-Licht sollte eigentlich keine aktivierte Form der SDA-Modifikation nachweisbar sein. Während der Monolink in vernachlässigbaren, geringen Mengen vorlag, war der Intralink übermäßig stark vorhanden.

Tabelle 4-6: Intensitäten (AUC = area under the curve) der Peaks des Peptids LLLAKPIR mit SDA-Modifikation vor und nach Laser-Aktivierung von zwei Replikaten (1 und 2). Nicht-aktiviert: SDA hat Stickstoff nicht abgespalten (SDA+N_2). Aktiviert = SDA hat Stickstoff durch UV-Anregung abgespalten mit Wasser (Monolink) oder einem anderen Teil des Peptids reagiert (Intralink). Im rechten Teil sind prozentuale Verhältnisse angegeben: z.B. reines Peptid/SDA+N_2 = Anteil der Fläche (AUC) des reinen Peptids verglichen mit der Fläche des Peptids mit SDA-Modifikation vor Aktvierung.

	m/z	462,3236	573,8897	568,8921	559,8871			
	Status	-	nicht-aktiviert	aktiviert	aktiviert			
	Peptid	Peptid LLAKPIR	+SDA+N_2	+Monolink	+Intralink	Peptid/ SDA+N_2	Intralink/ SDA+N_2	Monolink/ SDA+N_2
1	vor Laser (AUC)	1,88E+06	1,30E+09	8,83E+06	2,56E+08	0,14 %	19,74 %	0,68 %
	nach Laser (AUC)	2,88E+06	5,34E+08	1,10E+07	1,23E+08	0,54 %	23,08 %	2,06 %
2	vor Laser (AUC)	1,07E+07	2,03E+09	1,27E+07	4,45E+08	0,53 %	21,93 %	0,62 %
	nach Laser (AUC)	4,01E+05	1,21E+09	1,55E+07	2,52E+08	0,03 %	20,86 %	1,29 %

Ein Blick auf das Fragmentionenspektrum (Abbildung 4-14) des vermeintlichen Intralinks kann dessen Vorhandsein erklären: das m/z-Verhältnis entsprach zwar einem SDA-Intralink des Peptids LLLAKPIR, das Fragmentionenspektrum passte jedoch besser auf die Zwischenstufe zwischen Stickstoff-Abspaltung und der Reaktion des Carbens (siehe Abbildung 4-12, Mitte, S. 67) – es liegt also das Radikal vor. Außerdem fehlten im Fragmentionenspektrum Peaks, die eindeutig auf den Intralink deuteten. Durch die Verbindung des N-Terminus und einer weiteren Aminosäure wäre die Wahrscheinlichkeit hoch, dass durch den Bruch einer beliebigen Peptidbindung das Peptid zwar fragmentiert wird, aber durch den Intralink verbunden bleibt, da der verwendete Cross-Linker keine Fragmentierung mit CID zeigt.

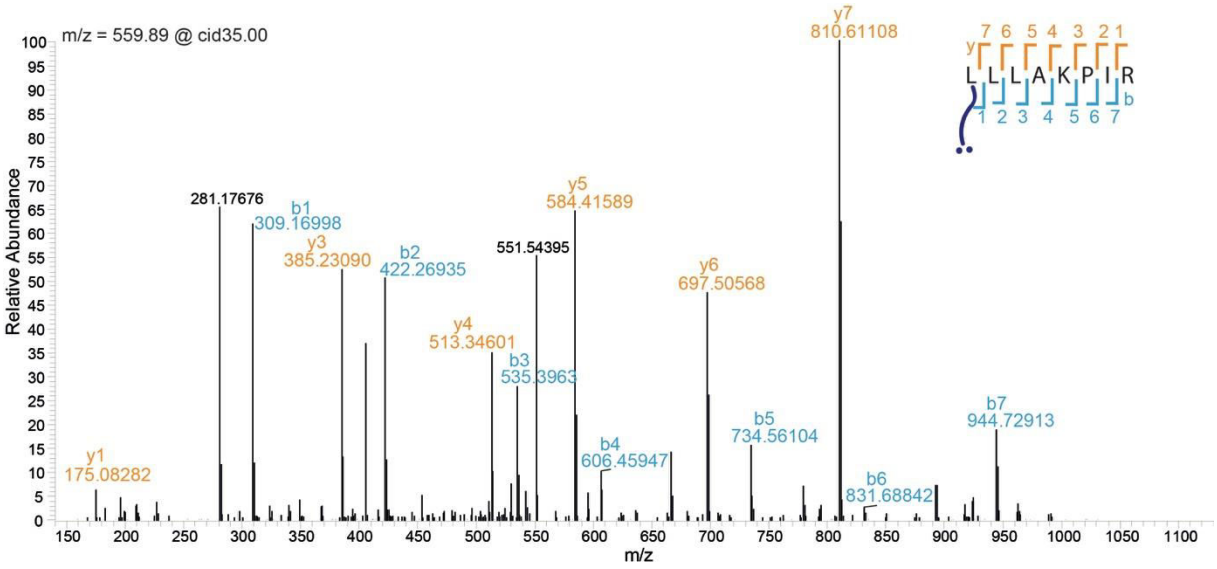

Abbildung 4-14: Fragmentionenspektrum des Peptids LLLAKPIR mit SDA-Modifikation am N-Terminus (hellblau, +195.1322) nach Stickstoff-Abspaltung und vor Intralink-Bildung. Die y-Ionen sind orange, die b-Ionen blau markiert.

Dadurch hätten die Masse des intakten Peptids (m/z = 1118,7722 mit z = 1, m/z = 559,8898 mit z = 2 und m/z = 373,59560 mit z =3) zumindest sichtbar sein müssen, aber diese Massen konnten im Fragmentionenspektrum nicht gefunden werden.

Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich beim Peptid mit m/z = 559,8871 nicht um einen Intralink handelte, sondern um das nicht-aktivierte SDA-Peptid, das vermutlich durch die Ionisierung im Massenspektrometer Stickstoff (N_2) abgespalten hatte.

Nach der Bestrahlung nahmen die relativen Anteile des Monolinks (+ 1,38 %) und des Intralinks (+3,34 %) in sehr geringem Maße zu. Dies bedeutete, dass durch die Laserpulse keine ausreichende Aktivierung zur Stickstoff-Abspaltung und damit Befähigung zum Cross-Linking erreicht werden konnte.

4.3.2 Untersuchung der Aktivierungszeit eines Diazirin-Cross-Linkers

Da in den vorangegangenen Versuchen keine Aktivierung mit dem Laser erreicht werden konnte, wurde erneut ein einzelnes, synthetisches Peptid mit SDA modifiziert und anschließend mit einer UV-Lampe (365 nm) aktiviert. Dieser Versuch sollte zeigen, wie lange die notwendige Bestrahlungszeit ist und welche Energie dabei auf die Probe übertragen wird.

Das Peptid QYFAETER weist nur am N-Terminus eine Möglichkeit zur Modifikation mit dem Cross-Linker SDA auf. Es wurden acht verschiedene Bestrahlungszeiten zwischen 0 und 60 min ausgewählt. Neben verschiedenen Bestrahlungszeiten mit UV-Licht wurde außerdem getestet, ob der Standardpuffer (20 mM HEPES, pH 7.4) einen Einfluss auf die UV-Aktivierung des Diazirins haben könnte: Das Peptid wurde zur Aktivierung neben dem Standardpuffer auch in Wasser gelöst. Je Lösungsmittel und Bestrahlungszeit wurden drei

Replikate à 20 µL in einer 96-Well-Platte bestrahlt. Es wurde je Replikat 1 pmol des Peptids gemessen (3 pmol, Orbitrap XL, ID: D1).

Tabelle 4-7: Masse des Peptid QYFAETER und die Massenänderung durch die SDA-Modifikation vor und nach UV-Aktivierung (Monolink, Intralink).

	QYFAETER	+SDA am N-Terminus vor Diazirin-Aktivierung	+ Monolink	+ Intralink
Molekulargewicht (Da)	1042,4720	+223,1321	+213,1252	+195,1259

Um zu vergleichen, welcher Anteil des SDA-Peptids mit aktiviertem Diazirin (Stickstoff-Abspaltung) und mit nicht-aktiviertem Diazirin vorlag, wurden die Peakflächen (AUC, Area Under the Curve) mit der Software Xcalibur bestimmt (Peptidmassen siehe Tabelle 4-7).

Für jeden Zeitpunkt wurden die Werte der entsprechenden Peptid-Intensitäten aus den Mittelwerten der drei Replikate gebildet. Um Ungenauigkeiten bei der gemessenen Peptidmenge auszugleichen, wurden die gemessenen Intensitäten normalisiert. Dazu wurde das unmodifizierte Peptid QYFAETER genutzt, da dieses durch UV-Bestrahlung keine Veränderung erfährt und dessen Menge in jeder Probe unverändert ist. Zur Normalisierung wurde die Intensität des nicht-modifizierten Peptids zu jedem Zeitpunkt bestimmt. Der niedrigste Intensitätswert dieses Peptides wurde durch die jeweiligen anderen Intensitätswerte geteilt, um daraus den Normalisierungsfaktor für jeden Zeitpunkt zu erhalten. Die Intensitäten der bestrahlten Proben wurden dann mit dem dazugehörigen Normalisierungsfaktor multipliziert und dadurch angeglichen.

In Abbildung 4-15 sind die Ergebnisse der Aktvierungszeit in Wasser im Balkendiagramm (relative Intensitäten) dargestellt (Daten im Anhang, Tabelle 8-2). Es war zu erkennen, dass die Aktivierung der Diazirin-Komponente zwar schon nach vier Sekunden begann – allerdings war der Anteil der Peptide mit aktiviertem SDA vernachlässigbar klein. Erst ab 10 min Bestrahlung wurde ein größerer Anteil der Diazirin-Moleküle zur Stickstoff-Abgabe angeregt. Nach 60 min Bestrahlung waren nicht-aktivierte SDA-Peptide fast nicht mehr nachweisbar.

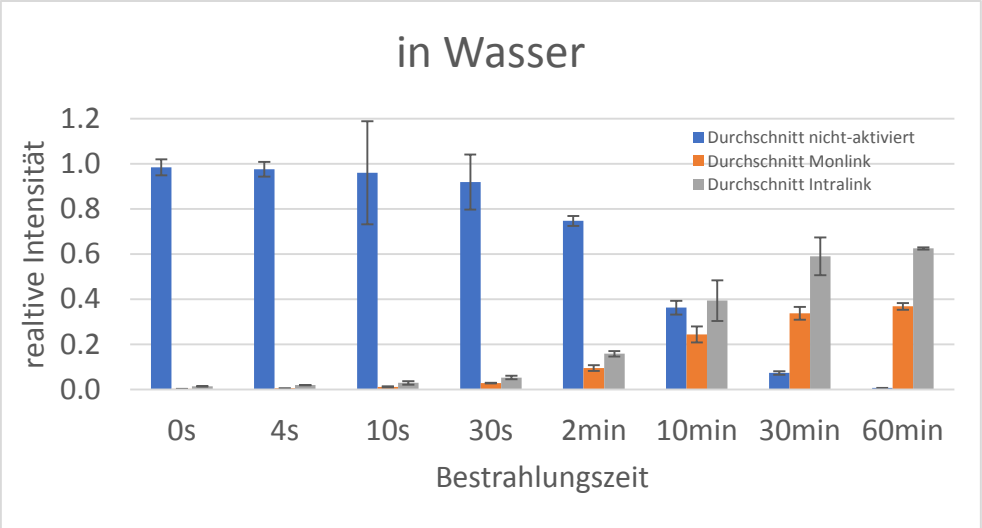

Abbildung 4-15: Balkendiagramm der Ergebnisse der relativen Intensitäten des Peptids QYFAETER mit SDA-Modifikation mit nicht-aktiviertem (blau) und aktiviertem Diazirin (Monolink (orange), Intralinks (grau)) nach verschiedenen Bestrahlungszeiten, gelöst in Wasser. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei Replikate an.

In Abbildung 4-16 (Daten im Anhang, Tabelle 8-3) sind die Ergebnisse desselben Versuchs in HEPES (20 mM, pH 7.4) gezeigt. Die Intensitäten hatten die gleiche Verteilung wie beim ersten Versuch mit Wasser. Dies bedeutete, dass der Puffer keinen Einfluss auf die Aktivierung der Diazirin-Komponente hatte.

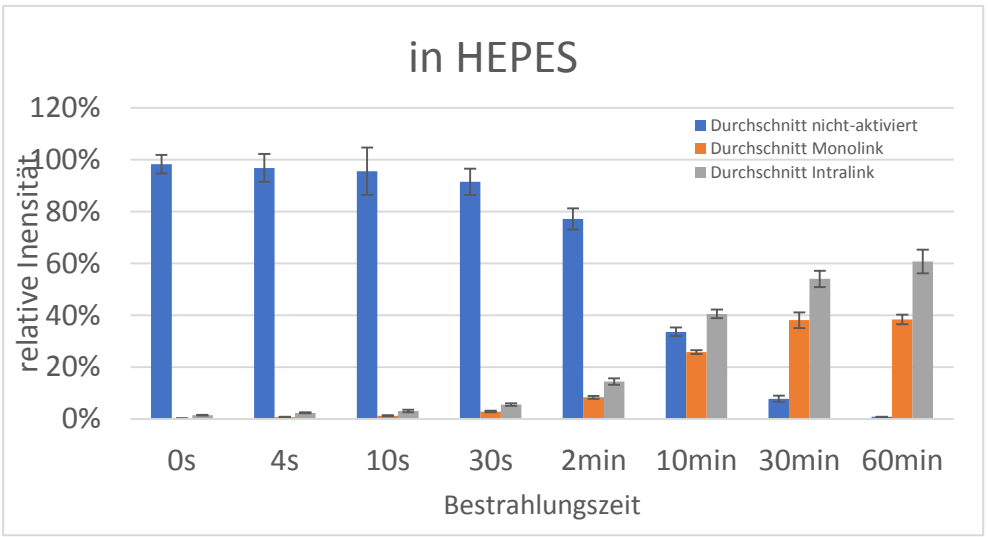

Abbildung 4-16: Balkendiagramm der Ergebnisse der relativen Intensitäten des Peptids QYFAETER mit SDA-Modifikation mit nicht-aktiviertem (blau) und aktiviertem Diazirin (Monolink (rot), Intralinks (grün)) nach verschiedenen Bestrahlungszeiten, gelöst in Wasser. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei Replikate an.

Um auszuschließen, dass durch den Laserpuls zu wenig Energie überragen wurde, wurde anschließend ein Versuch mit einer deutlich höheren Zahl von Laserpulsen durchgeführt (360 Pulse, 2.16 J). Als Ergebnis dieses Laser-Experiments wurde allerdings das Verbrennen der 96-Well-Platte, die als Probengefäß diente, beobachtet. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit, dass die Probe danach mit Polymeren verunreinigt wurde, wurde vom Messen diese Probe abgesehen. Mit UV-Lampenbestrahlung wurde niemals eine Beschädigung des Probengefäßes beobachtet. Dies gab auch einen Hinweis darauf, dass die Probe die Energie des Laserstrahls nicht gut absorbieren konnte und dies dann durch das Plastikprobengefäß geschah.

Insgesamt zeigten diese Versuche, dass die ideale Bestrahlungsdauer für UV-Cross-Linking mit Diazirin-Cross-Linkern mit einer 8 Watt UV-Lampe bei 30 bis 60 Minuten lag. Zu Beginn der Laserversuche wurde eventuell zu wenig Energie übertragen, um eine Aktivierung herbeizuführen. Spätere Versuche mit erhöhter Anzahl von Laserpulsen zeigten, dass die kurzen, hochenergetischen Laserpulse nicht gut von den Proben absorbiert wurden, sodass die Energie vom Probengefäß aufgenommen wurde, was zu dessen Beschädigung führte. Ein Problem könnte auch sein, dass zur Aktivierung der Diazirine entweder ein durchgehender Energieübertrag notwendig ist – oder dass die Energie des Lasers mit 2-5 ns Pulslänge den Aktivierungsvorgang nicht starten bzw. aufrechterhalten kann.

Daneben gibt es eine weitere mögliche Erklärung: Die ideale Wellenlänge von Diazirin-Cross-Linkern ist mit 330-370 nm angegeben. Die UV-Lampe mit nominaler Wellenlänge von 365 nm strahlt ein sehr breites Wellenlängen-Band aus und deckt damit den ganzen Idealen Bereich ab. Ein Laser mit 355 nm hingegen strahlt ein sehr schmales Wellenlängen-Band aus. Es besteht hier durchaus die Möglichkeit, dass der Laser die falsche Wellenlänge hatte, um die Diazirin-Komponente zu aktivieren. Dies würde auch erklären, warum die Probe den Laserstrahl so schlecht absorbiert hat.

Eine sinnvolle Verbesserung des Versuchsaufbaus könnte die Verwendung eines kontinuierlichen Lasers sein, falls die Dauer der Aktivierung eine Rolle spielt. Außerdem sollte für eine Aktivierung mittels Laser die genaue Aktivierungswellenlänge bestimmt werden. Sinnvoll wäre auch die Verwendung einer stärkeren UV-Lampe, wodurch die Bestrahlungszeiten verkürzt werden könnten. Die hier verwendete Lampe wurde aufgrund der Herstellerangabe des Cross-Linkers verwendet.

4.4 Methodenentwicklung: ChaFRADIC zur Anreicherung von Cross-Link Peptiden

4.4.1 Übertragung von ChaFRADIC auf Cross-Link Peptide

Wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben, wurde ChaFRADIC zur Anreichung von N-terminalen Peptiden entwickelt. Auch für Cross-Link Peptide bietet sich der Ansatz der Anreicherung über die Ladungszustände prinzipiell an, da typische Cross-Link Peptide durch das Vorhandensein jeweils zweier N-Termini und basischer C-Termini eine höhere Ladung aufweisen als lineare Peptide.

Die ursprüngliche Idee der direkten Übertragung des ChaFRADIC-Ansatzes stieß allerdings schnell an Grenzen: Bei ChaFRADIC werden vor dem tryptischen Verdau freie Amine der Proteine (Lysine und N-Termini) durch Dimethylierung unter Ladungserhalt modifiziert, wodurch diese für Trypsin nicht mehr zugänglich sind und Trypsin mit ArgC-Spezifität verdaut. Beim Modellprotein BSA führte das allerdings zu einer sehr schlechten Sequenzabdeckung: Nur die gelb markierten Bereiche in Abbildung 4-17 konnten nach Dimethylierung und Trypsin-Verdau detektiert werden. Betrachtet man dazu die Lysine, die nach BS^3-$d_{0/4}$-Zugabe durch Cross-Links verbunden sind (rot), erkennt man, dass zum Teil sehr große Peptid-Konstrukte entstehen würden, die über LC-MS/ MS zu keinem Zeitpunkt zugänglich wären. Im Vergleich dazu kann ohne Dimethylierung mit Trypsin bei BSA eine Sequenzabdeckung von 100 % erreicht werden.

Beispielsweise wäre der Cross-Link zwischen dem N-Terminus und Lysin-12 ein Peptid mit 10 Aminosäuren (DTHKSEIAHR), das mit einem Peptid aus 71 Aminosäuren (FKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLH TLFGDELCKVASLR) verlinkt ist.

1	DTHKSEIAHR	FKDLGEEHFK	GLVLIAFSQY	LQQCPFDEHV	KLVNELTEFA	KTCVADESHA	GCEKSLHTLF	GDELCKVASL	
81	RETYGDMADC	CEKQEPERNE	CFLSHKDDSP	DLPKLKPDPN	TLCDEFKADE	KKFWGKYLYE	IARRHPYFYA	PELLYYANKY	
161	NGVFQECCQA	EDKGACLLPK	IETMREKVLT	SSARQRLRCA	SIQKFGERAL	KAWSVARLSQ	KFPKAEFVEV	TKLVTDLTKV	
241	HKECCHGDLL	ECADDRADLA	KYICDNQDTI	SSKLKECCDK	PLLEKSHCIA	EVEKDAIPEN	LPPLTADFAE	DKDVCKNYQE	
321	AKDAFLGSFL	YEYSRRHPEY	AVSVLLRLAK	EYEATLEECC	AKDDPHACYS	TVFDKLKHLV	DEPQNLIKQN	CDQFEKLGEY	
401	GFQNALIVRY	TRKVPQVSTP	TLVEVSRSLG	KVGTRCCTKP	ESERMPCTED	YLSLILNRLC	VLHEKTPVSE	KVTKCCTESL	
481	VNRRPCFSAL	TPDETYVPKA	FDEKLFTFHA	DICTLPDTEK	QIKKQTALVE	LLKHKPKATE	EQLKTVMENF	VAFVDKCCAA	
561	DDKEACFAVE	GPKLVVSTQT	ALA						

Abbildung 4-17: Sequenzabdeckung von BSA nach Dimethylierung von Lysinen und dem Protein-N-Terminus und nachfolgendem Trypsin-Verdau (ArgC-spezifisch). Annahme: maximal 2 überlesene Schnittstellen, minimale Peptidlänge 5 Aminosäuren, maximale Peptidmasse 4000 Da. Gelbe Bereiche sind Peptide, die unter den Annahmen durch LC-MS detektiert werden können. Rote Aminosäuren werden in BSA mit BS^3-$d_{0/4}$ üblicherweise durch Cross-Links verbunden.

Während bei der Anreicherung von N-terminalen Peptiden jeweils nur ein Peptid pro Protein – das Peptid, das den Protein-N-Terminus enthält – identifiziert werden muss, ist es beim Cross-Linking wichtig, eine gleichmäßige Sequenzabdeckung zu erreichen, da Cross-Links über das gesamte Protein verteilt sind. Daher ist ein Arbeitsablauf mit der anfänglichen Dimethylierung in Kombination mit einem tryptischen Verdau für die Anreicherung von Cross-Links ungeeignet.

4.4.2 Alternative Label-Methoden für ChaFRADIC

Aufgrund der Schwierigkeiten mit der Dimethylierung wurden alternative Abläufe untersucht, die den Ladungs-Shift der Peptide bedingen könnten. Dabei wurde der Fokus auf Derivatisierungen gelegt, die wieder entfernt werden können, um die Ladung der Peptide vollständig wiederherzustellen. Dies bietet gerade für Cross-Link Peptide den Vorteil, dass diese über selektive Fragmentierung von Peptiden mit hohen Ladungszuständen im Massenspektrometer später besser identifiziert werden können. Zusätzlich sollten die Derivatisierungsreaktionen eine leichtere Handhabung als die Dimethylierung aus dem klassischen ChaFRADIC-Ansatz mit sich bringen.

Ein potenzieller Ablauf der Anreicherung mit abspaltbarer Modifikation könnte wie folgt aussehen (Abbildung 4-18): Die Probe wird mit Trypsin verdaut und mittels SCX-Chromatographie aufgetrennt. Peptide, die eine Ladung von +4 oder höher tragen, werden gesammelt, da hier die Cross-Links enthalten sind.

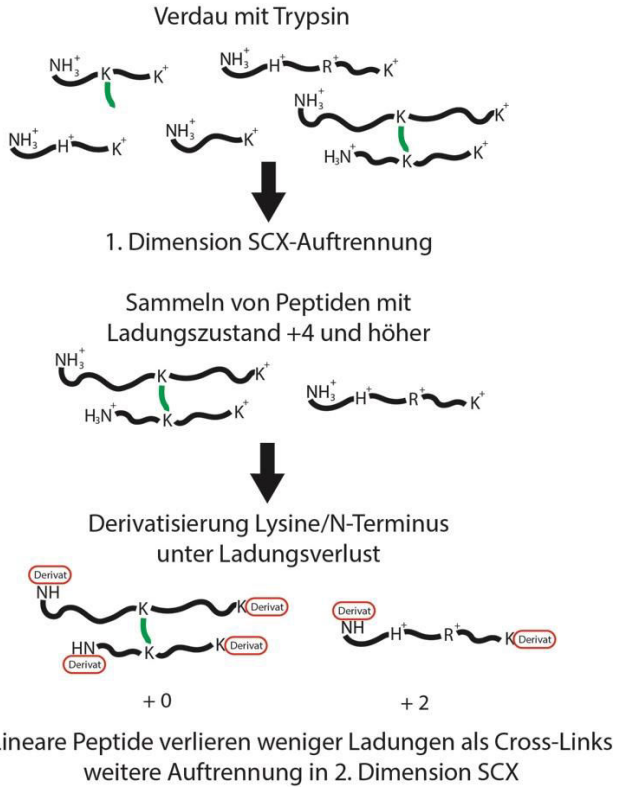

Abbildung 4-18: Schematischer Ablauf einer Anreicherung von Cross-Link Peptiden mit ChaFRADIC mit einer Modifikation an freien Aminen (Lysine und N-Terminus).

Um coeluierte, lineare Peptide zu entfernen, werden alle Peptide anschließend mit einer Modifikation an Lysinen und N-Termini versehen. Cross-Link Peptide verlieren dadurch zwei bis vier Ladungen und shiften in die Fraktionen mit den Ladungen 0, +1 und +2, wohingegen lineare Peptide, die zuvor +4-fach geladen waren, weniger Ladungen verlieren können. Zum einen enthalten diese Peptide überlesene Schnittstellen (Lysin/Arginin) und vor allem Histidin – können aber nur durch N-Terminus und Lysin-Derivatisierung Ladungen verlieren. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass diese Peptide zwei oder mehr Ladungen behalten. Die Fraktionen mit den niedrigen Ladungszuständen 0, +1 und +2 werden dann gesammelt und analysiert, da hier Cross-Link Peptide angereichert und lineare Peptide abgereichert sind. Es gilt hier zu bewerten, ob dieser unpräzise Ladungs-Shift für eine effiziente Anreicherung ausreichend wäre.

Die erste Derivatisierung, die untersucht wurde, war das Labeling von freien Aminen mit einem Phenylacetyl-Rest, der durch die Protease Penicillin-Acyclase wieder abgespalten werden kann[94].

Um die Effizienz dieser Derivatisierung und deren Abspaltung zu testen, wurden synthetische Peptide mit dem Phenylacetyl-Rest modifiziert. Nach Entsalzen der modifizierten Peptide wurden diese mit der Protease Penicillin-Acyclase versetzt, um den Phenylacetyl-Rest wieder abzuspalten.

Es wurden die beiden Peptide FYVHNDIFR und VGGHAAEYGAEALER, die beide nur am N-Terminus mit einem Phenylacetyl-Rest modifiziert werden können, verwendet. Von jedem Peptid wurde anschließend 1 pmol mittels LC-MS analysiert (Orbitrap XL, ID: B1).

Abbildung 4-19 zeigt die Ergebnisse des Peptids VGGHAAEYGAEALER. Im oberen TIC Chromatogramm ist zu erkennen, dass das Peptid nach der Label-Reaktion zum größten Teil die gewünschte Modifikation am N-Terminus trug – jedoch war auch ein Teil ohne verblieben. Im unteren Teil der Abbildung ist das TIC-Chromatogramm des Peptids mit Phenylacetyl-Modifikation nach Inkubation mit dem Enzym Penicillin-Acyclase zu sehen. Das Peptid wurde entgegen der in der Literatur beschriebenen Spezifität der Penicillin-Acyclase an den Peptidbindungen gespalten, wohingegen der Phenylacetyl-Rest weiterhin am N-Terminus war.

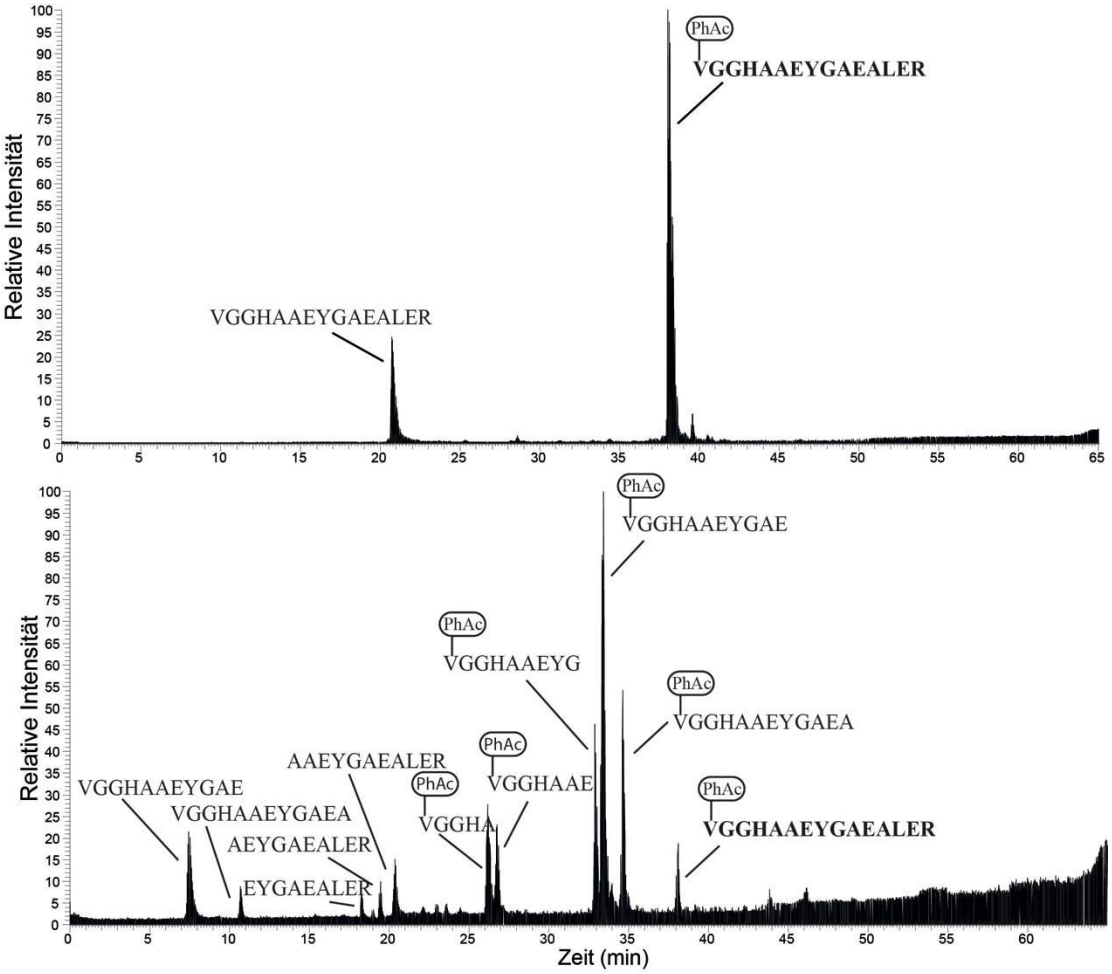

Abbildung 4-19: TIC-Chromatogramme des Peptids VGGHAAEYGAEALER mit Phenylacetyl-Modifikation (oben) und nach Inkubation mit Penicillin-Acyclase (unten). Es entstanden zahlreiche, unerwünschte Peptidfragmente.

Abbildung 4-20 zeigt die TIC Chromatogramme des Peptids FYVHNDIFR mit Phenylacetyl-Modifikation (oben) und nach der Inkubation mit Penicillin-Acyclase (unten). Auch hier war zu erkennen, dass die Derivatisierung nicht vollständig war und unmodifiziertes Peptid verblieben war. Nach der Inkubation mit dem Enzym zur Phenylacetyl-Abspaltung war nur ein Fragment des ursprünglichen Peptids detektierbar. Auch hier gab es also unerwünschte Spaltungen an Peptidbindungen. Da das zweite Peptid wesentlich kürzer war als das erste, ist es wahrscheinlich, dass die weiteren Fragmente zu klein waren, um detektiert werden zu können.

Diese Ergebnisse zeigten, dass bei der Modifikation mit Phenylacetyl-N-succinimid die Effizienz nicht ausreichend war und die Reaktion verbessert werden musste. Allerdings zeigte die Inkubation mit Penicillin-Acyclase auch eine unerwartete Spaltung von Peptidbindungen, wohingegen der Phenylacetyl-Rest unverändert am Peptid verblieben war. Eine mögliche Erklärung für den Misserfolg dieses Ansatzes könnten ungeeignete Inkubationsbedingungen gewesen sein, wobei dann eine ausbleibende/geringere anstatt einer so unspezifischen

Aktivität zu erwarten gewesen wären. Aufgrund der unspezifischen und unerwünschten Spaltung durch die Penicillin-Acyclase wurde dieser Ansatz daher verworfen.

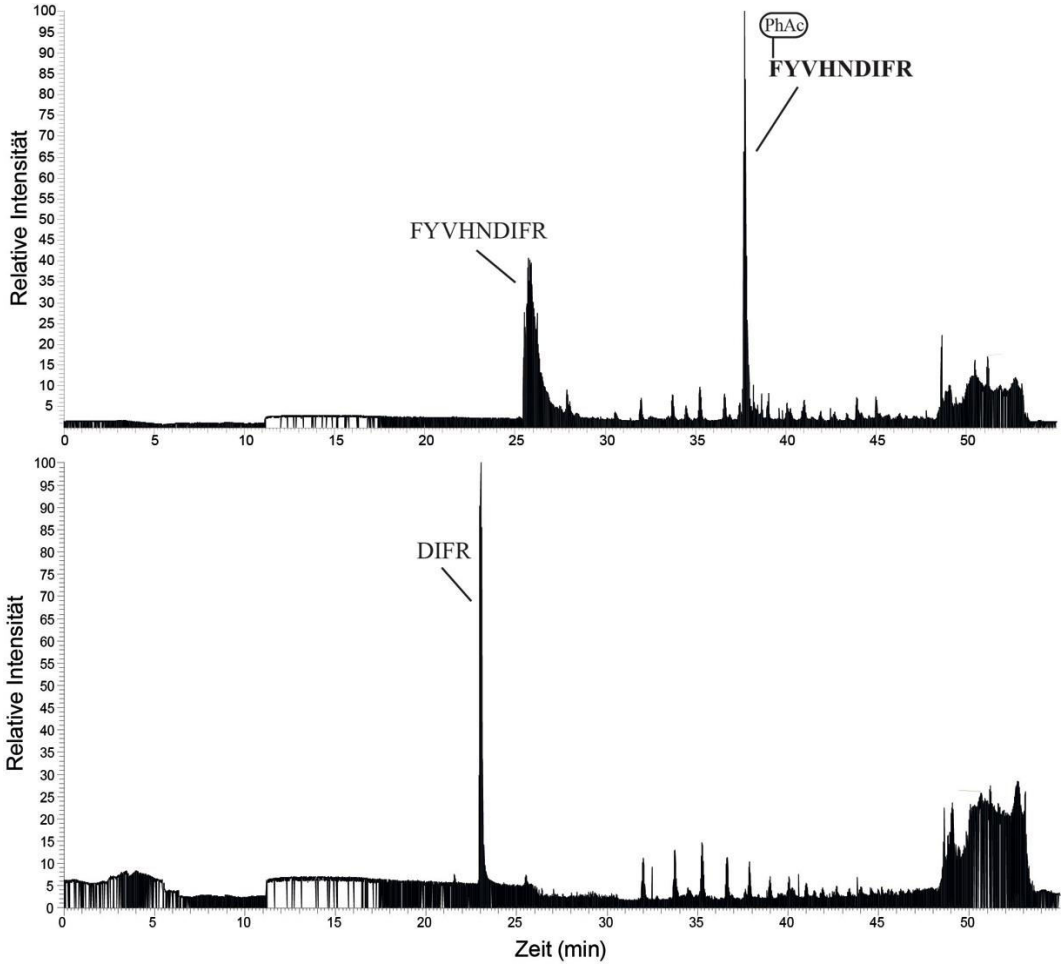

Abbildung 4-20: TIC-Chromatogramme vom Peptid FYVHNDIFR mit Phenylacetyl-Modifikation (oben) und nach der Abspaltung des Phenylacetyl-Rests mit Penicillin-Acyclase (unten).

Eine weitere Derivatisierung, die getestet wurde, war die Boc-Schutzgruppe (tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe, Abbildung 4-21), die in der organischen Synthese, speziell in der Peptidsynthese, weit verbreitet ist[98]. Mit der Boc-Schutzgruppe können Amine vor weiteren Reaktionen geschützt werden und verlieren zusätzliche ihre Ladung. Unter sauren Bedingungen lässt sich die Schutzgruppe leicht wieder abspalten. Dadurch wird das Amin mit der positiven Ladung in saurem pH wiederhergestellt. Diese Ladungsvariabilität ist für eine Anreicherung mittels ChaFRADIC von besonderem Interesse, da die Peptidauftrennung durch Ladungsunterschiede realisiert wird.

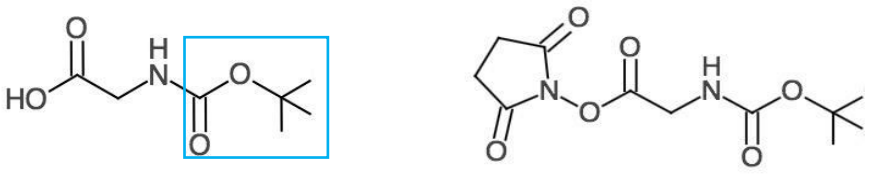

Abbildung 4-21: Links: Glycin mit Boc-Schutzgruppe am Aminrest (blaue Box). Rechts: verwendetes Reagenz Boc-Glycin-N-hydroxysuccinimidester.

Um die Derivatisierungsreaktion zu vereinfachen, wurde nicht das klassische Reagenz für die Boc-Schutzgruppe (Di-tert-butylcarbonat, sehr giftig) verwendet, das unter basischen Bedingungen an Amine bindet. Stattdessen kam bereits modifiziertes Boc-Glycin zum Einsatz, das über eine Hydroxysuccinimidester-Gruppe mit Aminen reagieren kann – das gleiche Reaktionsprinzip wie bei der Phenylacetyl-Derivatisierung, das bei neutralem pH-Wert simpel und effizient durchgeführt werden kann. Dadurch werden Peptide am N-Terminus und an der Lysin-Seitenkette um die Aminosäure Glycin verlängert. Da im Labor zunächst das Reagenz Boc-Alanin-N-hydroxysuccinimidester zur Verfügung stand, wurde dieses genutzt, um die grundsätzliche Verwendbarkeit zu testen. Um später die Massenänderung am Peptid so gering wie möglich zu halten, wurde danach auf die Boc-Glycin-Modifikation zurückgegriffen. Außerdem wurden die Reaktionsbedingungen im Vergleich zur Phenylacetyl-Modifikation insofern verändert, dass ein hoher Anteil von Isopropanol zur Reaktionslösung gegeben wurde, um die Bindung an Amine zu verbessern – zuvor war die Reaktionsausbeute nicht zufriedenstellend.

Auch hier wurde wieder ein synthetisches Peptid (GVTSAPDTKPAPGSR) verwendet, um die Bindung, Stabilität und Abspaltung der Modifikation zu testen (1 pmol, Orbitrap XL, ID: B1).

Das Peptid mit zwei Modifikationen am Lysin und N-Terminus war das Hauptprodukt und nur ein vernachlässigbarer, kleiner Anteil trug eine Modifikation. Durch die verbesserten Bedingungen zeigte die Reaktion hier eine sehr gute Ausbeute. Da die Boc-Gruppe unter sauren Bedingungen abgespalten wird, wurde anschließend die Stabilität der Modifikation während des Entsalzens (mit 0,1 % TFA) und im SCX-Puffer (pH = 2,7) überprüft, da ein saures Milieu hier unumgänglich war. Es erfolgte ein Vergleich innerhalb einer Probe, wie das Verhältnis des unerwünschten Peptids mit abgespaltener Boc-Modifikation zum Peptid mit intakter AlaBoc-Modifikation war.

In Tabelle 4-8 sind die Flächen der Peaks mit gewünschter AlaBoc- und unerwünschter Ala-Modifikation für die drei Proben zusammengefasst. Direkt nach dem Labeling (1) lagen weniger als 0,1 % des Peptids in der unerwünschten Form ohne Boc-Gruppe vor. Nach dem Entsalzen mit 0,1 % TFA (2) und der Inkubation mit SCX A-Puffer (3) stieg der Anteil auf rund 1,5 %, was zwar eine deutliche Steigerung, aber immer noch vernachlässigbar wenig war. Sowohl das Entsalzen mit 0,1 % TFA als auch die Inkubation mit SCX-Puffer mit

niedrigem pH-Wert stellten also kein Problem für die Stabilität der Boc-Schutzgruppe im geplanten Anreicherungs-Ablauf dar.

Tabelle 4-8: Flächen (AUC) der Peaks von Peptid GVTSAPDTKPAPGSR mit AlaBoc- bzw. Ala-Modifikation am N-Terminus und Lysin nach (1) Labeling, (2) Entsalzen und (3) Inkubation in SCX A-Puffer (3 h, 30 °C). AUC = Area under curve.

m/z	891,9667	791,9126	**Verhältnis Ala/AlaBoc**
Modifikation	**2x AlaBoc**	**2x Ala**	
Probe	**Intensität (AUC)**		
(1) nach AlaBoc-Modifikation	2,64E+09	1,09E+06	0,04 %
(2) nach Entsalzen mit 0,1 % TFA	4,24E+09	6.34E+07	1,5 %
(3) nach SCX-A-Inkubation	2,87E+09	4,28E+07	1,5 %

Abschließend wurden die optimalen Abspaltungskonditionen für die Boc-Schutzgruppe bestimmt. Das Boc-Alanin-Peptid wurde mit 20 %, 30 %, 40 % und 50 % TFA inkubiert, um zu sehen, welche Konzentration ausreichend war, um die Boc-Schutzgruppe komplett abzuspalten. Ziel war es, die TFA-Konzentration so gering wie möglich zu halten, da TFA sehr ätzend, gesundheits- und umweltschädlich ist. Gemessen wurde jeweils 1 pmol des Peptids nach Abspaltung (Orbitrap XL, ID: B1).

In Tabelle 4-9 sind die Werte der Peakflächen des Peptids mit Ala- und verbliebener AlaBoc-Modifikation (2x Ala bzw. 2x Ala-Boc) mit den Verhältnissen zueinander zusammengefasst. Bei allen TFA-Konzentrationen ist nur ein sehr geringer Anteil von 3 % oder weniger AlaBoc-modifiziertem Peptid zurückgeblieben. Da dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde, zeigen die Ergebnisse nur, dass jede Konzentration für eine ausreichende Abspaltung gut geeignet ist. Um eine vollständige Abspaltung sicherzustellen, wurde für die weiteren Versuche 30 % TFA gewählt.

Tabelle 4-9: Flächen (AUC) der Peaks des Peptids GVTSAPDTKPAPGSR mit Ala- bzw. AlaBoc-Modifikation am N-Terminus und Lysin nach Inkubation mit (1) 50 % TFA, (2) 40 % TFA (3) 30 % TFA, (4) 20 % TFA für 30 min bei 37 °C zur Abspaltung der Boc-Gruppe. AUC = Area under the curve.

m/z	891,9667	791,9126	**Verhältnis AlaBoc/Ala**
Modifikation	**2x AlaBoc**	**2x Ala**	
Probe	**Intensität (AUC)**		
(1) 50 % TFA	2,09E+07	6,92E+08	3,0 %
(2) 40 % TFA	1,96E+07	1,22E+09	1,6 %
(3) 30 % TFA	1,19E+06	3,84E+08	0,3 %
(4) 20 % TFA	1,18E+07	3,80E+08	3,1 %

Aufgrund der sehr guten Ergebnisse zur Label-Effizienz, Stabilität und Abspaltung der Boc-Modifikation wurde im nächsten Schritt BSA-BS^3-$d_{0/4}$ mit Trypsin verdaut und mit GlyBoc derivatisiert. Anschließend wurde die Boc-Gruppe wieder abgespalten, um zu überprüfen, ob die Gly-Modifikation einen negativen Einfluss auf die Ionisierung, Fragmentierung und Identifizierung von Cross-Link-Peptiden hat. Die Ausgangsprobe ohne Modifikation sowie die Probe mit Gly-Modifikation wurden nach LC-MS/MS-Messung mit pLink nach Cross-Links durchsucht. Es wurden jeweils drei Mess-Replikate analysiert (2 pmol, Orbitrap Velos Pro, ID: A3). Proben mit intakter GlyBoc-Modifikation sind mittels LC-MS/MS nicht zugänglich, da bei diesen Peptiden während der Fragmentierung nur die Boc-Gruppe abgespalten wird und nicht das Peptid selbst fragmentiert wird.

Abbildung 4-22 zeigt die drei TIC-Chromatogramme von BSA-BS^3-$d_{0/4}$ vor dem Labeling, mit GlyBoc-Modifikation und nach der Boc-Abspaltung. Es ist zu erkennen, dass ein Shift zu späteren Retentionszeiten durch das GlyBoc-Label auftrat. Dies ist durch die erhöhte Hydrophobizität der Peptide mit der GlyBoc-Modifikation zu erklären: Zum einem wurden positive Ladungen maskiert und zum anderen wurde durch die Boc-Gruppe mit drei Methylgruppen ein hydrophober Rest eingeführt. Bei der RP-Chromatographie mit hydrophobem Säulenmaterial führte dies zu einer generell erhöhten Retentionszeit der Peptide.

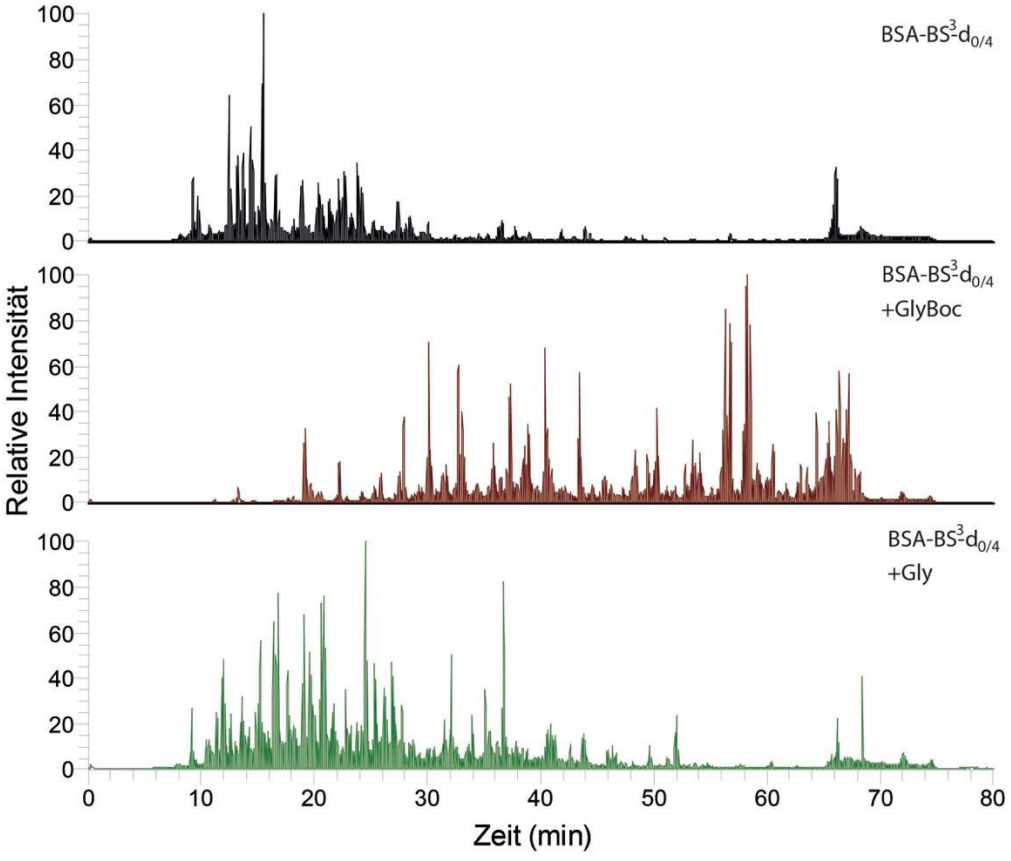

Abbildung 4-22: Chromatogramme (TIC) von BSA-BS^3-$d_{0/4}$ (2 pmol) ohne Label (schwarz), mit GlyBoc-Label (rot) und nach Boc-Abspaltung (grün).

Die identifizierten Cross-Links von jeweils drei Replikaten für BSA-BS^3-$d_{0/4}$ mit und ohne Gly-Label sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst. Die detaillierten Ergebnisse für jedes Replikat finden sich im Anhang (Tabelle 8-4). Es wurden nur Identifizierungen berücksichtigt, die in zwei von drei Replikaten gefunden wurden.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Gly-Labeling die Identifizierung von Cross-Links nicht negativ beeinflusste, sondern im Gegenteil in den meisten Fällen die Identifizierung sogar verbesserte. Es konnten in der gleichen Probe mit Gly-Label am N-Terminus und Lysin mehr Cross-Links identifiziert werden und zusätzlich verbesserten sich die Scores der Treffer deutlich.

Tabelle 4-10: Zusammenfassung der identifizierten Cross-Links in BSA-BS^3-$d_{0/4}$ (10x) ohne (BSA XL) und mit Gly-Modifikation (BSA XL+Gly), jeweils 3 Mess-Replikate zusammengefasst; es ist jeweils der Mittelwert der Scores genannt. AA1/2 = Aminosäure ½, Score = pLink Score, ppm = Massenabweichung.

			BSA XL			BSA XL+Gly		
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**Score**	**ppm**	**Isotopen-muster**	**Score**	**ppm**	**Isotopen-muster**
1	12	19,5	-	-	-	3.01E-05	-0,1	ja
116	431	21,3	-	-	-	1.99E-04	1,0	ja
180	187	11,0	-	-	-	3.11E-03	1,5	ja
187	221	20,3	6.67E-03	-2,3	ja	5.52E-07	-0,1	ja
187	431	13,7	5.28E-03	0,3	ja	1.49E-04	-0,3	ja
187	439	18,2	1.21E-05	-0,3	ja	1.91E-06	0,7	ja
187	280	20,0	1.46E-03	-0,3	ja	5.16E-05	5,1	ja
221	439	20,5	6.45E-03	1,0	ja	4.78E-06	-0,2	ja
350	474	18,0	5.09E-05	0,5	ja	4.13E-05	-1,6	ja
431	439	13,5	1.15E-04	-0,5	ja	7.89E-06	-0,3	ja

Diese Proben wurden ohne den Zwischenschritt des Entsalzens analysiert, um mögliche Probenverluste auszuschließen. Im folgenden Versuch wurde die Probe mit intaktem GlyBoc-Label entsalzt, um mögliche Peptid-Verluste beim Durchführen eines ChaFRADIC-Protokolls zu erkennen. Durch die erhöhte Hydrophobizität besteht die Möglichkeit, dass durch eine stärkere Interaktion mit dem C18-Material nicht alle Peptide komplett eluiert werden können. Im Vergleich dazu wurde die Probe ebenfalls mit C4-Material entsalzt, das weniger hydrophob ist und daher eine schwächere Interaktion mit den Peptiden haben sollte.

Jeweils 3 Mess-Replikate wurden vor und nach C4- bzw. C18-Entsalzen gemessen und die TIC-Chromatogramme (Abbildung 4-23, jeweils Replikat 1 gezeigt) wurden hinsichtlich Intensität und Peaks verglichen (2 pmol, Orbitrap Velos Pro, ID: A3). Es fiel sofort auf, dass

sich nach dem Entsalzen unabhängig vom verwendeten Material sowohl die Intensität der Probe verringerte als auch das Peakmuster veränderte. Insbesondere im hinteren Bereich des Chromatogramms, wo die hydrophoben Peptide eluieren, wurde die Intensität der Peptide stark verringert. Dies entsprach der Erwartung, dass die ohnehin schon hydrophoben Peptide, die durch das GlyBoc-Label noch hydrophober wurden, beim Entsalzen auch mit 100 % Acetonitril nicht gut eluiert werden konnten.

Insgesamt unterschieden sich die Ergebnisse des Entsalzens der Proben mit C4- bzw. C18-Material aber kaum, sodass aufgrund der Chromatogramme keine Entscheidung hinsichtlich des besseren Materials getroffen werden konnte.

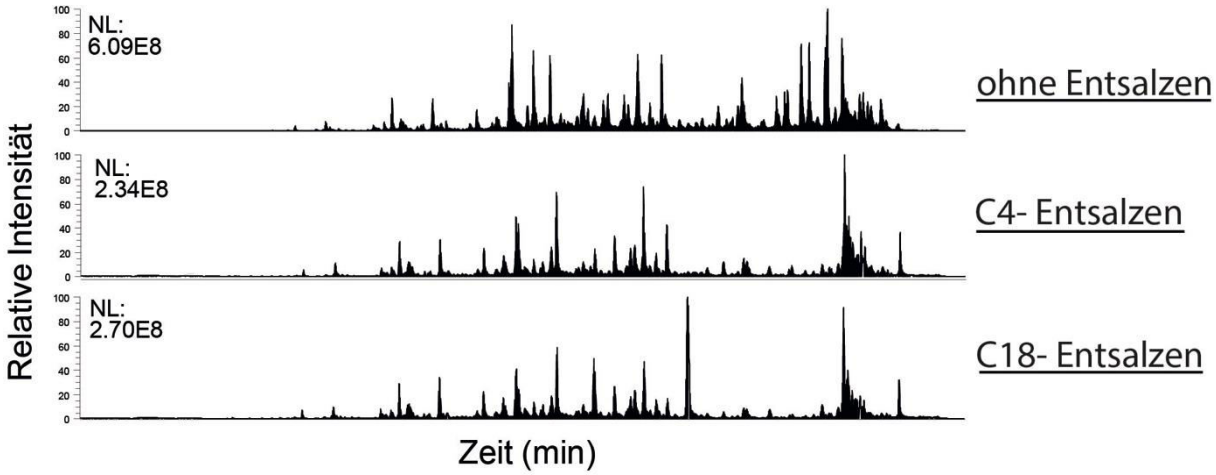

Abbildung 4-23: TIC-Chromatogramme der drei BSA-BS^3-d$_{0/4}$-Proben (Replikat 1) mit GlyBoc-Modifikation ohne Entsalzen, mit C4-Enstsalzen und nach C18-Entsalzen.

Im Folgenden wurden die Proben nach dem Entsalzen wieder mit 30 % TFA inkubiert, um die Boc-Gruppe abzuspalten und nach Cross-Links suchen zu können. Jeweils drei Mess-Replikate (C18- und C4-entsalzt) wurden erneut gemessen und mit pLink nach Cross-Links durchsucht (2 pmol, Orbitrap Velos Pro, ID: A3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-11 zusammengefasst. Die ausführlichen Ergebnisse finden sich im Anhang (Tabelle 8-5).

Tabelle 4-11: Zusammenfassung der identifizierten Cross-Links in BSA-BS^3-d$_{0/4}$ (10x) mit Gly-Modifikation nach C4- und C18-Entsalzen. Jeweils 3 Mess-Replikate zusammengefasst, die Mittelwerte der Scores sind genannt. AA1/2 = Aminosäure ½, Score = pLink Score, ppm = Massenabweichung.

			C4			C18		
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**Score**	**ppm**	**Isotopen-muster**	**Score**	**ppm**	**Isotopen-muster**
1	12	19,5	3.92E-04	-0.5	ja	1,99E-04	-2.1	ja
116	431	21,2	2.15E-04	0.1	ja	7,39E-04	0.0	ja
180	187	11,0	5.12E-04	-0.9	ja	4,92E-04	-1.5	ja
187	221	20,3	7.70E-07	-0.4	ja	1,19E-06	-0.8	ja
187	431	13,7	9.15E-05	-0.1	ja	1,96E-05	-0.3	ja
187	439	18,2	7.06E-06	-1.1	ja	5,86E-06	-0.8	ja
187	280	20,0	-	-	-	1,32E-04	-2.0	nein
221	439	20,5	6.13E-08	-1.1	ja	8,09E-09	-1.6	ja
431	439	13,5	1.06E-06	0.9	ja	1,17E-06	1.2	ja

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die wiedergefundenen Cross-Links zwischen den beiden Materialien nicht stark unterschieden. Der einzige Unterschied bestand darin, dass bei Verwendung des C4-Materials ein Cross-Link nicht wieder identifiziert wurde. Dieser Cross-Link wies allerdings auch beim C18-Material schlechte Identifizierungsmerkmale auf. Verglich man nun alle erhaltenen Ergebnisse, erhielt man eine gute Übersicht der Auswirkungen der Modifikation für Cross-Link Identifizierungen (Tabelle 4-12).

Tabelle 4-12: Übersicht der identifizierten Cross-Links in BSA-BS^3-d$_{0/4}$ ohne Gly-Modifikation (BSA XL), mit Gly-Modifikation ohne Entsalzen (BSA XL Gly), mit Gly-Modifikation mit C4-Entsalzen (BSA XL Gly C4) und mit Gly-Modifikation mit C18-Entsalzen (BSA XL Gly C18).

AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**BSA XL**			**BSA XL Gly**			**BSA XL Gly C4**			**BSA XL Gly C18**		
1	12	19,5	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x
116	431	21,3	-	-	-	x	x	x	x	x	-	-	x	x
180	187	11,0	-	-	-	x	-	x	x	x	x	x	x	x
187	221	20,3	x	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x
187	431	13,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
187	439	18,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
187	280	20,0	x	x	-	x	x	-	x	-	-	x	x	-
221	439	20,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
350	474	18,0	x	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-
431	439	13,5	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass mit Gly-Label mehr Cross-Link Identifizierungen möglich waren als ohne diese Modifikation. Zusätzlich verbesserten sich die Scores der Identifizierungen durch das Gly-Label deutlich, was ebenfalls als positiv zu bewerten war. Das notwendige Entsalzen hatte kaum einen Einfluss auf die Wiedergewinnung der Cross-Link Peptide, obwohl die Chromatogramme auf systematische Verluste schließen ließen. Es war festzustellen, dass für die geringen Proteinmengen, die hier zum Einsatz kamen, noch Optimierungsspielraum bezüglich des Entsalzens gab. Es ging bei beiden Materialien ein Cross-Link verloren, der nicht mehr identifiziert werden konnte. Daher konnte weiterhin das übliche C18-Material verwendet werden. Aufgrund der positiven Ergebnisse, die zeigten, dass das Labeling die Identifizierung von Cross-Links verbesserte, wurde im Folgenden für eine Anreicherung von Cross-Link Peptiden das Gly-Boc-Labeling mit BSA-BS^3-$d_{0/4}$ evaluiert.

4.4.3 ChaFRADIC mit GlyBoc-Labeling (Gly-ChaFRADIC)

Für die ChaFRADIC-Anreicherung mit GlyBoc-Labeling wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt (Abbildung 4-24): (1) Die Probe wurde mit Trypsin verdaut und entsalzt. (2) Es wurde in der ersten SCX-Auftrennung der Ladungsbereich mit den Cross-Link Peptiden gesammelt (+4-Fraktion, 51-76 min). Diese Fraktion wurde komplett eingedampft und in 100 mM HEPES (pH = 9) gelöst. Der pH-Wert wurde zwischen 7 und 9 eingestellt. (3) Danach wurden N-Termini und Lysine mit GlyBoc-Label modifiziert. Anschließend wurde die Fraktion entsalzt und erneut mittels (4) SCX-Chromatographie aufgetrennt. Die Fraktionen mit niedrigen Ladungszuständen wurden gesammelt (Flow trough: 0-5 min, Fraktion +1: 5-15 min, Fraktion +2: 15-40 min), eingedampft und mit 30 % TFA zur Boc-Abspaltung inkubiert (5). Anschließend wurde die Probe für die LC-MS/MS-Messung erneut entsalzt. Der Versuch wurde dreimal mit jeweils 10 µg BSA-BS^3-$d_{0/4}$ (10x) durchgeführt und es wurden jeweils 100 % der drei Fraktionen nach der zweiten Dimension mittels LC-MS/MS analysiert (Orbitrap Velos Pro, ID: B3).

In Tabelle 4-13 sind die Ergebnisse der Anreicherung mit GlyBoc-Modifikation zusammengefasst. Eine Tabelle mit Scores und den weiteren Bewertungskriterien findet sich im Anhang (Tabelle 8-6). Bei diesem Versuch konnte man erneut sehen, dass sich die Scores durch das Gly-Labeling deutlich verbesserten. Zum Vergleich wurde die Ausgangsprobe (Kontrolle in Tabelle 4-13; 2 pmol, Orbitrap Velos Pro, ID: A3) ohne Anreichung direkt nach dem Trypsin-Verdau ebenfalls dreimal mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Tabelle 8-7 im Anhang).

Tabelle 4-13: Ergebnisse der drei Replikate von Gly-ChaFRADIC von BSA-BS^3-d$_{0/4}$ (10 µg, rechts) und der Kontrolle ohne Anreicherung (links, 3 Replikate, angegeben sind Treffer, die in zwei von drei Replikaten gefunden wurden). Gefundene Cross-Links sind durch „x“ markiert. xx = nur mit Anreicherung identifiziert. Ctrl. = Kontrolle ohne Anreicherung. Fr. = Fraktion. Violett = nicht gefunden mit nach Anreicherung.

				Replikat 1			Replikat 2			Replikat 3		
AA 1	AA 2	Abstand (Å)	Ctrl.	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3
1	239	22,7		-	**xx**	-	**xx**	-	-	-	**xx**	-
1	12	19,5	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x
114	431	19,9	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	431	21,3	x	x	x	x	x	x	x	-	x	x
116	523	18,0		-	**xx**	**xx**	**xx**	**xx**	-	**xx**	**xx**	-
180	187	11,0	x	-	x	x	-	x	-	x	x	x
187	280	20,0		-	x	-	x	x	-	x	x	-
187	221	20,3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
187	431	13,7	x	-	x	x	-	x	x		x	x
187	439	18,2	x	-	x	x	-	x	x	x	x	x
221	439	20,5	x	x	x	x	-	x	x	x	x	x
431	439	13,5	x	-	x	x	-	x	x	x	x	x
524	544	14,3	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			10	11			11			11		

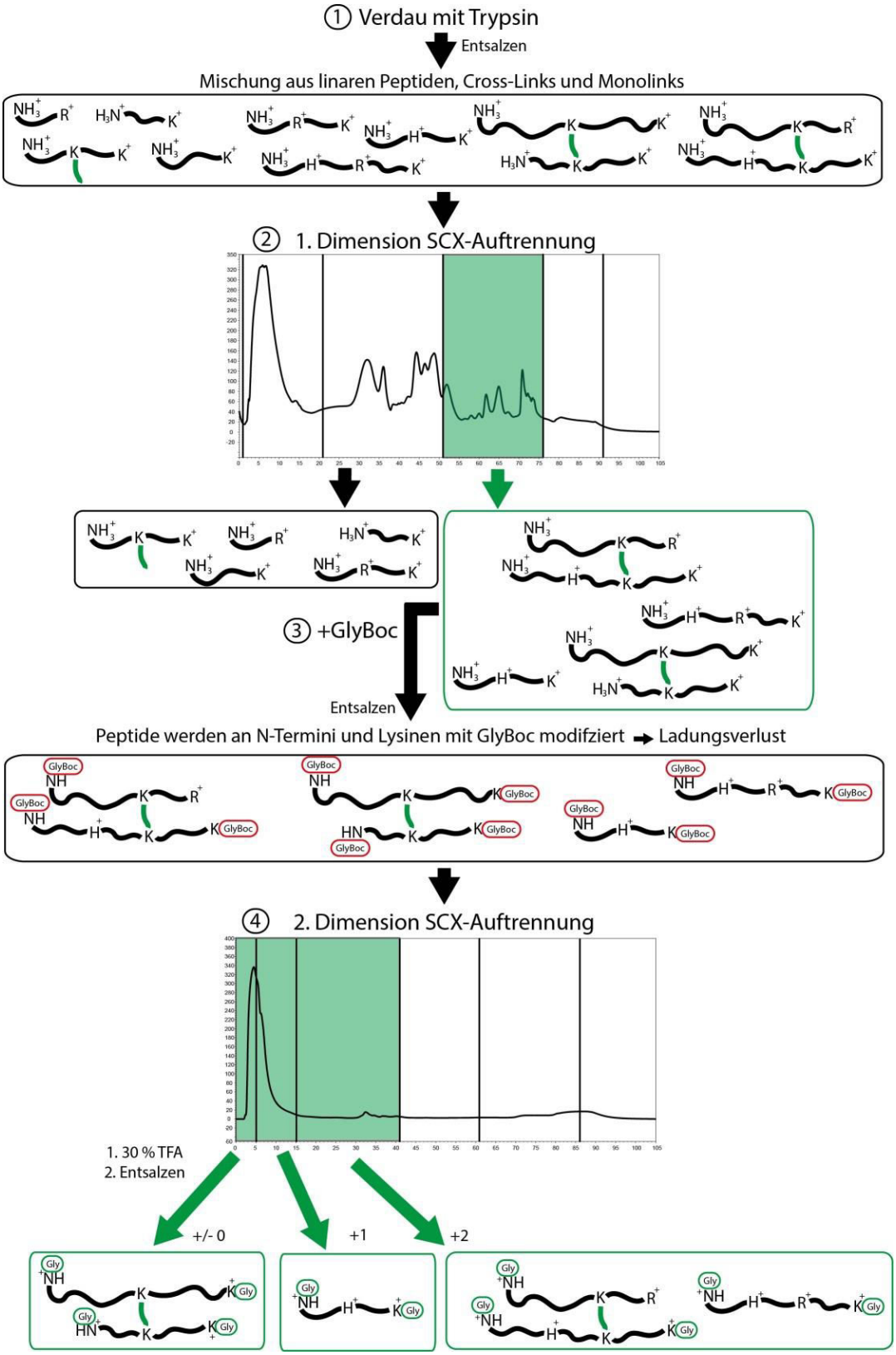

Abbildung 4-24: Schematischer Ablauf der Anreicherung von Cross-Link Peptiden mit ChaFRADIC mit GlyBoc-Modifikation (Gly-ChaFRADIC). Die Probe wird mit Trypsin verdaut (1) und mittels SCX aufgetrennt, wobei nur die Fraktion mit Cross-Links gesammelt wird (2). Diese Fraktion wird mit GlyBoc modifiziert (3) und erneut mit SCX aufgetrennt (4). Lineare Peptide shiften durch das Labeling anders als Cross-Link Peptide und werden dadurch voneinander getrennt. Die ersten drei Fraktionen werden gesammelt und analysiert.

Es war zu erkennen, dass mit der Anreicherung zwei zusätzliche Cross-Links identifiziert wurden (AA1-K239, AA116-K523). Es konnten allerdings auch zwei Cross-Links nach der Anreichung nicht wiedergefunden werden (AA114-AA431 und AA524-AA544, violett in Tabelle 4-13). Insgesamt verbesserten sich die Scores der Peptide mit Gly-Modifikation, genau wie es schon bei den vorherigen Versuchen beobachtet wurde. Die Peptidsequenzen der identifizierten Cross-Links finden sich in Tabelle 8-8 im Anhang.

Die Cross-Links eluierten aufgrund der verringerten Ladung in der zweiten SCX-Auftrennung in den frühen Fraktionen am Anfang – allerdings nicht einheitlich, sodass in den ersten drei Fraktionen jeweils sehr viele Cross-Links gefunden wurden. Trotz der etwas unspezifischen Anreicherung konnten allerdings Cross-Links identifiziert werden, die ohne Anreicherung nicht gefunden wurden.

Für diesen Versuch wurde anschließend die Anreicherungseffizienz untersucht. Dazu wurden die MS-Dateien der Proben ohne und mit Anreicherung über den ProteomeDiscoverer (Version 1.3) mit Mascot (Version 2.4, Matrix Science) gegen die komplette UniProt-Datenbank durchsucht (siehe Kapitel 3.9.1, lineare Peptide). Die identifizierten, linearen Peptide von BSA wurden zwischen den Replikaten vor und nach Anreicherung verglichen – dabei wurden nur Peptide berücksichtigt, die in zwei von drei Replikaten mit 5 % False Discovery Rate identifiziert werden konnten.

Die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang in Tabelle 8-9. Ohne Gly-ChaFRADIC-Anreicherung wurden 42 lineare BSA Peptide gefunden. Von diesen konnten 11 nach der Anreicherung nicht mehr identifiziert werden (26 %); 31 Peptide waren auch nach der Anreicherung noch in der Probe nachweisbar (74 %).

Von diesen 31 Peptiden hatten 14 Peptide in der ersten SCX-Dimension und davon wiederum 12 Peptide in der zweiten SCX-Auftrennung die gleichen Ladungszustände wie Cross-Link Peptide und waren daher nicht vermeidbar. Die restlichen 17 Peptide hatten schon in der ersten Dimension einen niedrigen Ladungszustand von +3 oder weniger und müssen daher als Kontamination betrachtet werden.

Nach der Anreicherung mit Gly-ChaFRADIC wurden 19 lineare BSA-Peptide identifiziert, die vorher nicht gefunden werden konnten. Von diesen coeluierten acht Peptide in der ersten Dimension berechtigterweise, da sie eine Ladung von +4 oder höher aufwiesen. Wiederum fünf dieser acht Peptide hatten auch in der zweiten Dimension den gleichen Ladungszustand wie Cross-Link Peptide. 11 Peptiden waren schon in der ersten Dimension niedrig geladen (+2/+3) und waren eine Kontamination. Die vergleichsweise hohe Anzahl dieser Peptide wies auf eine unsaubere Trennung zwischen der Fraktion der dreifach und vierfach positiv geladenen Peptide hin.

Unter den insgesamt 50 linearen Peptiden, die nach der Anreicherung identifiziert wurden, waren also 33 Peptide, die unerwünscht coeluierten. Dadurch ergab sich eine Anreicherungs-

Effizienz von 34 %. Von den 10 Cross-Link Peptiden, die in der Kontrolle ohne Anreicherung gefunden wurden, konnten acht auch nach Anreicherung identifiziert werden, was einer Wiederfindungsrate von 80 % entsprach.

Durch die unpräzise Verschiebung der Ladung in der zweiten Dimension ergab sich eine schlechte Anreicherungseffizienz, die allerdings durch eine verbesserte Ladungsauftrennung optimiert werden könnte. Diese Anreicherungsmethode bietet trotzdem viel Potenzial, da trotz der schlechten Effizienz neue Cross-Links identifiziert werden konnten und zusätzlich die Scores (und damit die Identifizierungssicherheit) stark gesteigert werden konnten.

4.4.4 Alternative Enzyme für Cross-Link Analyse

Anschließend wurde ein weiteres Konzept für eine Anreicherung mittels ChaFRADIC untersucht. Da der Einsatz von Trypsin mit dem ursprünglichen Ansatz (Dimethylierung in der ersten Dimension) nicht möglich war, wurden weitere Proteasen untersucht, die der Anreicherung mittels ChaFRADIC nützlich sein könnten.

Um die generelle Eignung von anderen Proteasen zur Analyse von Cross-Link zu bewerten, wurde je eine Probe BSA-BS^3-d$_{0/4}$ (10x Überschuss) ohne weitere Modifikation mit Chymotrypsin (Schnittstellen nach Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) und Subtilisin (unspezifisch) verdaut. Jede Probe wurde direkt dreimal mit LC-MS/MS analysiert (2 pmol, Orbitrap Elite, ID: A3 für Chymotrypsin, A4 für Subtilisin).

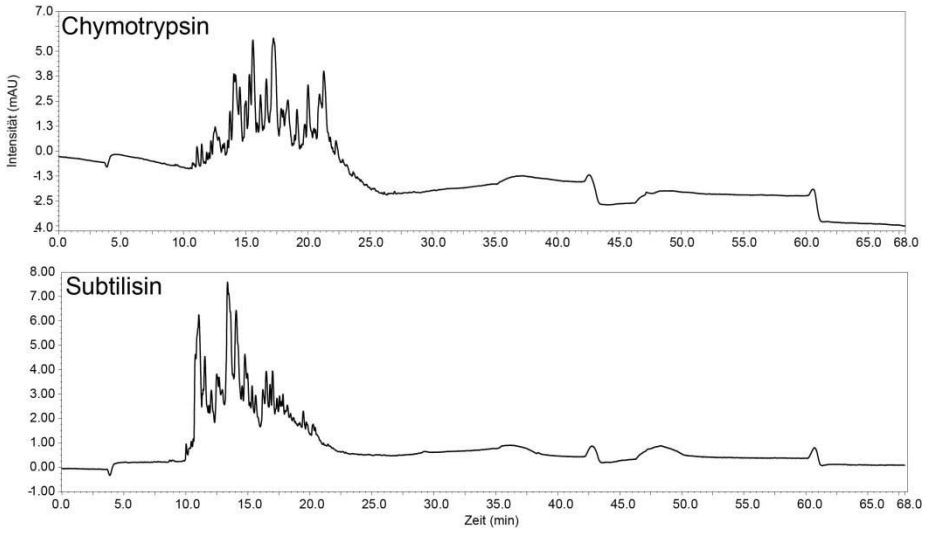

Abbildung 4-25: Verdau-Kontrollen von BSA-BS^3-d$_{0/4}$ mit Chymotrypsin (oben) und Subtilisin (unten). Jeweils 1 µg.

Abbildung 4-25 zeigt die Verdau-Kontrollen der beiden Proben. Sowohl Chymotrypsin als auch Subtilisin verdauten die Probe sehr gut – es blieb kein nicht-verdautes Protein zurück. In Tabelle 4-14 sind die identifizierten Cross-Links mit Chymotrypsin aus den drei Replikaten

zusammengefasst. Es wurden nur drei Cross-Links identifiziert, wohingegen mit Trypsin dreimal so viele Cross-Links gefunden werden konnten (siehe Tabelle 4-4, S. 63). Darunter waren zwei Cross-Links, die mit Trypsin standardmäßig nicht erfasst wurden (K114-K116 und K211-K350), wobei ein Cross-Link von benachbarten Aminosäuren (K114-K116) nicht von Interesse ist, da der Informationsgehalt sehr gering ist. Der dritte Cross-Link (K204-K350) wurde auch mit Trypsin gefunden.

Tabelle 4-14: Identifizierte Cross-Links in drei Replikaten von BSA-BS^3-d$_{0/4}$, verdaut mit Chymotrypsin. Ppm = Massenabweichung.

Chymotrypsin			Replikat 1			Replikat 2			Replikat 3		
AA1	AA2	Abstand (Å)	Score	ppm	Isotopen-muster	Score	ppm	Isotopen-muster	Score	ppm	Isotopen-muster
114	116	6,1	1.13E-05	2.08	ja	1.04E-03	1.28	ja	6.75E-05	-0.66	ja
211	350	13,5	-	-	-	4.19E-05	2.47	ja	2.97E-06	-0.71	ja
204	350	16,4	-	-	-	1.42E-04	-0.40	ja	4.07E-04	-0.31	ja

In der Probe, die mit Subtilisin verdaut wurde, konnten hingegen keine Cross-Links identifiziert werden.

Die geringen Identifizierungs-Zahlen bei der Verwendung von Chymotrypsin und Subtilisin sind nicht unbedingt auf die Proteasen selbst zurückzuführen: Das Suchprogramm pLink ist auf die Protease Trypsin ausgelegt und optimiert. Insbesondere die Suche nach Cross-Links mit unspezifischen Schnittstellen (Subtilisin) ist vom Suchaufwand sehr herausfordernd. pLink scheint für andere Proteasen nicht ausreichend optimiert und damit ungeeignet zu sein. Gerade bei Subtilisin ist nicht zu erwarten, dass keine analysierbaren Peptide nach dem Verdau entstehen. Auch Chymotrypsin erzeugt mit seinen vier möglichen Schnittstellen in Proteinen (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Leucin) sehr gleichmäßige Peptide.

Aufgrund der negativen Ergebnisse von Chymotrypsin und Subtilisin wurde als weiteres Enzym LysC untersucht. LysC spaltet Proteine C-terminal nach Lysinen, im Gegensatz zu Trypsin aber nicht nach Arginin. Dies bietet im Vergleich zu Chymotrypsin und Subtilisin den Vorteil, dass wie bei Trypsin Peptide mit definierten Ladungszuständen entstehen: Jedes Peptid hat mindesten am N- und C-Terminus eine positive Ladung. Da Lysin in Proteinen häufiger vorkommt als Arginin (Beispiel BSA: 23x Arginin und 59x Lysin), können Proteine mit LysC gleichmäßiger als mit Trypsin mit ArgC-Spezifität verdaut werden. Allerdings ist es beim Verdau mit LysC nicht möglich vorab eine Modifikation an Lysinen wie die Dimethylierung oder Gly-Boc-Labeling zu verwenden, da Lysin als einzige Schnittstelle für LysC nicht blockiert werden darf.

Für die notwendige Änderung des Ladungszustandes der Peptide in der zweiten Dimension von ChaFRADIC kann man sich allerdings die von LysC „überlesenen“ Schnittstellen nach Arginin zu nutzen machen. Diese „überlesenen“ Schnittstellen bei LysC im Vergleich zu

Trypsin führen zu Peptiden mit höheren Ladungszuständen. Führt man nun einen zweiten Verdau mit Trypsin mit durch, entstehen tryptische Peptide mit geringeren Ladungszuständen (Abbildung 4-26). Dadurch erhalten die Peptide zwei wichtige Eigenschaften: Zum einen verlieren die Peptide Ladungen und ändern ihr Elutionsverhalten in der SCX-Auftrennung; zum anderen sind die Endprodukte unmodifizierte (abgesehen von Cross-Links), tryptische Peptide, die sehr gut von Suchalgorithmen identifiziert werden können.

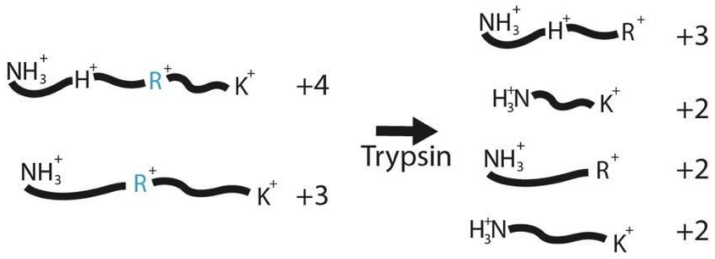

Abbildung 4-26: Peptide nach LysC-Verdau (links) haben hohe Ladungszustände aufgrund enthaltener Arginine ®. Durch Trypsin-Verdau (rechts) werden die Peptide nach Arginin erneut geschnitten und dadurch kürzer – mit niedrigeren Ladungszuständen. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde der C-Terminus (Arginin, Trypsin) nur als Buchstabe dargestellt (R, K) – die Ladung befindet sich der Seitenkette der Aminosäuren.

Betrachtet man die linearen und Cross-Link Peptide, die beim Verdau mit LysC bzw. Trypsin theoretisch entstehen, erkennt man, dass sich die Verteilung der Ladungszustände deutlich verändert (Abbildung 4-27). Beim Verdau mit LysC wird das Spektrum der möglichen Ladungszustände stark aufgefächert und die Cross-Link Peptide rutschen in den hinteren Bereich. Dies führt zu einer besseren Trennung von den linearen Peptiden. Bei Trypsin verteilen sich die möglichen Peptide auf einen kleinen Bereich der Ladungszustände und sind dadurch weniger gut trennbar.

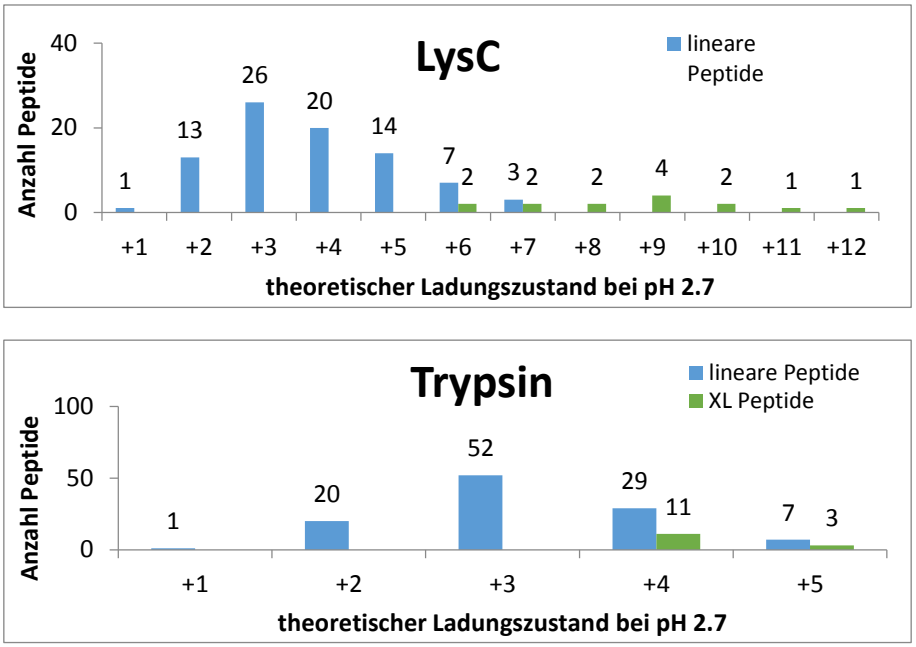

Abbildung 4-27: Theoretische Ladungsverteilung der linearen und Cross-Link Peptide von BSA nach Verdau mit LysC (oben) und Trypsin (unten) bei pH 2,7. Lineare Peptide sind in blau, Cross-Link Peptide in grün dargestellt. Der theoretische Verdau der linearen Peptide wurde mit MSDigest[99] durchgeführt (minimale Peptidlänge 5 Aminosäuren, maximal eine überlesene Schnittstelle, keine Modifikationen). Für die Cross-Link Peptide wurden die bekannten Cross-Link Peptide von BSA ausgewertet. Peptid-Daten in Tabelle 8-10, Tabelle 8-11 und Tabelle 8-12 im Anhang.

4.4.5 ChaFRADIC mit zweistufigem Verdau (XL-ChaFRADIC)

Aus der Einbindung des zweistufigen Verdaus mit LysC und Trypsin anstelle von chemischen Modifikationen ergab sich der folgende Ablauf der ChaFRADIC-Anreicherung für Cross-Link Peptide (siehe Abbildung 4-28).

Die Probe wurde zunächst mit LysC verdaut und entsalzt (1). In der SCX-Auftrennung wurde nur die letzte Fraktion gesammelt, die Peptide mit Ladungen ≥ +4 enthielt (2). Diese wurden erneut entsalzt, da die Salze aus den SCX-Puffern den folgenden Verdau stören würden. Die gesammelte Fraktion wurde anschließend mit Trypsin verdaut und wieder entsalzt, um die Protease und den Verdaupuffer zu entfernen (3). Die Probe wurde dann mittels SCX aufgetrennt und es wurden vier Fraktionen ab der +4-Elutionszeit gesammelt (4). Diese Fraktionen wurden entsalzt, mittels LC-MS/MS gemessen und mit pLink nach Cross-Link Peptiden durchsucht.

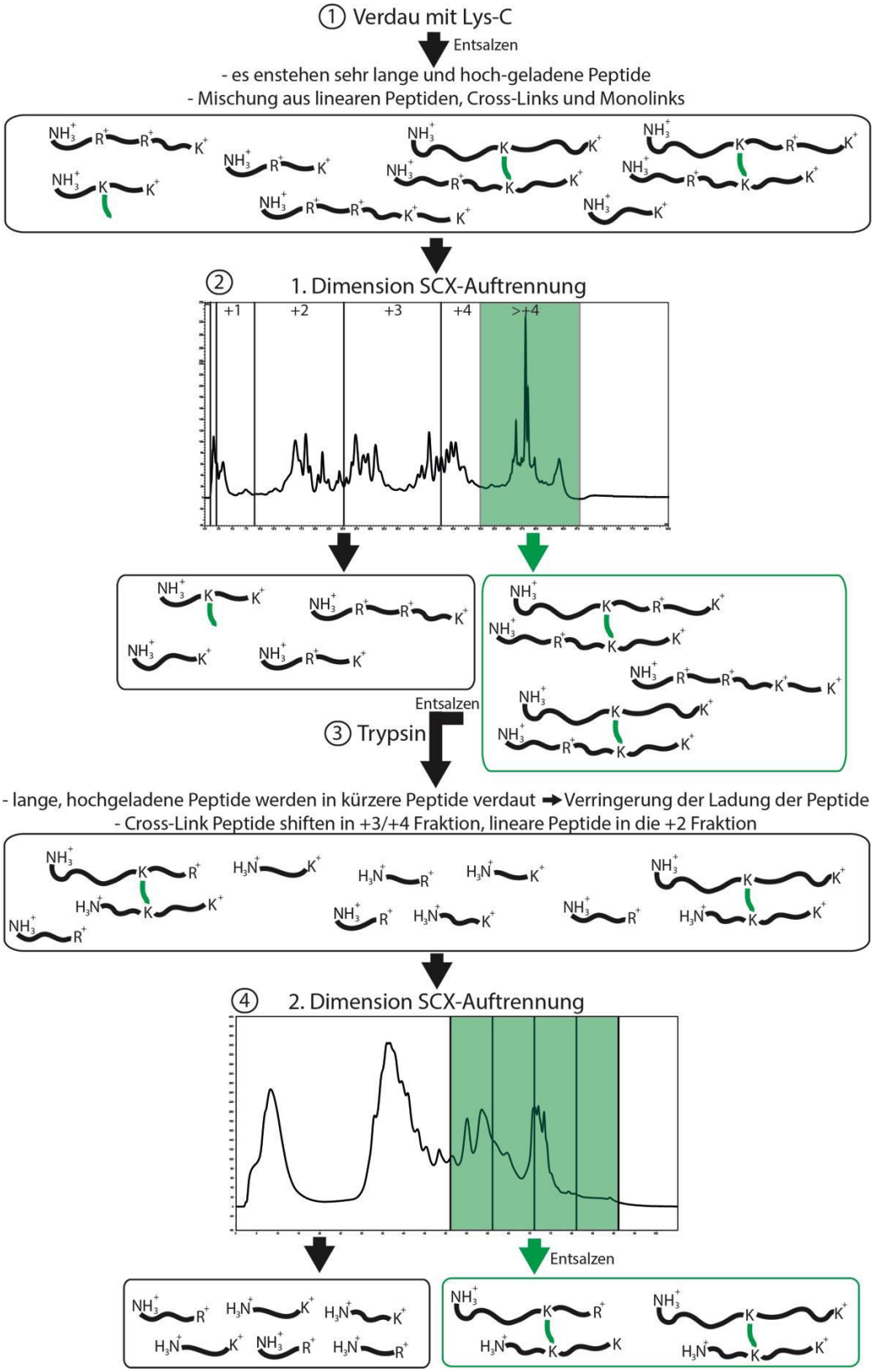

Abbildung 4-28: Schematischer Ablauf der Anreicherung von Cross-Link Peptiden mit ChaFRADIC. Die Probe wird mit LysC verdaut (1) und mittels SCX aufgetrennt, wobei nur die letzte Fraktion mit Peptiden > +4 gesammelt wird (2). Diese Fraktion wird mit Trypsin verdaut (3) und erneut mit SCX aufgetrennt (4). Lineare Peptide shiften durch den Verdau in die Fraktion mit zweifach geladenen Peptiden, Cross-Link Peptide in die +3/+4-Fraktion. Diese werden gesammelt und mittels LC-MS und pLink analysiert.

Bevor die Anreicherung mit dem doppelten Verdau durchgeführt wurde, wurde in einem vorherigen Experiment evaluiert, ob der Verdau durch LysC und Trypsin im Vergleich zu einem einfachen Trypsin-Verdau die Identifizierung von Cross-Link Peptiden beeinflusste. LysC kann nach Lysinen im Gegensatz zu Trypsin auch schneiden, wenn ein Prolin auf das Lysin folgt.

Die Ergebnisse von jeweils drei Replikaten (2 pmol, Orbitrap Elite, ID: A3) sind in Tabelle 4-15 zusammengefasst (detaillierte Ergebnisse im Anhang in Tabelle 8-13). Es wurden mit doppeltem Verdau zwei Cross-Links (AA1-AA261 und AA187-AA280) identifiziert, die mit alleinigem Trypsin-Verdau nicht gefunden werden konnten. Theoretisch hätten diese beiden Peptide auch nach Trypsin-Verdau identifiziert werden können, da kein störendes Prolin in den Sequenzen war.

Dennoch schien hier der doppelte Verdau einen Vorteil gegenüber dem einfachen Trypsin-Verdau zu bieten. Für die Datenauswertung der Anreicherung mittels doppeltem Verdau wurden diese Informationen berücksichtigt.

Tabelle 4-15: Identifizierte Cross-Links in BSA nach Trypsin-Verdau (links) und nach zweistufigem Verdau mit LysC und Trypsin. REP = Replikat. Xx = zusätzlich identifizierte Cross-Links mit zweistufigem Verdau.

			Trypsin Verdau				LysC-Trypsin Verdau			
AA1	**AA2**	Abstand (Å)	REP1	REP2	REP3		REP1	REP2	REP3	
1	12	19,5	-	-	1.27E-04	-	-	5.77E-04	-	-
1	261	25,4	-	-	-	-	1.48E-04	2.88E-04	1.03E-03	**xx**
116	431	21,3	1.09E-03	2.83E-03	2.18E-04	x	6.59E-04	3.57E-05	1.00E-03	x
180	187	11,0	1.34E-05	6.15E-06	3.50E-06	x	3.24E-04	3.98E-05	-	x
187	439	18,2	1.47E-05	1.67E-08	3.13E-04	x	9.12E-06	3.63E-04	8.37E-06	x
187	221	20,3	1.32E-04	1.99E-04	5.91E-05	x	4.83E-05	7.85E-05	6.31E-06	x
187	431	13,7	3.40E-04	5.62E-04	7.31E-04	x	3.04E-04	8.07E-03	3.61E-03	x
187	280	20,0	-	-	-	-	4.47E-04	4.93E-05	2.99E-03	**xx**
204	350	16,4	3.78E-02	-	-	-	1.57E-04	-	3.96E-06	x
221	439	20,5	1.21E-02	-	3.89E-05	x	2.89E-04	6.39E-04	8.30E-05	x
431	439	13,5	8.75E-06	2.26E-06	7.79E-06	x	1.68E-06	3.89E-04	2.35E-03	x
524	544	14,3	2.78E-04	1.05E-04	-	x	-	-	5.96E-04	-
					total	8			total	10

Die XL-ChaFRADIC-Anreicherung wurde anschließend mithilfe des Modelproteins BSA getestet. Es wurden 10 µg BSA-BS^3-$d_{0/4}$ (pBSA, pure BSA mit der kleinen SCX-Säule) nach LysC-Verdau für die erste Dimension der SCX-Auftrennung verwendet. Für alle weiteren Schritte wurde mit der kompletten Probe weitergearbeitet. In der ersten Dimension wurde die letzte Fraktion, die Peptide mit einer Ladung von ≥ +4 enthielt, gesammelt (76-91 min). Nach der zweiten Dimension wurden die vier gesammelten Fraktionen (≥ +4, je 10 min ab Minute 51) jeweils komplett mittels LC-MS/MS analysiert (Orbitrap Velos Pro, ID: B3). Da in der

zweiten Dimension über einen langen Bereich gesammelt wurde, wurde die Fraktion für die LC-MS-Messungen geteilt. In allen Ergebnissen wurden die vier Fraktionen zusammengelegt und der jeweils beste Treffer eines Cross-Links wurde gezeigt. Zum Vergleich wurde jeweils ein Teil der Probe, die auch zur Anreichung verwendet wurde, direkt mit Trypsin verdaut und mit LC-MS/MS gemessen (2 pmol, Orbitrap Velos Pro, ID: A3). Die Anreicherung sowie die Messung der Vergleichsproben wurden je dreimal durchgeführt.

In Tabelle 4-16 sind alle identifizierten Cross-Links von BSA-BS^3-$d_{0/4}$ ohne und mit XL-ChaFRADIC-Anreicherung zusammengefasst. Es wurden nur Identifizierungen gewertet, die in mindestens zwei von drei Replikaten gefunden werden konnten. Es wurden in den Proben, die die XL-ChaFRADIC-Anreicherung durchlaufen hatten, vier (**xx** in Tabelle 4-16) zusätzliche Cross-Links identifiziert, wobei der Cross-Link AA187-AA280 wie oben gezeigt vermutlich nur auf den doppelten Verdau zurückzuführen war. Außerdem wurden für drei weitere Cross-Links bessere Scores im Vergleich zu den Proben ohne Anreicherung erreicht (blau markiert in Tabelle 4-16). Bessere Scores bedeuteten bessere Fragmentionenspektren und damit eine verlässlichere Identifizierung der Cross-Link Peptide. Vier Cross-Link Peptide zeigten eine schlechtere Identifizierung nach der Anreicherung – die Wiederfindbarkeit und/oder der Score gingen zurück (orange in Tabelle 4-16).

Tabelle 4-16: Identifizierte Cross-Links in BSA-BS^3-$d_{0/4}$ ohne und mit XL-ChaFRADIC-Anreicherung. AA1/2 = Aminosäure ½, REP = Replikat, x = in zwei von drei Replikaten identifiziert, xx = Identifizierung nur mit Anreicherung. Orange = Cross-Links, mit schlechterer Identifizierung nach Anreicherung. Blau = Treffer mit verbessertem Score nach Anreicherung.

			pBSA ohne Anreichung				pBSA mit ChaFRADIC			
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**REP1**	**REP2**	**REP3**		**REP1**	**REP2**	**REP3**	
1	12	19,5	1.80E-04	1.34E-03	-	x	3.62E-06	4.11E-06	1.78E-05	x
12	131	20,4	-	-	-	-	8.34E-04	4.06E-04	-	**xx**
114	431	19,9	-	-	-	-	1.81E-04	1.36E-03	2.99E-02	**xx**
116	431	21,3	3.10E-04	1.15E-03	4.29E-05	x	2.86E-04	9.83E-04	2.11E-05	x
180	187	11,0	6.62E-05	3.67E-05	2.81E-04	x	1.84E-04	-	1.23E-03	x
187	221	20,3	1.75E-04	7.09E-04	1.52E-05	x	8.13E-06	4.15E-05	2.94E-06	x
187	280	20,0	-	-	-	-	5.08E-06	4.16E-04	6.99E-06	**xx**
187	431	13,7	4.05E-04	3.57E-04	5.28E-04	x	3.70E-04	7.27E-05	8.00E-04	x
187	439	18,2	8.18E-08	7.97E-07	2.76E-06	x	3.60E-06	1.38E-05	9.48E-07	x
204	350	16,4	6.97E-03	5.43E-03	-	x	-	-	-	-
211	239	9,0	-	-	-	-	8.74E-04	7.41E-03	-	**xx**
221	439	20,5	2.74E-04	2.26E-04	2.54E-04	x	1.89E-03	7.29E-03	1.58E-03	x
350	474	18,0	1.80E-05	4.98E-08	5.82E-07	x	-	-	5.38E-05	-
431	439	13,5	8.28E-05	3.94E-07	1.05E-05	x	4.50E-05	6.85E-05	3.57E-04	x
524	544	14,3	2.62E-06	2.43E-04	7.37E-04	x	7.45E-05	-	2.28E-02	x
					total	11			total	13

Aufgrund der der guten Ergebnisse, die auch besser waren als mit Gly-ChaFRADIC, wurde im nächsten Versuch BSA-BS^3-d$_{0/4}$ mit weiteren Proteinen gemischt, um eine komplexere Probenmatrix zu simulieren. Dazu wurde BSA-BS^3-d$_{0/4}$ vor dem Verdau mit LysC zu gleichen Gewichtsanteilen mit Hämoglobin (bovine), Ovalbumin, β-Lactoglobulin, Lysozym und Serum Albumin (bovine) gemischt (mBSA, medium complex BSA), was einem Anteil von BSA-BS^3-d$_{0/4}$ von 16,6 % entsprach. Für die ChaFRADIC-Anreicherung wurde mit 100 µg Probe begonnen (große SCX-Säule, >+4: 50-68 min), wobei von den finalen vier Fraktionen der zweiten Dimension nur 10 % gemessen wurden (kleine SCX-Säule, á 10 min ab Minute 51; Orbitrap Velos Pro, ID: B3). Auch hier wurde als Kontrolle ein Teil der Probe direkt mit Trypsin verdaut und ohne Anreicherung analysiert (300 ng, Orbitrap Velos Pro, ID: A3). Der Versuch wurde in drei Replikaten durchgeführt und die Ergebnisse sind in Tabelle 4-17 zusammengefasst.

Tabelle 4-17: Identifizierte Cross-Links in BSA-BS^3-d$_{0/4}$ mit Proteinmatrix (mBSA) ohne und mit XL-ChaFRADIC-Anreicherung. AA1/2 = Aminosäure ½, REP = Replikat, x = in zwei von drei Replikaten identifiziert, xx = Identifizierung nur mit Anreicherung. Orange = Cross-Links, die nach Anreicherung nicht mehr gefunden wurden. Blau = Treffer mit verbessertem Score nach Anreicherung.

			mBSA ohne Anreichung				mBSA mit ChaFRADIC			
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**REP1**	**REP2**	**REP3**		**REP1**	**REP2**	**REP3**	
1	12	19,5	7.38E-06	1.67E-05	3.55E-06	x	3.21E-05	3.81E-06	2.02E-05	x
1	261	25,4	-	-	-	-	1.61E-04	2.41E-05	3.01E-04	**xx**
114	431	19,9	-	-	-	-	1.14E-04	8.33E-04	3.36E-04	**xx**
116	431	21,3	-	2.38E-04	-	-	5.52E-04	5.31E-05	-	**xx**
180	187	11,0	-	1.97E-04	1.84E-03	x	-	-	-	-
187	221	20,3	2.59E-05	2.10E-04	6.05E-05	x	2.83E-05	6.22E-05	7.90E-04	x
187	431	13,7	-	3.34E-04	9.50E-05	x	3.21E-03	8.66E-06	1.43E-04	x
187	439	18,2	5.36E-06	5.98E-06	6.19E-05	x	1.02E-04	-	5.14E-04	x
211	350	13,5	1.57E-05	6.04E-08	1.24E-05	x	-	-	-	-
221	239	19,3	-	-	-	-	1.60E-04	1.13E-04	8.32E-03	**xx**
221	439	20,5	1.08E-05	4.38E-06	4.82E-05	x	3.69E-03	1.36E-04	-	x
431	439	13,5	1.22E-05	9.74E-07	2.94E-05	x	4.17E-04	7.63E-05	4.52E-05	x
524	544	14,3	1.31E-06	3.53E-03	5.00E-08	x	-	5.24E-05	-	-
					total	9			total	10

In der Probe mit den zusätzlichen Proteinen wurden weniger Cross-Links identifiziert als in der reinen BSA-Probe aus dem ersten Versuch. Dies war zu erwarten, da durch das Vorhandensein vieler weiterer linearer Peptide aus den zusätzlichen Proteinen die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass Cross-Link Peptide fragmentiert und identifiziert werden.

Nach der Anreicherung wurden vier zusätzliche Cross-Links gefunden (**xx** in Tabelle 4-17), aber auch hier gingen drei Cross-Link Peptide verloren (orange in Tabelle 4-17). Ein zusätzlicher Cross-Link (AA1-AA261) ist auch hier vermutlich wieder nur auf den doppelten Verdau zurückzuführen. Für ein Cross-Link Peptid wurde die Identifizierung verbessert, da dieses jetzt einen besseren Score hatte (blau in Tabelle 4-17).

Im dritten Versuch wurde BSA-BS^3-$d_{0/4}$ mit HeLa-Lysat (15 % BSA, hbSA, high complex BSA) gemischt, um die Komplexität des Hintergrunds zu erhöhen. Für die ChaFRADIC-Anreicherung wurde ebenfalls mit 100 µg Probe (große SCX-Säule, >+4: 50-68 min) begonnen und es wurden 30 % der vier finalen Fraktionen der zweiten Dimension (kleine SCX-Säule, á 10 min ab Minute 51; Orbitrap Elite, ID: B3) gemessen. Zur Kontrolle der Anreicherung wurde ein Teil der Probe direkt mit Trypsin verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert (300 ng, Orbitrap Elite, ID: A3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-18 zusammengefasst. Auch dieser Versuch wurde mit drei Replikaten durchgeführt.

Erwartungsgemäß wurden ohne Anreicherung weniger Cross-Links als in der pBSA-Probe identifiziert, da durch den Hintergrund aus anderen Proteinen die Cross-Link Signale im Massenspektrometer überlagert sein können. Neben den sechs zusätzlich identifizierten Cross-Links konnte mit XL-ChaFRADIC für 5 weitere Peptide die Identifizierungssicherheit mit besseren Scores im Vergleich zur Ausgangsprobe gesteigert werden. Auch bei dieser Probe wurde ein zusätzlicher Cross-Link identifiziert (K187-K280), der im vorherigen Experiment nur auf den doppelten Verdau zurückzuführen war.

Tabelle 4-18: Identifizierte Cross-Links in BSA-BS^3-$d_{0/4}$ in HeLa-Lysat (hBSA) ohne und mit XL-ChaFRADIC-Anreicherung. AA1/2 = Aminosäure ½, REP = Replikat, x = in zwei von drei Replikaten identifiziert, xx = Identifizierung nur mit Anreicherung. Orange = Cross-Links, die nach Anreicherung nicht mehr gefunden wurden. Blau = Treffer mit verbessertem Score nach Anreicherung.

			hBSA ohne Anreichung				hBSA mit ChaFRADIC			
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**REP1**	**REP2**	**REP3**		**REP1**	**REP2**	**REP3**	
1	12	19,5	-	4.61E-05	-	-	8.45E-06	2.26E-06	5.61E-07	**xx**
1	239	22,7	-	-	-	-	-	2.30E-04	1.00E-05	**xx**
12	131	20.4	-	-	-	-	4.09E-05	1.28E-04	1.84E-05	**xx**
12	280	21,0	-	-	-	-	3.96E-04	6.39E-06	-	**xx**
116	431	21,3	4.50E-05	1.70E-04	5.57E-04	x	1.20E-04	2.07E-05	2.87E-04	x
180	187	11,0	7.27E-04	2.33E-04	7.20E-06	x	2.26E-05	5.22E-05	1.78E-05	x
187	221	20,3	7.95E-04	6.69E-04	8.16E-05	x	5.56E-05	1.26E-04	5.36E-05	x
187	280	20,0	-	-	-	-	4.43E-06	4.09E-04	3.65E-06	**xx**
187	431	13,7	-	3.77E-05	-	-	5.02E-05	-	2.71E-04	**xx**
187	439	18,2	8.32E-05	9.04E-06	6.38E-07	x	6.06E-07	6.48E-06	8.67E-06	x
211	350	13,5	-	2.88E-06	-	-	-	-	-	-
221	239	19,3	-	1.94E-03	5.33E-05	x	5.68E-05	1.85E-05	3.61E-05	x
221	439	20,5	1.31E-02	7.72E-05	-	x	3.60E-04	3.68E-04	1.96E-04	x
350	474	18,0	2.58E-04	1.79E-05	8.98E-05	x	-	-	-	-
431	439	13,5	5.80E-06	1.26E-05	2.90E-05	x	1.86E-05	4.64E-05	4.55E-05	x
524	544	14,3	-	3.83E-05	-	-	-	-	-	-
					total	8			total	13

In Tabelle 4-19 sind die Ergebnisse der drei Probentypen ohne und mit XL-ChaFRADIC-Anreicherung zusammengefasst. Dabei sind Cross-Link Peptide in verschiedenen Farben markiert: Peptide, die durch die Anreicherung eine verschlechterte Identifizierung haben (orange); Peptide mit verbesserter Identifizierung (blau) und Peptide, die ausschließlich mit ChaFRADIC gefunden wurden (grau). Es ist zu erkennen, dass es sich unabhängig von der Probenmatrix oft um die gleichen Peptide oder ähnliche Peptide handelte. Dies bedeutete, dass der Verlust dieser Peptide nicht zufällig, sondern systematisch durch Peptideigenschaften bedingt war.

Tabelle 4-19: Zusammengefasste Ergebnisse vor und nach der XL-ChaFRADIC-Anreicherung von Cross-Link Peptiden für die Proben niedriger (pBSA), mittlerer (mBSA) und hoher (hBSA) Komplexität. Xx = nur mit ChaFRADIC gefunden Cross-Links, orange = verschlechterte Identifizierung mit ChaFRADIC, blau = verbesserte Identifizierung mit ChaFRADIC, grau = Identifizierung nur mit ChaFRADIC. AA1/2 = Aminosäure ½. Zugehörige Peptidsequenzen finden sich im Anhang in Tabelle 8-14, 8-15, 8-16.

		pBSA		mBSA		hBSA	
AA1	AA2	ohne ChaFRADIC	mit ChaFRADIC	ohne ChaFRADIC	mit ChaFRADIC	ohne ChaFRADIC	mit ChaFRADIC
1	12	x	x	x	x	-	xx
1	239	-	-	-	-	-	xx
1	261	-	-	-	xx	-	-
12	131	-	xx	-	-	-	xx
12	280	-	-	-	-	-	xx
114	431	-	xx		xx	-	-
116	431	x	x		xx	x	x
180	187	x	x	x		x	x
187	221	x	x	x	x	x	x
187	280	-	xx	-	-	-	xx
187	431	x	x	x	x	-	xx
187	439	x	x	x	x	x	x
204	350	x		-	-	-	-
211	239	-	xx	-	-	-	-
211	350	-	-	x	-	-	-
221	239	-	-	-	xx	x	x
221	439	x	x	-	x	x	x
350	474	x	-	x	-	x	-
431	439	x	x	x	x	x	x
524	544	x	x	x	-	-	-

Daher wurden die Cross-Link Peptide, die eine bessere (blau), schlechtere (orange) oder ausschließliche Identifizierung (grau) nach der XL-ChaFRADIC-Anreicherung zeigten, hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung untersucht (Abbildung 4-29).

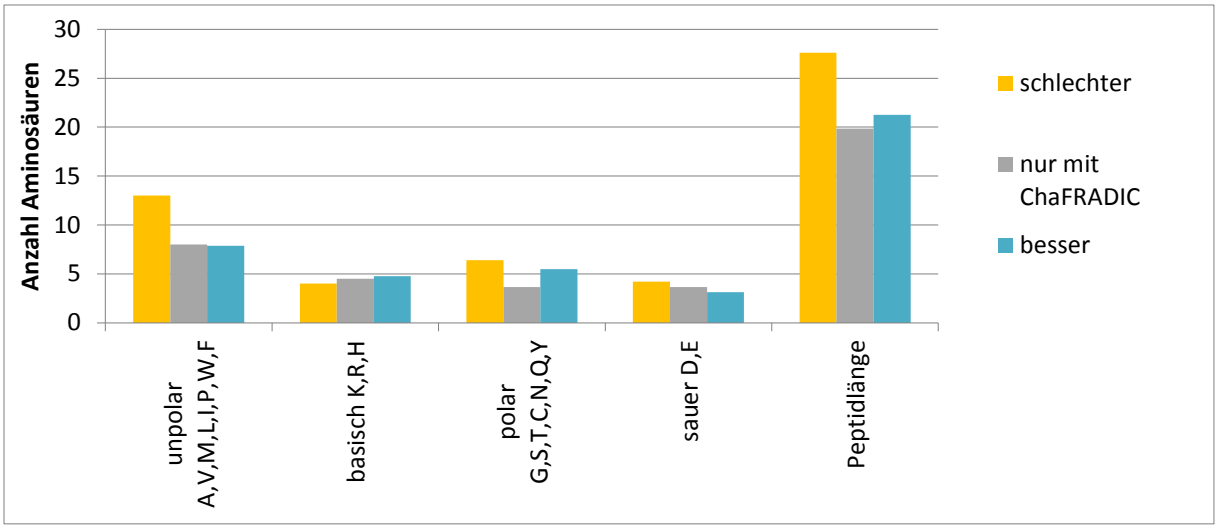

Abbildung 4-29: Balkendiagramm über die Aminosäurezusammensetzung der Cross-Link Peptide, die nach XL-ChaFRADIC-Anreicherung schlechter bzw. gar nicht mehr (orange), besser (blau) oder nur mit XL-ChaFRADIC-Anreicherung identifiziert werden konnten (grau).

Es war zu erkennen, dass die Cross-Link Peptide, die durch die Anreicherung verloren gingen oder schlechter identifiziert wurden, im Vergleich zu den besser angereicherten Peptiden länger waren und mehr unpolare Aminosäuren enthielten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass lange und unpolare Peptide durch SCX-Chromatographie und die Entsalzungs-Schritte schlechter wiedergewonnen wurden als kurze und eher polare Peptide.

Anhand der Ergebnisse der Anreicherung der hBSA-Proben wurde auch hier die Anreicherungs-Effizienz der Methode überprüft. Die MS-Dateien der hBSA-Proben vor und nach Anreicherung wurden über den ProteomeDiscoverer (Version 1.3) mit Mascot (Version 2.4, Matrix Science) gegen die komplette UniProt-Datenbank durchsucht (siehe 3.9.1, lineare Peptide). Das Vorkommen von linearen BSA-Peptiden wurde zwischen den Replikaten vor und nach Anreicherung verglichen – dabei wurden nur Peptide berücksichtigt, die in zwei von drei Replikaten mit 5 % False Discovery Rate identifiziert werden konnten.

Die tabellarischen Ergebnisse finden sich im Anhang (Tabelle 8-17). Ohne Anreicherung konnten 42 lineare BSA-Peptide identifiziert werden, von denen 26 nach der Anreicherung nicht mehr gefunden werden konnten (62 %). 16 Peptide konnten sowohl vor als auch nach der Anreicherung identifiziert werden (38 %). Von diesen 16 Peptiden hatten 11 (65 %) nach LysC-Verdau einen theoretischen Ladungszustand $\geq +4$, sodass diese in der ersten SCX-Auftrennung coeluieren. Von diesen 11 Peptiden hatten wiederum 7 Peptide auch in der zweiten Dimension die gleiche Anzahl positiver Ladungen wie Cross-Link Peptid und konnten daher nicht vermieden werden.

Außerdem wurden nach der Anreicherung 13 neue Peptide gefunden. Von diesen hatten wiederum 10 Peptiden die gleichen Ladungszustände wie Cross-Link Peptide in der ersten

SCX-Dimension und von diesen 10 Peptiden coeluierten auch in der zweiten SCX-Auftrennung 8 Peptide berechtigt.

Unter den 29 linearen BSA-Peptiden, die nach der Anreicherung identifiziert werden konnten, waren also 14 Peptide, die aufgrund ihrer Ladungszustände als Kontamination betrachtet werden mussten. Dies entspricht einer Anreicherungs-Effizienz von 48 %.

Von den 8 Cross-Links, die ohne Anreicherung identifiziert wurden, wurden 7 auch mit XL-ChaFRADIC gefunden. Dies entspricht einer Wiederfindungsrate von 88 %.

Die Anreicherung mittels zweistufigem Verdau zeigte also sowohl mehr zusätzliche Identifizierungen als auch eine bessere Anreicherungseffizienz als die GlyBoc-Methode. Dies war selbst dann gültig, wenn man die zusätzlichen Cross-Links, die scheinbar nur durch den doppelten Verdau bedingt waren, außen vorließ.

4.4.6 Kombination von Größenausschluss-Chromatographie mit ChaFRADIC

Nach der erfolgreichen Etablierung der Anreicherung mittels ChaFRADIC mit zweistufigem Verdau und Gly-Modifikation wurde die Kombination mit Größenausschluss-Chromatographie (SEC) getestet. Ziel war es, die erste SCX-Chromatographie durch eine Größenausschluss-Chromatographie zu ersetzen. Dabei würde nicht die erhöhte Ladung der LysC-verdauten Cross-Link-Peptide, sondern deren Länge (und damit auch Größe) gegenüber linearen Peptiden ausgenutzt werden.

Da die Verwendung von zwei verschiedenen chromatographischen Systemen einen hohen organisatorischen und finanziellen Aufwand mit sich bringt (zwei HPLC-Systeme mit entsprechenden Säulen, Wartungsaufwand), war das Ziel die erste Dimension mit SEC-Microcolumns umzusetzen. Kommerziell angebotene SEC-Säulchen sind nicht für den Zweck der Peptidauftrennung konzipiert, sondern dienen normalerweise der Abtrennung von Salzen, Reagenzien und Peptidfragmenten.

Um die optimalen SEC-Säulchen zur Abtrennung der linearen Peptide von Cross-Link Peptiden zu finden, wurde die durchschnittliche Länge von linearen bzw. Cross-Link Peptiden von BSA nach LysC-Verdau berechnet. Dazu wurden mit *in silico* Verdau (MSDigest[99], Enzym: LysC, überlesene Schnittstellen: maximal 2, keine Modifikationen) alle linearen Peptide von BSA erstellt. Diese wurden mit der Länge der bekannten Cross-Link Peptide von BSA (nach LysC-Verdau, siehe Abbildung 4-30) verglichen. Es war zu erkennen, dass Cross-Link Peptide nach LysC-Verdau wie erwartet mehr Aminosäuren enthalten als lineare Peptide, was dadurch bedingt ist, dass zwei Peptide aneinanderhängen.

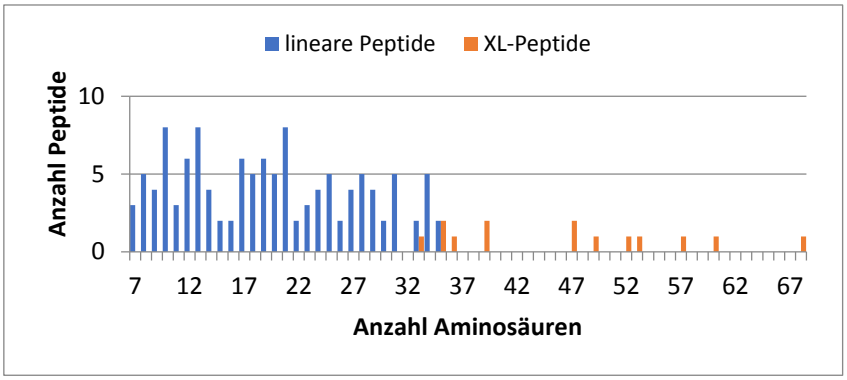

Abbildung 4-30: Theoretische Längenverteilung von linearen Peptiden (blau) und Cross-Link Peptiden (orange) nach LysC-Verdau.

Geht man von einer durchschnittlichen Aminosäuremasse von 117 Da aus, ergibt sich die Verteilung für das Molekulargewicht der linearen und Cross-Link Peptide nach LysC-Verdau wie in Abbildung 4-31 dargestellt. Cross-Links liegen im Bereich über 4000 Da, während lineare Peptide unter dieser Grenze liegen. Für Cross-Link Peptide kommt durch die Verzweigung außerdem eine größere räumliche Ausdehnung hinzu, die sie zusätzlich zur Länge auch dreidimensional größer machen.

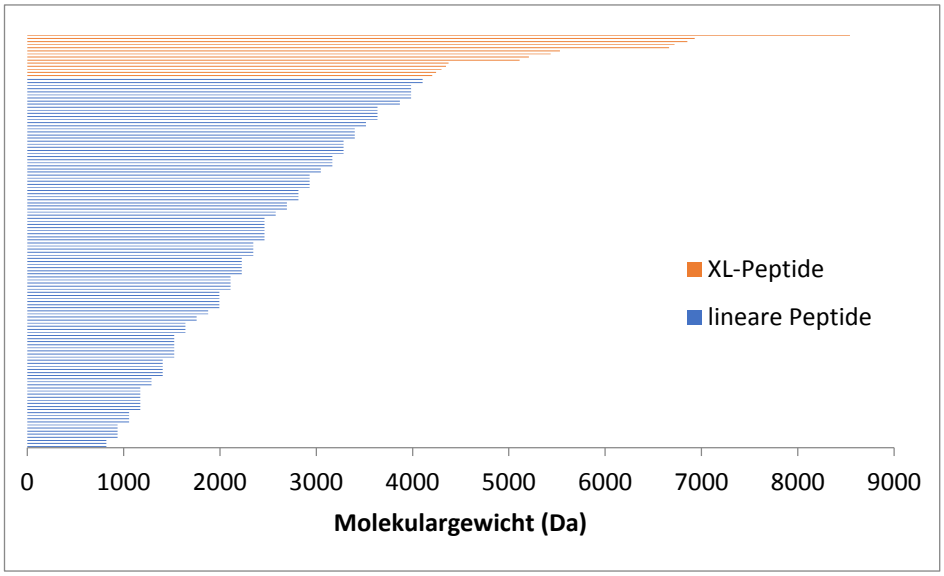

Abbildung 4-31: Theoretische Verteilung des Molekulargewichts von linearen (blau) und Cross-Link Peptiden (orange) von BSA nach LysC-Verdau unter der Annahme einer durchschnittlichen Aminosäuremasse von 117 Da.

Aufgrund dieser Daten wurden in Rücksprache mit dem Hersteller die PD SpinTrap G-25-Säulchen von GE Healthcare mit einem Molekulargewicht-Cutoff von 5000 Da verwendet.

Wie eingangs erwähnt, sind diese Säulen nicht für eine Peptidauftrennung gedacht. Daher wurde ein Elutionsschema entwickelt, um verschiedenen Fraktionen zu erhalten. Nach jedem Elutionsschritt wurde das Auffanggefäß gewechselt (siehe Kapitel 3.6).

Dieser Versuch wurde mit hBSA (100 µg) in drei Replikaten ausgeführt. Nach der Auftrennung des LysC verdauten hBSA mittels SEC-Säulchen wurden von jeder Fraktion 2.5 % abgenommen und mit LC-MS/MS analysiert (etwa 300 ng, Orbitrap Velos Pro, ID: C2), um die Längenverteilung der Peptide in den acht Fraktionen zu bestimmen.

Dazu wurde in jeder Fraktion ermittelt, wie viele PSM von Peptiden mit bestimmter Länge (zwischen 5 und 47 Aminosäuren) vorlagen. Für jede Peptidlänge wurde dann die Summe der PSM der acht Fraktionen gebildet, um damit zu berechnen, wie hoch der prozentuale Anteil einer Peptidlänge in jeder Fraktion war.

Die Ergebnisse aus den Durchschnittswerten der drei Replikate sind in Tabelle 4-20 dargestellt (detaillierte Ergebnisse der einzelnen Replikate in Tabelle 8-18 im Anhang).

Es war zu erkennen, dass in den Fraktionen 6, 7 und 8 die Peptide ab einer Länge von 17 Aminosäuren im Vergleich zu den vorherigen Fraktionen abgereichert waren (grün). Im Gegensatz dazu waren in den Fraktionen 2, 3, 4 und 5 die Peptide ab einer Länge von 17 Aminosäuren im Vergleich zu den nachfolgenden Fraktionen angereichert (gelb). Fraktion 1 hatte eine relativ ausgeglichene Verteilung der Peptidlängen und wurde daher nicht weiter miteinbezogen. Nach diesen Ergebnissen wurden die Fraktionen 2-5 für die zweite Dimension der SEC-ChaFRADIC-Methode verwendet. Die Fraktionen 2-5 wurden vereinigt, mit Trypsin verdaut und mit SCX-Chromatographie aufgetrennt (4 Fraktionen á 10 min ab 51 min; 30 % gemessen; Orbitrap Velos Pro, ID: B3).

Tabelle 4-20: Relative Längenverteilung in % (PSM) der Peptide mit 5-47 Aminosäuren in den acht SEC-Fraktionen. #AA = Peptidlänge, SEC 1-8 = SEC-Fraktion 1-8. Farbverlauf von niedrigem Anteil (grün, Abreicherung) zu hohem Anteil (gelb bis rot, Anreicherung).

#AA	SEC 1	SEC 2	SEC 3	SEC 4	SEC 5	SEC 6	SEC 7	SEC 8	Summe SEC 1-8
5	6%	7%	16%	10%	17%	16%	12%	16%	100%
6	7%	8%	14%	11%	17%	15%	13%	15%	100%
7	10%	12%	14%	10%	16%	13%	13%	13%	100%
8	10%	11%	13%	10%	13%	14%	14%	15%	100%
9	10%	11%	12%	10%	14%	13%	15%	15%	100%
10	10%	11%	11%	11%	14%	14%	14%	15%	100%
11	12%	12%	12%	11%	13%	13%	13%	14%	100%
12	12%	12%	12%	11%	13%	14%	13%	14%	100%
13	12%	12%	12%	12%	14%	13%	12%	13%	100%
14	12%	13%	13%	12%	14%	13%	11%	12%	100%
15	11%	14%	14%	13%	15%	13%	10%	11%	100%
16	12%	14%	15%	14%	15%	13%	9%	10%	100%
17	11%	16%	15%	15%	15%	12%	8%	8%	100%
18	10%	16%	17%	16%	17%	11%	7%	7%	100%
19	10%	16%	17%	17%	17%	11%	6%	6%	100%
20	10%	17%	17%	17%	17%	11%	5%	5%	100%
21	8%	18%	20%	18%	18%	10%	4%	4%	100%
22	9%	17%	18%	18%	17%	9%	5%	6%	100%
23	8%	18%	21%	18%	18%	9%	4%	3%	100%
24	7%	19%	21%	19%	19%	8%	3%	3%	100%
25	9%	20%	22%	20%	18%	7%	2%	2%	100%
26	6%	20%	24%	21%	19%	7%	2%	2%	100%
27	8%	22%	21%	19%	18%	9%	2%	2%	100%
28	3%	20%	26%	21%	19%	8%	2%	1%	100%
29	9%	22%	23%	19%	16%	6%	2%	3%	100%
30	4%	22%	25%	23%	19%	6%	1%	0%	100%
31	6%	23%	24%	19%	19%	7%	1%	1%	100%
32	6%	20%	24%	21%	18%	7%	2%	2%	100%
33	8%	17%	26%	21%	16%	6%	4%	4%	100%
34	8%	21%	23%	19%	17%	5%	4%	3%	100%
35	10%	15%	27%	22%	12%	6%	4%	5%	100%
36	9%	16%	23%	22%	17%	7%	3%	5%	100%
37	11%	20%	23%	19%	14%	8%	3%	2%	100%
38	12%	36%	22%	13%	12%	0%	4%	1%	100%
39	0%	17%	47%	17%	19%	0%	0%	0%	100%
40	16%	18%	19%	16%	13%	5%	3%	10%	100%
41	0%	33%	37%	15%	15%	0%	0%	0%	100%
42	14%	17%	19%	13%	13%	10%	4%	9%	100%
43	11%	21%	24%	21%	16%	8%	0%	0%	100%
44	0%	21%	31%	17%	24%	7%	0%	0%	100%
45	0%	29%	43%	29%	0%	0%	0%	0%	100%
47	0%	0%	67%	33%	0%	0%	0%	0%	100%

In Tabelle 4-21 sind die Ergebnisse der Anreicherung mit SEC-SCX im Vergleich zu XL-ChaFRADIC und ohne Anreicherung dargestellt. Es war zu erkennen, dass die Anreicherung mit einem SEC-Schritt sehr reproduzierbar war – allerdings wurden weniger Cross-Links als mit XL-ChaFRADIC identifiziert (siehe Abbildung 4-32, links). Im Vergleich mit der hBSA-Probe ohne Anreicherung wurden allerdings trotzdem mehr Cross-Links gefunden, was auf eine grundsätzliche Effizienz der Methode schließen lässt (siehe Abbildung 4-32, rechts).

Tabelle 4-21: Ergebnisse der identifizierten Cross-Links in hBSA mit SEC-SCX-Auftrennung im Vergleich zur XL-ChaFRADIC-Anreicherung und ohne Anreicherung. AA = Aminosäure, REP = Replikat. Zugehörige Peptidsequenzen finden sich in Tabelle 8-19 im Anhang.

			hBSA ohne Anreicherung	hBSA mit XL-ChaFRADIC	hBSA mit SEC-SCX		
AA1	AA2	Abstand (Å)	Score (Durchschnitt)	Score (Durchschnitt)	REP1	REP2	REP3
1	12	19,5	-	3.76E-06	3.22E-06	1.20E-05	3.44E-05
1	239	22,7	-	1.20E-04	-	-	-
12	131	20,4	-	6.24E-05	-	-	-
12	280	21,0	-	2.01E-04	-	-	-
114	431	19,9	-	-	1.45E-03	7.65E-05	-
116	431	21,3	2.57E-04	1.43E-04	3.86E-04	1.44E-04	1.57E-05
180	187	11,0	3.22E-04	3.09E-05	-	-	2.95E-04
187	221	20,3	5.15E-04	7.84E-05	1.62E-04	3.05E-05	1.43E-04
187	280	20,0	-	1.39E-04	2.69E-03	4.82E-05	-
187	431	13,7	-	1.61E-04	3.26E-04	2.86E-04	2.23E-04
187	439	18,2	3.10E-05	5.25E-06	1.95E-04	2.99E-05	1.37E-04
211	350	13,5	-	-	-	-	-
221	239	19,3	9.97E-04	3.71E-05	2.78E-04	2.54E-04	1.82E-04
221	439	20,5	6.59E-03	3.08E-04	5.91E-06	8.25E-05	4.95E-06
350	474	18,0	1.22E-04	-	-	-	-
431	439	13,5	1.58E-05	3.68E-05	1.21E-04	1.01E-05	1.32E-06
524	544	14,3	-	-	-	-	3.71E-05
			8	13	10	10	10

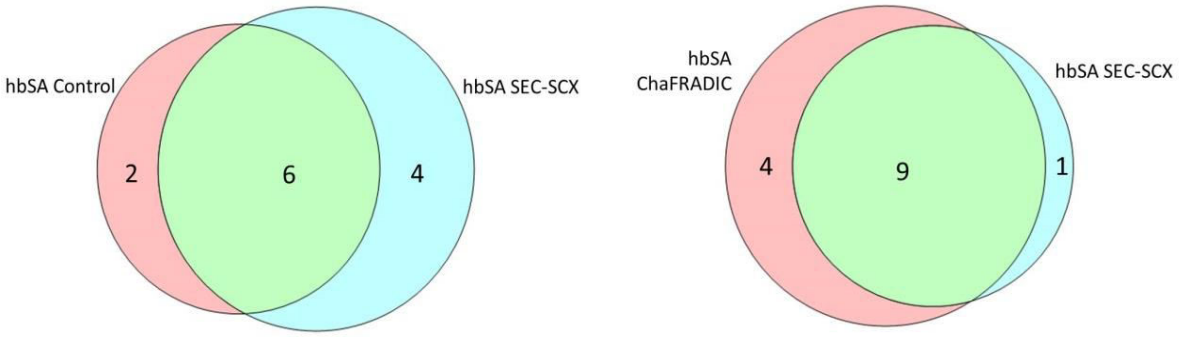

Abbildung 4-32: Übereinstimmung der identifizierten Cross-Links ohne Anreicherung und nach SEC-SCX (rechts) und in hBSA nach XL-ChaFRADIC und SEC-SCX (links).

Auch für diesen Versuch wurde die Anreicherungseffizienz bestimmt. Die MS-Dateien der drei Replikate vor und nach SEC-SCX-Anreicherung wurden über den ProteomeDiscoverer (Version 1.3) mit Mascot (Version 2.4, Matrix Science) gegen die komplette UniProt-Datenbank durchsucht (siehe 3.9.1, lineare Peptide). Das Vorkommen von BSA-Peptiden wurde zwischen den Replikaten vor und nach Anreicherung verglichen – dabei wurden nur Peptide berücksichtigt, die in zwei von drei Replikaten mit 5 % False Discovery Rate identifiziert werden konnten.
Die tabellarischen Daten finden sich im Anhang (Tabelle 8-20). Ohne Anreicherung konnten 36 lineare BSA-Peptide identifiziert werden, von denen 12 nach der Anreicherung nicht mehr gefunden wurden (33 %). 24 Peptide konnten sowohl vor als auch nach der Anreicherung identifiziert werden (67 %). Von diesen 24 Peptiden hatten 10 Peptide (42 %) nach LysC-Verdau Peptidlänge über 17 Aminosäuren, sodass diese in der SEC-Auftrennung angereichert wurden. Von diesen 10 Peptiden konnten acht Peptide auch in den finalen Fraktionen der zweiten Dimension erwartet werden, da diese einen Ladungszustand von +4 oder höher hatten. 14 Peptide (58 %) waren nach LysC-Verdau kürzer als 17 Aminosäuren und hätten über die SEC-Auftrennung eigentlich entfernt werden sollen.

Außerdem wurden 12 neue Peptide gefunden, die ohne Anreicherung nicht identifiziert werden konnten. Von diesen hatten wiederum acht nach LysC-Verdau eine Länge von 17 Aminosäuren oder mehr und nach Trypsin-Verdau vier oder mehr positive Ladungen.

Unter den 36 linearen BSA-Peptiden, die nach der Anreicherung identifiziert werden konnten, waren also 16 Peptide, die aufgrund ihrer Ladungszustände als Kontamination betrachtet werden mussten. Dies entspricht einer Anreicherungs-Effizienz von 44 %. Von den acht Cross-Links, die in der Kontrolle ohne Anreicherung gefunden wurden, konnten sieben auch danach identifiziert werden. Dies entspricht einer Wiederfindungsrate von 88 % und liegt damit im gleichen Bereich wie XL- und Gly-ChaFRADIC.

Obwohl die Anreicherungseffizienz hier nur unwesentlich schlechter war als bei der doppelten SCX-Chromatographie, konnten verglichen mit nicht-angereicherten Proben weniger zusätzliche Cross-Links identifiziert werden.

SEC hat genau wie SCX den Vorteil, dass es universell für jedes Cross-Linking Reagenz einsetzbar ist. In dieser Versuchsausführung schien es nachteilig zu sein, dass nur Microcolumns und kein HPLC-System verwendet werden konnte. So ist es nicht möglich die maximale Auflösung und damit Trennung verschieden großer Peptide zu erreichen. Dies lässt darauf schließen, dass der Ansatz im Grunde eine sinnvolle Kombination ist, der allerdings hinsichtlich einer höheren Trennleistung in der Size Exclusion Chromatographie optimiert werden sollte.

4.5 Strukturuntersuchung weiterer Proteine und Proteinkomplexe mittels Massenspektrometrie

Neben der Anreicherung von Cross-Link Peptiden wurden in dieser Arbeit auch weitere Proteine und Proteinkomplexe mittels Cross-Linking und Massenspektrometrie hinsichtlich neuer Strukturinformationen untersucht.

Zunächst wurde der BBSome-Komplex mit den klassischen Cross-Linking Reagenzien BS^3 und BS^2G betrachtet. In einer weiteren Kooperation wurde ein innovativer Cross-Linking Ansatz evaluiert: Es wurde ein Cross-Link zwischen einem Enzym (IbpA) und dessen Zielprotein durch ein modifiziertes Substrat erzeugt.

4.5.1 BBSome-Komplex

Der BBSome-Proteinkomplex kommt in Ausstülpungen der Zellmembran vor, den sogenannten Zilien. Fast jede Zelle hat Zilien auf ihrer Oberfläche, die sensorische und regulatorische Funktionen übernehmen[100]. Der Name BBSome leitet sich vom Bardet-Biedl-Syndrom[101] ab – einer genetisch bedingten Krankheit, bei der durch Fehlfunktionen der Zilien aufgrund von Mutationen im BBSome-Komplex Übergewicht, Polydaktylie, Niereninsuffizienz und –zysten entstehen[102]. Der BBSome-Komplex besteht aus acht Untereinheiten und dient dem Transport entlang von Mikrotubuli innerhalb der Zilien. Der genaue Aufbau des BBSome-Komplexes ist bis heute nicht bekannt. Da sich der Komplex bisher nicht kristallisieren ließ, konnten keine röntgenkristallographischen Untersuchungen durchgeführt werden. Der Gruppe um Prof. Wittinghofer (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) gelang es den Kern-Komplex des BBSomes aus sechs Untereinheiten durch Co-Überexpression in großen Mengen zu gewinnen, sodass Cross-Linking Experimente durchgeführt werden konnten. In Tabelle 4-22 sind die Untereinheiten des Komplexes mit ihrem Molekulargewicht aufgeführt.

Tabelle 4-22: Molekulargewicht, Lysin-Anteil und theoretische Sequenzabdeckung mit Trypsin (maximal 2 überlesene Schnittstellen, keine Modifikationen) der untersuchten BBSome-Untereinheiten.

Untereinheit	Anzahl Aminosäuren (Peptidlänge)	Molekular-gewicht	Lysin-Anteil	Sequenz-abdeckung
BBS1	593	65,1 kDa	5 %	99 %
BBS4	528	58,3 kDa	13 %	100 %
BBS5	341	38,8 kDa	5 %	84 %
BBS8	553	61,5 kDa	5 %	84 %
BBS9	887	99,3 kDa	5 %	90 %
BBS18	99	10,5 kDa	12 %	97 %

Für die Cross-Linking Versuche wurde der Komplex mit 1 µg/µL in 20 mM HEPES (pH 7.4, siehe Kapitel 3.1) und zusätzlich 150 mM NaCl gelöst. Der Komplex benötigt diese hohe Salzkonzentration zur Beibehaltung seiner Löslichkeit.

Zunächst wurde über eine Titration mit zunehmenden Mengen des Cross-Linking Reagenz BS^3-$d_{0/4}$ getestet, welcher Überschuss optimal für das Cross-Linking ist.

In der SDS-PAGE in Abbildung 4-33 war die zunehmende Vernetzung der Untereinheiten durch das Cross-Linking gut zu erkennen. Während in der Kontrolle ohne Cross-Linker die klar abgegrenzten Banden der sechs Untereinheiten gut sichtbar waren, zeigten sich schon bei einem 5-fachen molaren Überschuss des Reagenzes neue Aggregate oberhalb der größten einzelnen Untereinheit BBS9 (> 100 kDa). Dieser Effekt wurde bis zum 20-fachen Überschuss immer deutlicher. Bei 50- und 100-fachem Überschuss verschwanden die einzelnen Banden der Untereinheiten fast vollständig und es war ein vernetzter Komplex entstanden, der aufgrund seiner Größe nicht mehr in das Gel eindringen konnte.

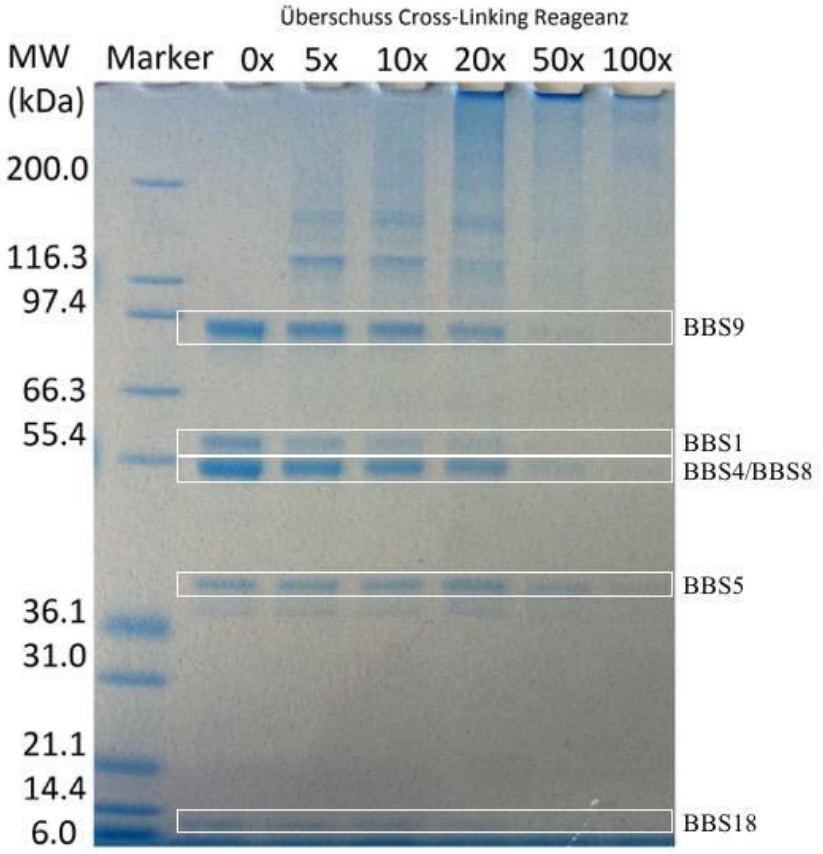

Abbildung 4-33: SDS-PAGE des BBSome-Komplexes mit steigendem molarem Überschuss des Cross-Linking Reagenzes BS^3-$d_{0/4}$, mit Coomassie-Blau gefärbt. MW = Molekulargewicht (kDa).

Aufgrund der Größenbeschränkung der verwendeten SDS-PAGE bis ca. 200 kDa konnte hier nicht mehr unterschieden werden, ob nur der gewünschte Komplex mit 1:1 Stöchiometrie vernetzt wurde oder sogar größere Aggregate entstanden, die nicht mehr der nativen Form entsprechen würden. Beim 50-fachen Überschuss waren allerdings noch dünnen Banden der

einzelnen Untereinheiten zu erkennen, während diese beim 100-fachen Überschuss verschwanden. Daraus konnte geschlossen werden, dass bei 50-fachem Überschuss nicht alle Untereinheiten komplett vernetzt waren und kein zu starkes Cross-Linking eingetreten war. Für den 100-fachen Überschuss des Cross-Linkers lässt sich dies mittels SDS-PAGE nicht mehr genau feststellen, weswegen für die folgenden Versuche sowohl 50- und 100-facher Überschuss eingesetzt wurde.

Für das Cross-Linking kamen BS^3-$d_{0/4}$ und der etwas kürzere BS^2G-$d_{0/4}$ zum Einsatz. Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt und jeweils zweimal gemessen (2pmol, Orbitrap Elite, ID: A3). Es wurden also vier Replikate verglichen und es wurden nur Treffer akzeptiert, die in mindestens zwei der vier Replikate identifiziert werden konnten.

Die identifizierten Cross-Links des BBSome-Komplexes mit BS^3-$d_{0/4}$ und BS^2G-$d_{0/4}$ sind in Tabelle 4-23 zusammengefasst. Die Inter-Cross-Links zwischen den verschiedenen Untereinheiten sind in Abbildung 4-34 grafisch dargestellt. Die detaillierten Ergebnisse mit Scores sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 8-21, Tabelle 8-22, Tabelle 8-23 und Tabelle 8-24).

Tabelle 4-23: Ergebnisse des Cross-Linking im BBSome-Komplex mit zwei verschiedenen Cross-Linkern (BS^3 und BS^2G) mit unterschiedlichem Überschuss der Cross-Linking Reagenzien (50x und 100x). Protein ½: Verlinkte BBSome-Untereinheit, AA1/2: verlinkte Aminosäure in der BBSome-Untereinheit.

Protein1	AA1	Protein2	AA2	50x BS^3	100x BS^3	50x BS^2G	100x BS^2G
BBS1	195	BBS4	29	x	x	-	-
BBS1	195	BBS4	34	x	-	-	x
BBS1	1	BBS5	135	-	-	x	-
BBS1	565	BBS9	454	x	-	x	x
BBS5	87	BBS9	454	-	x	-	-
BBS8	482	BBS9	393	x	x	x	x
BBS8	482	BBS9	397	x	x	x	x
BBS8	482	BBS18	1	-	x	-	-
BBS9	2	BBS18	21	-	-	x	x
BBS1	53	BBS1	72	x	-	-	-
BBS4	29	BBS4	34	x	x	-	x
BBS4	29	BBS4	195	-	-	-	x
BBS4	29	BBS4	55	-	-	-	x
BBS5	135	BBS5	141	x	x	x	x
BBS5	135	BBS5	150	-	x	-	-
BBS9	542	BBS9	594	-	-	x	-
BBS9	786	BBS9	810	x	x	x	x
BBS9	789	BBS9	810	-	-	-	x
BBS18	1	BBS18	10	-	-	x	-

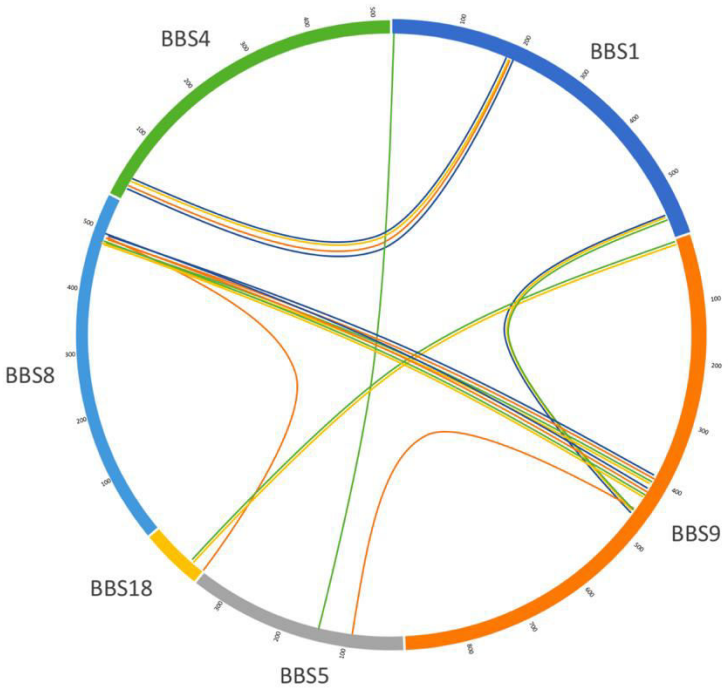

Abbildung 4-34: Identifizierte Cross-Links zwischen den sechs Untereinheiten des BBSome-Komplexes (BBS1: dunkelblau, BBS4: grün, BBS8: hellblau, BBS18: gelb, BBS5: grau, BBS9: orange, Abschnitte von jeweils 100 Aminosäuren sind gekennzeichnet) nach Cross-Linking mit BS^3 (50-facher Überschuss: blaue Linien, 100-facher: orange Linien) und BS^2G (50-fach: grüne Linien, 100-fach: gelbe Linien).

Es war zu erkennen, dass mit beiden Reagenzien und Konzentrationen viele übereinstimmende Cross-Links identifiziert werden konnten.

Auffällig war die insgesamt eher geringe Anzahl identifizierter Cross-Links im Vergleich zur Größe des Komplexes. In allen sechs Untereinheiten sind Lysine sehr gleichmäßig verteilt, sodass zum einen Cross-Linking im ganzen Protein verteilt stattfinden kann und zum andern ein gleichmäßiger Verdau der Proteine möglich ist. Dies spiegelt sich auch in der guten, theoretischen Sequenzabdeckung von mehr als 84 % wieder (siehe Tabelle 4-22). Die Anzahl der Lysine liegt in den Untereinheiten relativ zur Gesamtsequenz zwischen 5 und 13 %, was teilweise etwas niedriger als beim Modellprotein BSA ist (54 Lysine bei 583 Aminosäuren, 9 %). Diese Kennzahlen würden allerdings trotzdem eine höhere Ausbeute der Cross-Linking Reaktion erwarten lassen.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der BBSome-Komplex, da er membranassoziierter ist, eher hydrophobe Eigenschaften aufweist. Es ist anzunehmen, dass der Zugang der wasserlöslichen, hydrophilen Cross-Linker BS^3 und BS^2G durch große, hydrophobe Bereiche erschwert war. Bereits bei BSA wurde beobachtet, dass sich Cross-Links im Inneren des Proteins seltener ausbilden (siehe Kapitel 4.2.3).

Betrachtet man den vermuteten Aufbau des BBSome-Komplexes in Abbildung 4-35, stimmen einige gefundene Cross-Links gut mit diesem Modell überein.

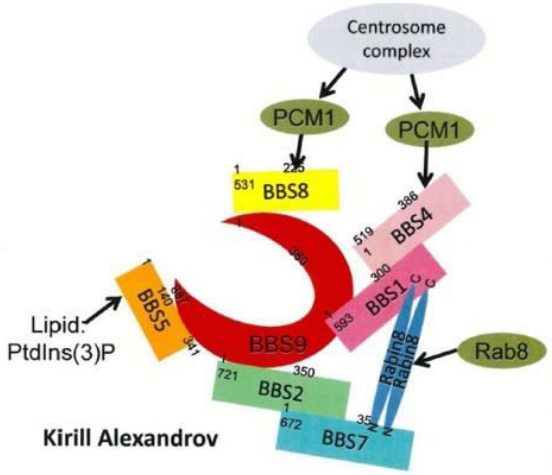

Abbildung 4-35: Vermutete planare, Architektur des BBSome-Komplexes (zur Verfügung gestellt von Prof. Kirill Alexandrov, University of Queensland, Australien).

In drei von vier Versuchen wurde ein Cross-Link zwischen den Untereinheiten BBS 1 und BBS 4 gefunden, die laut Annahme direkt miteinander interagieren. Auch die häufigen Verbindungen vom zentral gelegenen BBS 9 mit BBS 1, 5 und 8 unterstützen die angenommene Architektur des Komplexes.

Des Weiteren wurden auch Cross-Links zwischen BBS 18 und den Untereinheiten BBS 8 und BBS 9 gefunden. Da BBS18 in der vermuteten Struktur des Komplexes noch nicht miteinbezogen ist, sind diese Informationen sehr hilfreich. Es ist anzunehmen, dass BBS 18 in der Nähe des N-Terminus‘ von BBS 9 und damit auch bei BBS 8 liegt.

Trotz der geringen Anzahl von identifizierten Cross-Links bargen diese einen hohen Informationsgehalt für die noch unbekannte Struktur des BBSome-Komplexes.

4.5.1 IbpA-Cdc42

Das Protein IbpA (Adenosine monophosphate-protein transferase and cystein protease) ist ein Enzym, das bei der Ansteckung mit dem gramnegativen Bakterium *Histophilus somni* eine wichtige Rolle spielt. Eine Infektion von geschwächten Rindern mit *Histophilus somni* kann innerhalb von 24 Stunden zum Tod der Tiere führen[103]. IbpA katalysiert unter Verwendung von ATP (Adenosintriphosphat) den kovalenten Transfer eines AMP-Restes (Adenosinmonophosphat, auch AMPylierung bzw. Adenylierung genannt) an Tyrosin/Serin/Threonin von Wirtszell-Proteinen, die an der zellulären Signalweiterleitung beteiligt sind. Ein Ziel-Protein ist Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog, bovine), eine kleine GTPase, die vor allem beim Aufbau von Mikrotubuli und deren Befestigung zwischen Spindel und den Centromeren der Chromosomen während der Metaphase der Zellteilung eine wichtige Rolle spielt[104]. Durch die AMPylierung wird Cdc42 inaktiviert und der Aufbau von Mikrotubuli gestört[105].

In Kooperation mit den Gruppen von Prof. Christian Hedberg (Universität Umeå, Schweden, zuvor MPI Dortmund) und Prof. Aymelt Itzen (TU München) sollte mittels Massenspektrometrie untersucht werden, welche Aminosäuren in Cdc42 durch IbpA adenyliert werden. Da die Adenylierung wie die meisten posttranslationalen Modifikationen nur gezielt stattfindet und somit in der Zelle nur niedrig abundant vorliegt, ist eine Anreicherung zur Identifizierung ihrer Wirtszell-Substrate nötigt – allerdings ist bisher keine wirkungsvolle Methode vorhanden. Deshalb wurde ein ATP-Analog entwickelt, welches bei der Transferreaktion ein kovalentes Vernetzen der Adenyltranferase mit dem Substrat und dem Zielprotein ermöglicht. Um diese Verfahren im Proof-of-Principle zu überprüfen, wurden Cdc42 (mit Mutation von Glutamin zu Leucin (Q61L)), eine Teilsequenz von IbpA (IbpA 3483-3797 mit Mutation von Isoleucin zu Cystein (I3755C)) und das ATP-Analog gemeinsam inkubiert, sodass sich theoretisch ein Cross-Link zwischen den beiden Proteinen ausbilden sollte (Abbildung 4-36).

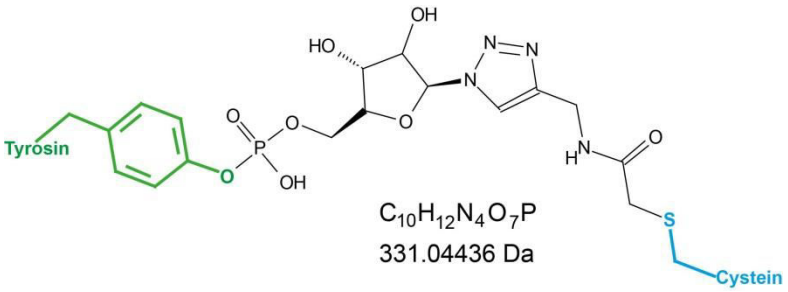

Abbildung 4-36: Gebundenes ATP-Analog, dass anstelle einer konventionellen Adenylierung einen Cross-Link zwischen IpbA-Cystein (blau) und Cdc42-Tyrosin (grün) ausbildet.

Nach der Inkubation wurden die Proben carbamidomethyliert, mit Trypsin verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert (200 ng injiziert, Orbitrap Velos Pro, ID: C3).

Unter Angabe der Massenänderung durch den Cross-Link an Cystein und Tyrosin (+331,0444 Da), den möglichen variablen Modifikationen (Oxidation von Methionin, Carbamidomethylierung von Cystein) und der Protease Trypsin, wurden die akquirierten Daten mit pLink nach dem erwarteten Cross-Link durchsucht.

Bei dieser ersten Suche konnte kein Cross-Link mit dem ATP-Analog gefunden werden. Da Trypsin auch geringe Chymotrypsin-Aktivität zeigen kann, wurde bei den Suchparametern die Protease auf Trypsin und Chymotrypsin geändert.

Mit diesen Sucheinstellungen konnte der gesuchte Cross-Link im Peptid ^{3746}FSDEFEPQI**C**PQTK^{3759}(IbpA)-^{32}FPSE**Y**VPTVFDNY^{44}(Cdc42) identifiziert werden. In Abbildung 4-37 ist das annotierte Fragmentionenspektrum (CID-Fragmentierung) der beiden mit dem ATP-Cross-Linker vernetzten Peptide zusehen. Die unbeschrifteten Signale konnten keinem Fragment zugeordnet werden.

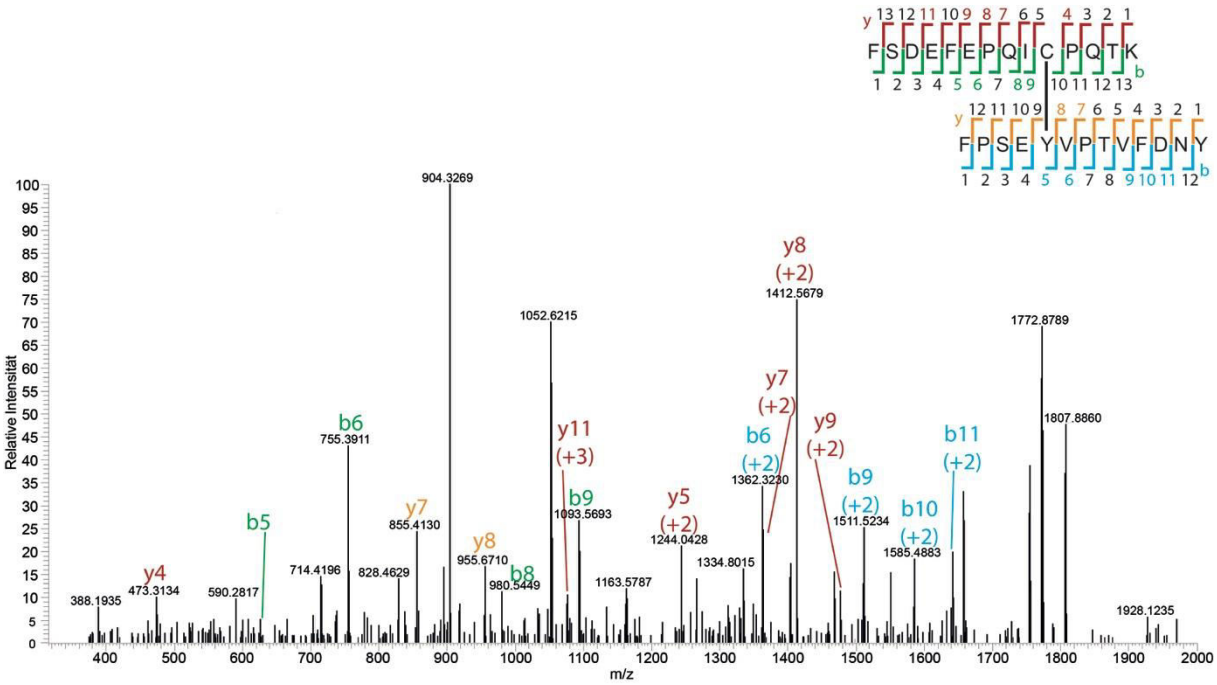

Abbildung 4-37: Fragmentionenspektrum (CID-Fragmentierung) des Cross-Links mit dem ATP-Analog zwischen IbpA-C3755 und Cdc42-Y36. Zugeordnete Fragmentionen sind farbig markiert.

Es zeigte sich also, dass LC-MS/MS mit den korrekten Mess- und Suchparametern auch genutzt werden kann, um unkonventionelle Cross-Links zwischen Proteinen verlässlich zu identifizieren. So konnte zum einen der Transfer der Adenylierung auf Cdc42 nachgewiesen werden und zum anderen wurde bestätigt, dass die verwendete Methode prinzipiell nutzbar ist, um Wirtszell-Substrate von IbpA zu identifizieren und somit den Mechanismus einer Infektion gezielter zu untersuchen. Im nächsten Schritt wäre es nun möglich, weitere Zielproteine mit den genauen Bindungsstellen zu identifizieren.

4.6 Peptid-Standard für Cross-Link Peptide

In der Protein-Massenspektrometrie ist die Verwendung spezieller Suchalgorithmen ein essenzieller Schritt um umfangreiche Datensätze nach verlässlichen Identifikationen zu untersuchen. Um neue Algorithmen bzw. Suchparameter systematisch zu testen, ist die Verwendung von Proben mit (zumindest teilweise) bekannter Zusammensetzung ein wichtiger Schritt. Dies ist allerdings im Fall von Cross-Linking Peptiden ein schwieriges Unterfangen, da zwar bei klassischen Standardproteinen wie BSA in etwa bekannt ist, welche Cross-Links zu erwarten sind, deren Anzahl für systematische Optimierungen allerdings zu begrenzt ist. Daher wäre ein Peptid-Standard aus bekannten Cross-Link Peptiden besonders nützlich zur Evaluierung entsprechender Identifizierungs-Programme. Außerdem könnte ein Peptid-Standard auch zur Optimierung der MS-Messungen, insbesondere in Hinblick auf die Fragmentierung, verwendetet werden. Auch während einer Anreicherung mit ChaFRADIC könnte ein zugefügter Peptid-Standard Aufschluss darüber geben, wie gut die Wiedergewinnung der Cross-Link Peptide während der einzelnen Schritte funktioniert. Ein entsprechender Peptid-Standard ließe sich sowohl für die Optimierung der Anreicherung und Auftrennung als auch für die Messung und Datenauswertung nutzen.

Die Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden ist allerdings schwierig: Zwei Peptide reagieren in Lösung kaum mit einem Cross-Linker, da die Wahrscheinlichkeit, dass die drei Moleküle in Lösung räumlich aufeinandertreffen sehr gering ist – die Bildung von Monolinks ist wahrscheinlicher. Außerdem können keine definierten Produkte erzeugt werden, da jedes Peptid mit sich selbst und mit dem zweiten Peptid reagieren könnte. Die Entwickler von pLink haben zur Validierung ihrer Software synthetische Peptide verwendet, die sie durch diese direkte Reaktion erhalten haben[76]. Das beschriebene Protokoll konnte allerdings nicht reproduziert werden – es wurden keine Cross-Link Peptide erhalten.

Daher wurde untersucht, ob durch die Cross-Link Reaktion in einem einzelnen Peptid und einen anschließenden Verdau mit Trypsin definierte Cross-Link Peptide erzeugt werden können (Abbildung 4-38).

4.6.1 Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden

Abbildung 4-38 zeigt den schematischen Reaktionsablauf der Herstellung synthetischer Cross-Link Peptide mit einem Zwischenschritt über verbrückte Peptide. Dabei wurde auf synthetische Peptide zurückgegriffen, die zwei Lysine enthielten und jeweils durch vier bis sechs Aminosäuren getrennt waren. In der Mitte der Peptidsequenz befand sich immer ein Arginin als Verdau-Schnittstelle. Der N-Terminus bestand bei jedem Peptid aus einem acetylierten Alanin gefolgt von einem Arginin. Durch die Acetylierung war der N-Terminus für das Cross-Linking Reagenz blockiert. Zu diesem Peptid wurde das Cross-Linking Reagenz gegeben. Die einzigen reaktiven Stellen gegenüber dem Cross-Linker waren die beiden Lysine. Reagierte ein Cross-Linker mit einem der Lysine, war die Wahrscheinlichkeit

aufgrund der räumlichen Nähe zum zweiten Lysin im Peptid sehr hoch, dass ein Cross-Link zwischen den beiden Lysinen entstand. Nach dieser Reaktion wurde das Peptid mit Trypsin verdaut: Der acetylierte N-Terminus wurde abgespalten und das Peptid in der Mitte getrennt. Dadurch entstand ein Cross-Link Peptid definierter Sequenz.

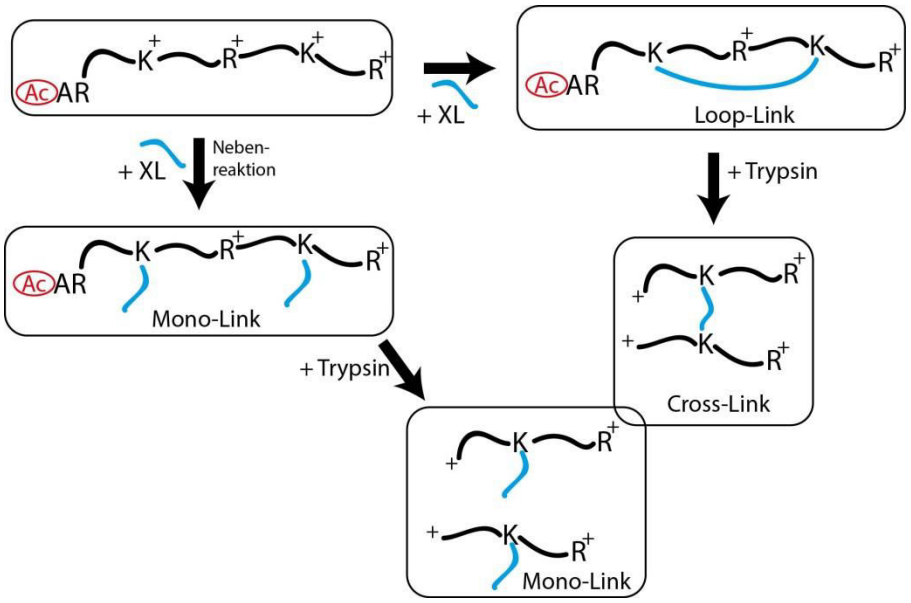

Abbildung 4-38: Schematischer Reaktionsablauf der Herstellung synthetischer Cross-Link-Peptide. Das Peptid reagiert mit dem Cross-Linking Reagenz zu einem Loop-Link, der durch Trypsin-Verdau in ein Cross-Link Peptid gespalten wird. Als Nebenreaktion entstehen Monolinks, die nach Trypsin-Verdau ebenfalls neben dem Cross-Link nachweisbar sein können.

Um die Effizienz dieser Cross-Link Peptid-Herstellung zu überprüfen, wurden 92 synthetische Peptide nach obigem Schema modifiziert und verdaut. Nach der Cross-Linking Reaktion und dem Verdau wurde jedes Peptid (nach Reaktion: 3 pmol, Orbitrap XL, ID: D1; nach Verdau: 3 pmol, Orbitrap Velos Pro/Elite, ID: B2) mittels LC-MS/MS gemessen und pLink analysiert, um das Vorhandensein der gewünschten Produkte zu überprüfen. Die Intralinks (Reaktionsprodukt vor Verdau) wurden mit pLink mit BS^3-$d_{0/4}$ als Cross-Linker, N-terminaler Acetylierung und ohne Protease gesucht. Die Cross-Links wurden mit der gleichen Datenbank (siehe Anhang, Kapitel 8.16.4) mit Trypsin als Protease und BS^3-$d_{0/4}$ als Cross-Linker gesucht.

Nach der Cross-Linking Reaktion konnte in 91 von 92 Peptiden (99 %) der gewünschte Intralink nachgewiesen werden. Diese Peptide wurden anschließend mit Trypsin verdaut. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 8-25 im Anhang zusammengefasst.

Nach dem Verdau mit Trypsin konnte in 53 von 91 Peptiden (58 %) der erwartete Cross-Link nachgewiesen werden. In den restlichen 38 Peptiden gelang dies trotz zuvor nachgewiesenem Loop-Link nicht.

Daher wurden die MS-Dateien mit Mascot nach dem Vorkommen linearer Peptide durchsucht, um herauszufinden, ob die jeweiligen Teilsequenzen des ursprünglichen Peptids nach Verdau überhaupt nachgewiesen werden konnten. Das Vorhandensein von entsprechenden Monolinks ist außerdem ein Nachweis für den erfolgreichen Verdau (siehe Abbildung 4-38). In zwei Proben wurden weder Mono- noch Cross-Links identifiziert. In den restlichen 36 Proben waren die Mono-Links nach Verdau immer nachweisbar. Dies bedeutete, dass die Peptide erfolgreich verdaut wurden und mit dem Cross-Linking Reagenz reagiert hatten.

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen der Cross-Link Peptide trotz des Nachweises der Loop-Links vor dem Verdau ist die geringe Ausbeute der Reaktion. Das Identifizieren des Intralinks gibt keinen Hinweis darauf, wie gut der Umsatz des Peptids mit dem Reagenz war – es sagt lediglich aus, dass das Loop-Link Peptid *nachweisbar* war. Durch den Verdau steigt zusätzlich die Komplexität der Probe: Zum einen wurde das Loop-Link Peptid zum Cross-Link Peptid verdaut, zum anderen wird das nicht-modifizierte und Mono-Link Peptid zu kleineren Peptiden verdaut. Durch diesen erhöhten Peptidhintergrund wird die Identifikation des Cross-Links nochmals erschwert. Nachteilig kann sich hier außerdem eine schlechtere Ionisierung des Cross-Link Peptids auswirken. Um den Umsatz des Ausgangspeptids zum Looplink abzuschätzen, könnte eine relative Quantifizierung zu einer unbehandelten Kontrollprobe genutzt werden, da die Intensitätsunterschiede der Ausgangs- und Endprodukte hier direkt verglichen werden könnten.

Die Theorie der geringen Reaktionsausbeute wurde durch die Identifikations-Scores der Loop-Links bekräftigt (siehe Tabelle 8-25 im Anhang). Die Scores der Loop-Links reichten von eher schlechten Scores (8.37E-04) bis zu sehr guten Scores (7.67E-13) mit einem Median von 1.13E-07. 45 Loop-Peptide hatten einen guten Score unter dem Median, wobei bei 73 % dieser Loop-Links nach dem Verdau auch ein Cross-Link identifiziert werden konnte. Bei den 46 Loop-Peptiden, deren Score über dem Median lag, konnte nur bei 34 % ein Cross-Link nach dem Verdau nachgewiesen werden. Der Score korreliert zwar nicht direkt mit der Peptid-Menge, allerdings erhöht eine größere Menge prinzipiell die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Spektren und somit auch bessere Spektren akquiriert werden können.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass mit diesem neuen Herstellungsverfahren 60 % der Peptide erfolgreich in Cross-Link Peptide umgesetzt wurden. Eine Verminderung der Ausbeute passierte im zweiten Reaktionsschritt (Verdau), da zwar bei fast allen Peptiden die Zwischenstufe des Loop-Links nachgewiesen werden konnte, aber dieser nur bei etwas mehr als der Hälfte der Peptide auch zum nachweisbaren Cross-Link führte. Im Vergleich zur direkten Reaktion zweier Peptide mit dem Cross-Linking Reagenz bot diese zweistufige Reaktion aber deutliche Vorteile – schließlich konnten vorher gar keine Cross-Links nachgewiesen werden.

Es ist trotzdem erstrebenswert die Ausbeute der Reaktion zu erhöhen, um im zweiten Schritt dann auch mehr nachweisbare Cross-Links zu erhalten. Da das Cross-Linking Reagenz sehr reaktiv gegenüber Wasser ist, könnte der Anteil des organischen Lösungsmittels in der Reaktionslösung erhöht werden, um die Wahrscheinlichkeit der Hydrolyse des Reagenzes zu senken. Außerdem sollten entstanden Cross-Links von den restlichen Probenbestandteilen nach dem Verdau abgetrennt werden, um reinere Peptide zu erhalten (z.B. SCX-Auftrennung).

4.6.2 Untersuchung der optimalen Fragmentierung für Cross-Link Peptide

Aus den 53 erfolgreich hergestellten Cross-Link Peptiden wurden 20 Peptide ausgewählt (Tabelle 4-24, grau in Tabelle 8-25 im Anhang), die in mit gutem Score (< 8.24E0-4) identifiziert werden konnten. Es wurden jeweils gleiche Mengen der Peptide gemischt (jeweils 3 pmol/µL bezogen auf das Ausgangspeptid vor Reaktion und Verdau, Orbitrap Elite, ID: B3/4/5). Dieser 20-Peptid-Standard wurde im Folgenden verwendet, um verschiedenen Fragmentierungsbedingungen für Cross-Link Peptide miteinander zu vergleichen.

Tabelle 4-24: Peptidsequenzen der Cross-Link Peptide im 20-Peptid-Standard mit Nummerierung zur leichteren Zuordnung. Die verknüpften Lysine sind blau markiert. Die ursprünglich verbundenen Sequenzen sind an der Schnittstelle mit | markiert.

#	Peptidsequenzen
1	YTDKVSGR | EAKLLPR
2	NDPKEFR | SGKGVDTR
3	TSLFKAQR | NVKNFNR
4	VSQKQDR | GDKNSANR
5	DVTKIAR | SAKDVGR
6	IDYKGAR | SYKSTLR
7	APIKFFR | GVKNEQR
8	VAGKVLR | EGKSIAVR
9	QIVYKFSR | NPKVPTR
10	TPAEKFTR | VAKNFDR
11	SITKPAR | NKSFLER
12	APTKFIR | ISKFQDR
13	VPLDKSVR | FQKQEQR
14	FSGKDIFR | GYKQTFR
15	ELLKLDR | IQKILQSR
16	TSIKSDR | IFKNETR
17	GQFAKDQR | VKHPYR
18	DPNKTNR | SHKDNSR
19	IHQKVDR | YIKGIDDR
20	LNNKYIGR | YVKYVR

Die häufigste MS-Methode für Cross-Link Proben ist in der Literatur die Fragmentierung mit CID und Detektion in der Ionenfalle (CID-IT). Dagegen wurde die Fragmentierung mit HCD und CID und Detektion in der Orbitrap verglichen (CID/HCD-OT). Die Probe wurde je Fragmentierungs-Detektions-Kombination zweimal gemessen und mit pLink ausgewertet.
Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-39 grafisch zusammengefasst (detaillierte Ergebnisse in Tabelle 8-26 im Anhang). Es war direkt zu sehen, dass mit CID-Fragmentierung und Detektion in der Ionenfalle (grün) das schlechteste Ergebnis erhalten wurde. Es wurden deutlich weniger Cross-Links identifiziert, die zusätzlich auch schlechtere Identifizierungs-Scores aufwiesen. Wurden die Fragmentionen statt in der Ionenfalle in der Orbitrap analysiert, verbesserten sich die Identifizierungen stark: Es wurden mehr als doppelt so viele der Standard-Peptide identifiziert (blau und orange). Durch die höhere Massengenauigkeit der Fragmentionenspektren verbesserte sich außerdem der Score der identifizierten Peptide um bis zu drei Größenordnungen erheblich. Ob nun mit CID oder HCD fragmentiert wurde, spielte keine signifikante Rolle.

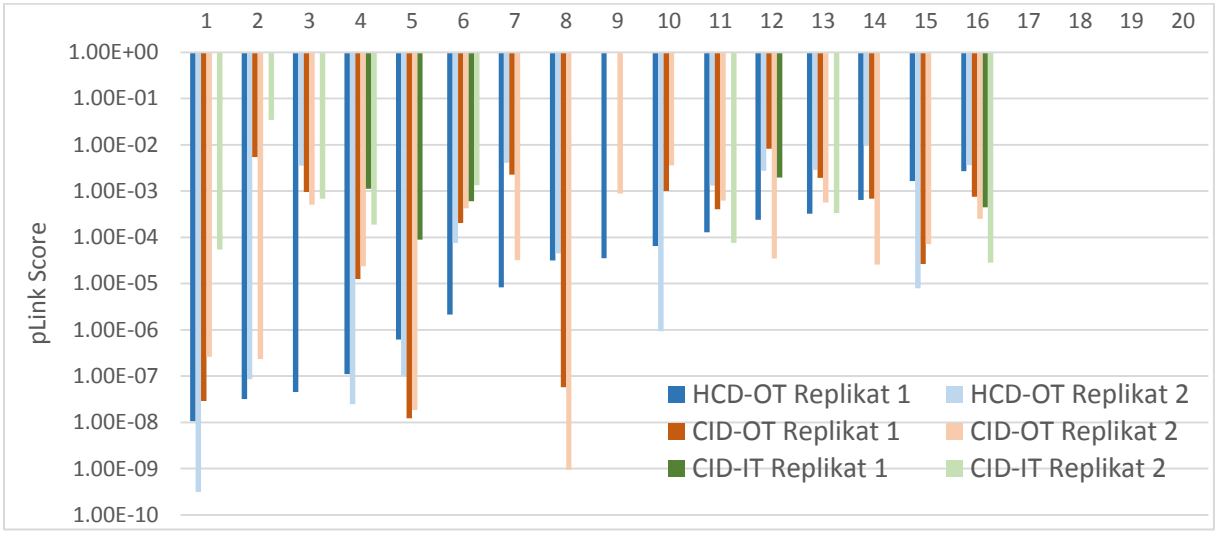

Abbildung 4-39: Balkendiagramm zu den Scores der identifizierten Peptide im Cross-Link Peptid-Standard mit den verschiedenen MS-Methoden (blau: HCD-OT, orange: CID-OT, grün: CID-IT, hell/dunkel = jeweils ein Replikat). Die Cross-Link Peptide sind von 1-20 durchnummeriert, die passenden Sequenzen können Tabelle 4-24 entnommen werden. Peptid 17-20 konnten in der 20-Peptid-Standard Mischung nicht infiziert werden.

Vier Peptide (Peptid #17-20 in Abbildung 4-39) konnten mit keiner Methode identifiziert werden. Diese Peptide wurden dann manuell in den MS-Dateien gesucht. Nur ein Peptid (Peptid #20, LNNKYIGR | YVKYVR) konnte durch Vergleichen der Retentionszeit und des MS^1-Spektrums der Messung des einzelnen Peptids manuell gefunden werden, allerdings lag bei der Messung des 20-Peptid-Standards kein Fragmentionenspektrum vor, weswegen pLink das Peptid nicht identifizieren konnte.

Die Tatsache, dass in dieser Mischung wiederum Cross-Links nicht gefunden werden konnten, die in den Einzelmessungen gut nachweisbar waren, offenbarte eine Schwäche dieser Cross-Link Herstellung: Durch den Verdau ist hatte jedes Peptid für sich genommen schon einen komplexeren Hintergrund und enthielt nicht nur das gewünschte Cross-Link Produkt. Mischt man nun 20 dieser Proben, entsteht eine durchaus vielfältige Mischung. Vermutlich waren daher auch vier Peptide nicht mehr nachweisbar. Zusätzlich konnte vorher nicht bestimmt werden, welche genaue Menge der einzelnen Cross-Link Peptide in jeder Probe enthalten war. Es ist möglich, dass die Cross-Link Peptide sehr unterschiedliche Konzentrationen hatten. Gerade die Cross-Links, die nur in sehr geringer Menge vorlagen, könnten somit sehr leicht durch andere Probenbestandteile überlagert worden sein.

Trotz dieser Schwächen enthält der Cross-Link Peptid-Standard 16 Peptide, die sicher nachgewiesen werden können. Die Ergebnisse waren insofern überraschend, dass mit CID-Fragmentierung und Detektion in der Ionenfalle zuvor auch (scheinbar) gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Dennoch war es offensichtlich, dass zur Identifizierung der Peptide die Detektion in der Orbitrap – unabhängig von der Fragmentierungsmethode – zu bevorzugen ist. Dies müsste allerdings zusätzlich mit den weiteren Standard-Peptiden bestätigt werden. Gegebenenfalls müssen zusätzlich die LC und MS Bedingungen (z.B. HCD Kollisionsenergien) optimiert werden.

5 Fazit

Ziel dieser Arbeit war die systematische Betrachtung der Analyse von Protein Cross-Link Peptiden mittels Massenspektrometrie, um diese in verschiedenen Punkten zu evaluieren und zu verbessern.

Bei der Suche nach einem geeigneten Modellprotein für Cross-Linking wurden Bovines Serum Albumin (BSA) und Hämoglobin gegenübergestellt. Obwohl Hämoglobin als Protein mit vier globulären Untereinheiten auf den ersten Blick sehr geeignet für Cross-Linking Versuche schien, stellte sich heraus, dass gerade die gleichartigen Untereinheiten eine eindeutige Auswertung unmöglich machten: Es kann keine klare Aussage getroffen werden, ob sich ein Cross-Link innerhalb einer einzelnen Untereinheit oder zwei gleichen Untereinheiten befand. Das ebenfalls globuläre BSA liegt hingegen als Monomer vor und war aufgrund seiner Größe, Lysin-Anzahl und –verteilung sehr gut geeignet. Mit BSA konnten rund 10 Cross-Links gefunden werden, die im weiteren Verlauf der Arbeit als Referenz dienten.

Im nächsten Schritt erfolgte mit Hilfe der bekannten Cross-Links in BSA eine Evaluierung verschiedener Suchprogramme für Cross-Link Peptide. Beim Vergleich der drei Suchprogramme StavroX, xQuest und pLink dienten die Zahl der identifizierten Cross-Links und die Handhabbarkeit der Programme als Vergleichskriterien. Bei den Identifizierungen unterschieden sich die Programme nur unwesentlich: Keines konnte alle möglichen Cross-Links identifizieren und keines war in diesem Punkt signifikant besser als ein anderes. Große Unterschiede wurden jedoch bei der generellen Aufmachung der Programme festgestellt: Während StavroX mit einer selbsterklärenden Nutzeroberfläche die Bedienung sehr einfach macht, mussten die Ergebnisse nach der Suche mit viel Aufwand von Hand gesichtet und sortiert werden. Hier lieferten pLink und xQuest übersichtliche Excel-Dateien – allerdings zum Preis einer anspruchsvolleren Bedienung im Command-Line Fenster. Den Kompromiss aus Bedienung und Ergebnispräsentation gewann schließlich pLink für sich, da hier im Gegensatz zu xQuest mit Windows anstelle von Linux gearbeitet werden konnte und die gruppierten Ergebnisse in der Excel-Datei am übersichtlichsten waren. Ein objektiv besseres bzw. schlechteres Such-Programm konnte nicht bestimmt werden, da dies stark von den Ansprüchen und Computerkenntnissen des Nutzers abhängt.

Zur Untersuchung unterschiedlicher Cross-Linker wurden anschließend BSA und pLink verwendet. Beim Vergleich von zwei chemischen Cross-Linkern (BS^3 und BS^2G), die sich lediglich in ihrer Spacer-Länge unterschieden, zeigte sich, dass auch geringe Unterschiede (hier: 4 Å) in der Spacer-Länge schon deutliche Unterschiede bei der Ausbildung von Cross-Links machten. Schon in einem einzelnen Protein wie BSA wurden durch die parallele Verwendung von zwei Cross-Linking Reagenzien 25 % bzw. 36 % mehr Cross-Links gegenüber der Verwendung eines einzelnen Cross-Linkers identifiziert. Generell ist der

Einsatz mehrerer Cross-Linker verschiedener Länge zur Untersuchung von Proteinen und Protein-Komplexen immer ratsam, da zusätzliche Informationen gewonnen werden können und der Aufwand dabei vergleichsweise gering ist. Zusätzlich wäre es lohnenswert zu überprüfen, ob auch der Einsatz von Cross-Linkeren mit weiteren Aminosäureseitenketten-Spezifitäten (z. B. gegen Thiole, Hydroxide oder ganz unspezifisch) einen ähnlich hohen Zusatznutzen liefern.

Daneben wurde die Aktivierung von photochemischen Cross-Linkern (Diazirine) näher betrachtet. Hier war das Ziel, die Aktivierung mittels UV-Lampe durch einen gepulsten Laser zu ersetzen, um die Bestrahlungszeit mit UV-Licht stark zu verkürzen. Da mit dem gepulsten Laser keine Aktivierung und Bindung des Cross-Linkers erreicht werden konnte, wurde anschließend die genaue Aktivierungszeit des Diazirin-Cross-Linkers bestimmt. Es wurde vermutet, dass in den anfänglichen Laser-Versuchen zu wenig Energie übertragen wurde. Eine Erhöhung der Laserenergie führte allerdings zu Beschädigungen der Probengefäße und machte die Proben unbrauchbar. Ein Problem könnte generell der enge Wellenlängenbereich des Lasers sein: Der Laser hatte vermutlich die falsche Wellenlänge, obwohl diese im empfohlenen Bereich lag. Eine UV-Lampe deckt einen deutlich breiteren Bereich ab, wodurch die Reaktion sicher gestartet werden konnte. Allerdings mussten mit der verwendeten UV-Lampe die Proben für eine ausreichende Reaktionsausbeute mindestens 30 min bestrahlt werden. Der Ansatz der Aktivierung mittels Laser sollte zukünftig weiterverfolgt werden, um die Bestrahlungszeit zu verkürzen – doch die geeignete Wellenlänge muss genauer bestimmt werden. Eine weitere Überlegung wäre die Verwendung einer stärkeren UV-Lampe zur Verkürzung der Reaktionszeit.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurden anschließend verschiedene Ansätze zur Anreicherung von Cross-Link Peptiden untersucht. Alle Methoden basierten auf dem ChaFRADIC-Protokoll (Charge based Fractional Diagonal Chromatography; zweidimensionale Kationenaustausch-chromatographie (SCX) mit Derivatisierung der Peptide nach der ersten SCX-Dimension zum Ladungsverlust und damit einhergehendem, geändertem Elutionsverhalten bestimmter Peptide in der zweiten SCX-Dimension). ChaFRADIC wurde ursprünglich zur Anreicherung von N-terminalen Peptiden mittels SCX-Chromatographie entwickelt. Es stellte sich allerdings schnell heraus, dass nach der vorgesehenen Derivatisierung im ChaFRADIC-Protokoll ein effizienter Verdau mit Trypsin aufgrund der miteinander verknüpften Lysine nicht mehr möglich war, da durch die Cross-Links sehr große vernetzte Peptide-Gebilde entstanden.

Um diese Problematik zu umgehen, wurden neue abspaltbare Derivatisierungen getestet, die erst nach dem Verdau und der ersten SCX-Dimension zum Einsatz kommen sollten. Die erste Derivatisierung, bei der ein Phenylacetyl-Rest mit freien Aminen reagiert und anschließend enzymatisch wieder abgespalten wird, musste schon im Ansatz verworfen werden, da das Enzym Penicillin-Acyclase entgegen der Erwartungen reagierte: Die gewünschte Abspaltung des Phenylacetyl-Restes konnte nicht erreicht werden, jedoch wurde das Peptid unspezifisch

gespalten. Eine Weiterverfolgung des Ansatzes wurde zugunsten einer weiteren Derivatisierung dann verworfen: Die Boc-Gruppe, die vor allem als Schutzgruppe von freien Aminen in der organischen Synthese bekannt ist, wurde als robuste Alternative erkannt. Sowohl die Derivatisierung von freien Aminen mit einer Glycin-Boc-Gruppe als auch die Abspaltung der Boc-Gruppe stellte sich als einfache, schnelle und spezifische Reaktion heraus. Die Boc-Gruppe war außerdem während der Inkubation in Verdau- und SCX-Puffer stabil und zeigte keine unspezifische Abspaltung. Zusätzlich hatte die Gly-Modifikation an freien Aminen einen positiven Effekt auf die Identifizierung der Cross-Links. Die Scores der Treffer wurden deutlich verbessert, was die Sicherheit der Identifizierung erhöhte.

Mit dieser GlyBoc-Derivatisierung wurde dann ein Anreicherungsansatz nach dem ChaFRADIC-Prinzip aufgesetzt (Gly-ChaFRADIC). Es gelang im Vergleich zu einer Kontroll-Probe ohne Anreicherung die Identifizierung zusätzlicher Cross-Links. Allerdings war die Anreicherungs-Effizienz mit nur 34 % nicht zufriedenstellend. Dieser schlechte Wert konnte vor allem über eine unzureichende Ladungsauftrennung in der zweiten Dimension und eine zu unspezifische Ladungsveränderung der Peptide erklärt werden. Aber gerade aufgrund der sehr guten Ergebnisse zur Verbesserung der Identifizierungs-Scores bei dieser Methode sollte dieser Ansatz weiterverfolgt werden. Durch eine bessere Ladungstrennung in der SCX-Chromatographie könnte die Anreicherungseffizienz noch erhöht werden.

In einem weiteren Ansatz wurde die benötigte Ladungsänderung der Peptide über deren Länge, also über die Zahl der positiv geladenen Aminosäuren im Peptid, gesteuert. Vor der ersten SCX-Dimension erfolgte ein Verdau mit LysC, wodurch das Protein nur an Lysin gespalten wurde – es entstanden lange, hochgeladenen Peptide. Vor der zweiten Dimension wurde mit Trypsin verdaut, sodass eine Spaltung der Peptide nun auch nach Arginin erfolgte. Durch die Verkürzung und damit einhergehende Ladungsverringerung der Peptide wurde das benötigte veränderte Elutionsverhalten erreicht. Im Vergleich zu Gly-ChaFRADIC konnte hier eine spezifischere Ladungsänderung der Peptide induziert werden, was sich auch in der Anreicherungseffizienz widerspiegelte: Während die Wiederfindungsrate von Cross-Links und linearen Peptiden für beide Methoden annähernd gleich war, lag die Anreicherungs-Effizienz hier schon bei 43 %. Auch hier gelang die Identifizierung zusätzlicher Cross-Links im Vergleich zur Kontrolle. Zusätzlich lag die Zahl der gefundenen Cross-Links auch über der Zahl des ersten Verfahrens. Allerdings ist auch hier Optimierungsspielraum gegeben, um die Effizienz zu verbessern. Genau wie bei der ersten Methode liegen hier die besten Möglichkeiten bei einer noch besseren Ladungsauftrennung während der SCX-Chromatographie.

Abschließend wurde ein anderer Ansatz aus Kombination von Größenausschluss- (SEC) und SCX-Chromatographie getestet. Der Verdau der Proteine erfolgte hier ebenfalls sequenziell mit LysC und Trypsin. Die erste Abtrennung resultierte nur über die Länge der LysC-Cross-Link Peptide in der Größenausschluss-Chromatographie. Obwohl die Anreicherungseffizienz

mit der von XL-ChaFRADIC vergleichbar war, wurden weniger zusätzliche Cross-Links identifiziert. Aufgrund der Verwendung von SEC-Microcolumns anstelle eines chromatographischen Systems besteht auch hier die Möglichkeit mit einer höheren Auflösung weitere Verbesserungen bei der Anreicherung zu erreichen.

Insgesamt sind alle drei Methoden sehr vielversprechend, um die Anreicherung und damit auch Analyse von Cross-Links zu verbessern. Das Potenzial der Methoden wurde mit dem Modellprotein BSA in allen drei Fällen bewiesen, sodass zukünftig auch die Ausweitung auf größere Komplexe folgen sollte. Zusätzlich können auch weitere Cross-Linker mit den unterschiedlichsten Eigenschaften auf ihre Einsetzbarkeit hinsichtlich der Anreicherung überprüft werden.

Neben der Entwicklung einer Anreicherungsmethode für Cross-Links wurden in Kooperation mit anderen Forschungsgruppen auch weitere Proteine mittels Massenspektrometrie betrachtet. So wurde ein Teil des BBSome-Komplexes mit den zwei klassischen Cross-Linkern BS^2G und BS^3 behandelt und anschließend auf Cross-Links untersucht. Da dieser Komplex nicht kristallisiert werden kann, bot das Cross-Linking hier neue Einblicke in die Interaktion der sechs Untereinheiten. Es konnten einige Cross-Links zwischen den verschiedenen Protein-Untereinheiten gefunden werden, was besonders viele Rückschlüsse auf deren Lage zueinander zuließ. In einem anderen, unkonventionellen Ansatz wurde die Interaktion eines Enzyms (IbpA) mit dessen Zielprotein (Cdc42) betrachtet. Dabei kam kein klassischer Cross-Linker zu Einsatz: Das IbpA-Substrat ATP wurde so modifiziert, dass nach der enzymatischen Reaktion beide Proteine über das ATP kovalent verknüpft waren. Auch dieser Cross-Link konnte nach Trypsin-Verdau mit Hilfe von LC-MS/MS- und pLink-Analyse sehr gut identifiziert werden. Dies demonstriert erneut die Stärke von Cross-Linking, da im Prinzip jede beliebige kovalente Bindung – ob nativ (z.B. Disulfidbrücken) oder künstlich (z.B. Cross-Linking) – identifiziert werden kann. Hinzu kommt hier, dass gerade bei der Analyse von nativen kovalenten Bindungen wie Disulfid-Bindungen die oben genannten Anreicherungsmethoden von besonderem Nutzen sein können, um diese trotz niedriger Abundanz in komplexen Zelllysaten zugänglich zu machen. Disulfid-Bindungen geben nicht nur zusätzliche Hinweise auf die Proteinstruktur, sondern auch zum Redox-Status und oxidativem Stress der Zelle, da diese die Entstehung von Disulfid-Bindungen beeinflussen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde ein Standard für Cross-Link Peptide entwickelt. Da die direkte Reaktion von einzelnen Peptiden mit Cross-Linking Reagenzien nur unzureichende Ausbeuten liefert, wurden hier Peptide mit speziellem Aufbau verwendet, um Cross-Links zu erreichen. Der Cross-Link entstand hier innerhalb eines Peptides, das anschließend durch einen enzymatischen Verdau zu einem klassischen Cross-Link Peptid wurde. Dieser Ansatz bot den Vorteil, dass Cross-Link Peptide mit beliebiger Aminosäuresequenz gebildet werden können. Bei 92 eingesetzten Peptiden wurde bei 91 die erfolgreiche Verknüpfung der zwei Lysine gefunden (Loop-Link). Nach dem Verdau wurde allerdings nur bei 53 Peptiden das

entsprechende Cross-Link Peptid identifiziert. Die geringe Ausbeute kann vermutlich auf den nicht quantitativen Ablauf der Reaktion zurückgeführt werden. Durch das Identifizieren des Loop-Links konnte keine Aussage über die Ausbeute der Reaktion geschlossen werden. Hier sollten zukünftig Verbesserung sowohl bei der Reaktionseffizienz als auch bei Überprüfung dieser ins Auge gefasst werden. Auch Ansätze zur Abtrennung der hergestellten Cross-Link Peptide aus der Reaktionslösung sollten überprüft werden.

Aus den 53 synthetischen Cross-Link Peptiden wurden zwanzig Peptide ausgewählt, um eine Standard-Mischung herzustellen. Dieser Standard wurde genutzt, um zu überprüfen, welche Fragmentierungs- und Messbedingungen (CID oder HCD bzw. Ionenfallen oder Orbitrap) die besten Ergebnisse bei der Identifizierung von Cross-Links liefern. Dabei wurde zum einen festgestellt, dass von den zwanzig Cross-Link Peptiden nur 16 in der Mischung überhaupt identifiziert werden konnten. Hier wurde wieder davon ausgegangen, dass die unklaren Mengenverhältnisse ein Problem darstellen und die verlorenen Peptide durch geringe Abundanz in der Mischung „untergingen“. Zum anderen wurde erkannt, dass die Art der Fragmentierung keinen Unterschied ergab, allerdings die Messung in der Orbitrap deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich Anzahl und Score der infizierten Cross-Links lieferte. Die Möglichkeit, einen Standard aus Cross-Link Peptiden herzustellen, ermöglicht zukünftig die kritischen Phasen wie LC-MS/MS-Analyse und softwareunterstütze Datenauswertung von Cross-Links besser zu evaluieren. So können Suchprogramme mit diesem Standard nun besser bewertet werden, da im Vergleich zu einem Modell-Protein genau bekannt ist, welche Cross-Links enthalten sind. Auch für die weitere Überprüfung und Optimierung der Anreicherungseffizienz und Wiederfindungsraten der neuen ChaFRADIC-Ansätze ist der Peptid-Standard sehr gut geeignet. Da beliebige Peptidsequenzen verwendet werden können, ist es hier auch möglich, bestimmte Cross-Link Peptide aus Proteinen nachzubilden, um deren Fragmentierung- und Anreicherungsverhalten gezielt zu beobachten. Es wäre sogar möglich, bestimmte Peptide mit schweren Isotopen herzustellen, um diese als internen Standard zur Quantifizierung zu verwenden.

6 Literaturverzeichnis

1. Blackstock, W. P.; Weir, M. P., Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* **1999,** *17* (3), 121-127.
2. Mulder, G. J., Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen. *Journal für Praktische Chemie* **1839,** *16* (1), 23.
3. Winkler, H. L., Verbreitung und Ursache der Pathenogenesis im Pflanzen- und Tierreiche. Verlag Fischer: Jena, 1920.
4. Lottspeich, F.; Engels, J. W., *Bioanalytik*. Spektrum Academischer Verlag: Heidelberg, 2012.
5. PTMcode2 Known and predicted PTM funtional associations. http://ptmcode.embl.de/index.cgi (accessed 11.08.2015).
6. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry*. 5th ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 2002.
7. Nagaraj, N.; Wisniewski, J. R.; Geiger, T.; Cox, J.; Kircher, M.; Kelso, J.; Paabo, S.; Mann, M., Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular systems biology* **2011,** *7* (548), 1-7.
8. Thomson, J.J., Rays of positive electricity. *Proceed. R. Soc. A* **1913**, 89, 1-20.
9. Britannica, E. Arthur Jeffrey Dempster. http://www.britannica.com/biography/Arthur-Jeffrey-Dempster (accessed 31.10.2015).
10. Otto, M., *Analytische Chemie*. Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
11. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989,** *246* (4926), 64-71.
12. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.* **1985,** *57* (14), 2935-9.
13. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B., Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **1968,** *49* (5), 2240-2249.
14. Iribane, J. V.; Thomson, B. A., On evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976,** *64* (6), 2287-2294.
15. Paul, W.; Steinwedel, H. Verfahren zur Trennung bzw. zum getrennten Nachweis von Ionen verschiedener spezifischer Ladung. DE 944900 C, 24. Dezember, 1953.
16. Paul, W., Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Rev. Mod. Phys.* **1990,** *62 (3), 531-540.*
17. Makarov, A., Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* **2000,** *72* (6), 1156-1162.

18. Planet Orbitrap. http://planetorbitrap.com/orbitrap-elite – tab:schematic (accessed 16.11.2015).

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

20. Biemann, K., Mass Spectrometry of Peptides and Proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **1992,** *61*, 977-1010.

21. Wells, J. M.; McLuckey, S. A., Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. In *Methods in Enzymology*, Elvesier: 2005; Vol. 402, pp 148-185.

22. Olsen, J. V.; Macek, B.; Lange, O.; Makarov, A.; Horning, S.; Mann, M., Higher-energy C-Trap dissociation for peptide modfication analysis. *Nat. Methods* **2007,** *4*, 709-712.

23. Hunt, D. F.; Coon, J. J.; Syka, E. P.; Marto, J. A. Electron transfer dissociation for biopolymer sequence mass spectrometric analysis. US 2005199804 A1, 15. September, 2005.

24. Steen, H.; Mann, M., The ABC'S (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Reviews* **2004,** *5*, 699-711.

25. Mann, M.; Wilm, M. S., Error tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal. Chem.* **1994,** *66*, 4390-4399.

26. Eng, J. K.; McCormack, A. I.; Yates, J. R., An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in proteni database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994,** *5*, 976-989.

27. Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999,** *20*, 3551-3567.

28. Nesvizhskii, A.I., O. Vitek, Aebersold, R., Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. Nat. Methods **2007**, *45* (10), 787-797.

29. Tswett, M. S., On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis. *Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists* **1905,** *14* (6), 20-39.

30. PolyLC Inc., Polysulfoethyl A for Cation-Exchange of Peptides. http://polylc.com/PolySULFOETHYL.html (accessed 20.12.2016).

31. Venne, A. S.; Vogtle, F. N.; Meisinger, C.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., Novel highly sensitive, specific, and straightforward strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase Icp55. *Journal of proteome research* **2013,** *12* (9), 3823-30.

32. Gevaert, K.; Goethals, M.; Martens, L.; Van Damme, J.; Staes, A.; Thomas, G. R.; Vandekerckhove, J., Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectroemtric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat. Biotech.* **2003,** *21* (5), 566-569.

33. COFRADIC: Combined FRActional Diagonal Chromatography. http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Cofradic.html (accessed 23.01.2016).

34. Martens, L.; Van Damme, P.; Van Damme, J.; Staes, A.; Timmerman, E.; Ghesqière, B.; Thomas, G. R.; Vandekerckhove, J.; Gevaert, K., The human

platelet proteome mapped by peptide-centric proteomics: a functional protein profile. *Proteomics* **2005,** *5* (12), 3193-204.

35. Gevaert, K.; Staes, A.; Van Damme, J.; De Groot, S.; Hugelier, K.; Demol, H.; Martens, L.; Goethals, M.; Vandekerckhove, J., Global phosphoproteome analysis on human HepG2 hepatocytes using reversed-phase diagonal LC. *Proteomics* **2005,** *5* (14), 3589-99.
36. Stes, E.; Laga, M.; Walton, A.; Samyn, N.; Timmerman, E.; De Smet, I.; Goormachtig, S., Gaevert, K., A COFRADIC protocol to study protein ubiquination, *J. Proteom. Res.* **2014**, 13 (6), 3107-13.
37. Venne, A. S.; Solari, F. A.; Faden, F.; Dissmeyer, N.; Zahedi, R. P., An improved workflow for quantitative N-terminal charge-based fractional diagonal chromatography (ChaFRADIC) to study proteolytic events in Arabidopsis thaliana. *Proteomics* **2015,** *15* (14), 2458-69.
38. Sanger, F., The Free Amino Groups of Insulin. *Biochem. J.* **1945,** *39* (5), 507-515.
39. Edman, P., A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **1949,** *22* (3), 475.
40. Medzihradszky, K. F., Peptide Sequence Analysis. In *Methods in Enzymology*, Elvesier: 2005; Vol. 402.
41. Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H., A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature* **1958,** *181*, 662-666.
42. PDB Databank, Yearly Growth of Structures Solved by X-ray. http://www.rcsb.org/pdb/statistics/contentGrowthChart.do?content=explMethod-xray&seqid=100 (accessed 08.11.2016).
43. The Nobel Prize in Physics 1952.

    http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1952/ (accessed 13.07.2016).
44. PDB Databank, Yearly Growth of Structures Solved by NMR. http://www.rcsb.org/pdb/statistics/contentGrowthChart.do?content=explMethod-nmr&seqid=100 (accessed 14.11.2016).
45. Callaway, E., The revolution will not be crystallized: a new method sweeps trough structural biology. *Nature* **2015**, 525, 172-174.
46. Förster, T., Zwischenmolekulare Engeriewanderung und Floureszenz. *Ann. Physik* **1948,** *437* (1-2), 55-75.
47. Fields, S.; Song, O., A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **1989,** *340* (6230), 245-46.
48. Hu, C. D.; Chinenov, Y.; Kerppola, T. K., Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular flourescence complementation. *Mol. Cell.* **2002,** *9* (4), 789-98.
49. Kaboord, B.; Perr, M., Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Meth. Mol. Biol.* **2008,** *424*, 349-364.

50. Rigaut, G.; Shevchenk, A.; Rutz, B.; Wilm, M.; Mann, M.; Séraphin, B., A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotech.* **1999,** *17*, 1030-1032.

51. Hoofnagle, A. N.; Resing, K. A.; Ahn, N. G., Protein analysis by hydrogen exchange mass spectrometry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003,** *32*, 1-25.

52. Mayer, M. P., Einsicht in die Dynamik von Proteinen. *BIOSpektrum* **2008,** *14. Jahrgang*, 267-68.

53. Seielstad, D. A.; Carlson, K. E.; Kushner, P. J.; Greene, G. L.; Katzenellenbogen, J. A., Analysis of the structural core of human estrogen receptor ligand binding domain by selective proteolysis/mass spectrometry. *Biochemistry* **1995,** *34* (39), 12605-15.

54. Davies, G. E.; Stark, G. R., Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1970,** *66* (3), 651-656.

55. Schilling, B.; Row, R. H.; Gibson, B. W.; Guo, X.; Young, M. M., MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003,** *14* (8), 834-850.

56. Schmidt, C.; Kramer, K.; Urlaub, H., Investigation of protein-RNA interactions by mass spectrometry-techniques and applications. *J. Proteomics 75* (13), 3478-3494.

57. Gubbens, J.; Vader, P.; Damen, J. M. A.; O'Flaherty, M. C.; Slijper, M.; de Kruijff, B.; de Kroon, A. I. P. M., Probing the membrane interface-interacting proteome using photoactivatable lipid cross-linkers. *Journal of proteome research* **2007,** *6* (5), 1951-1962.

58. Zara, J. J.; Wood, R. D.; Boon, P.; Kim, C.-H.; Pomato, N.; Bredehorst, R.; Vogel, C.-W., A carbohydrate-directed heterobifunctional cross-linking reagent for the synthesis of immunoconjugates. *Anal. Biochem.* **1991,** *194* (1), 156-162.

59. Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. Elsevier: London, 2008; Vol. 2. Edition.

60. Simons, B. L.; King, M. C.; Cyr, T.; Hefford, M. A.; Kaplan, H., Covalent cross-linking of proteins without chemical reagents. *Protein Sci.* **2002,** *11* (6), 1558-64.

61. Pe'er, I.; Felder, C. E.; Man, O.; Silman, I.; Sussmann, J. L.; Beckmann, J. S., Proteomics signatures: amino acid and oligopeptide composition diffentiate among phyla. *Proteins* **2004,** *54* (1), 20-40.

62. Bragg, P. D.; Hou, C., Subunit composition, function, and spatial arangement in the Ca^{2+}- and Mg^{2+}-activated adenosin triphosphataes of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Arch. Biochem. Biophys.* **1975,** *167* (1), 311-321.

63. Hartman, F. C.; Wold, F., Bifunctional Reagents. Cross-Linking of Pancreatic Ribonucleases with a Diimido Ester. *J. Am. Chem. Soc.* **1966,** *88* (16), 3890-91.

64. Kalkhof, S.; Sinz, A., Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008,** *392* (1), 305-12.

65. Ahrends, R.; Kosinski, J.; Kirsch, D.; Manelyte, L.; Giron-Monzon, L.; Hummerich, L.; Schukz, O.; Spengler, B.; Friedhoff, P., Identifying an interaction site between MutH and the C-terminal domain of MutL by crosslinking, affinity purification, chemical coding and mass spectrometry. *Nuc. Acid. Res.* **2006,** *34* (10), 3169-80.

66. Vasilescu, J.; Guo, X.; Kast, J., Identification of protein-protein interactions using in-vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* **2004,** *4* (12), 3845-54.

67. Preston, G. W.; Wilson, A. J., Photo-induced covalent cross-linknig for the analysis of biomolecular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2013,** *42* (8), 3289-3301.

68. Gomes, A. F.; Gozzo, F. C., Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2010,** *45* (8), 892-99.

69. Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C., Photo-leucine and photot-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **2005,** *2*, 261-268.

70. Lössl, P.; Sinz, A., Combining Amine-Reactive Cross-Linkers and Photo-Reactive Amino Acids for 3D-Structure Analysis of Proteins and Protein Complexes. *Meth. Mol. Biol.* **2016,** *1394*, 109-127.

71. Mayne, S. L. N.; Patterton, H.-G., Bioinformatic tools for the structural elucidation of multi-subuni protein complees by mass spectrometric analysis of protein-protein cross-links. *Brief. Bioinformatics* **2011,** *12* (6), 1-12.

72. Tang , Y.; Chen, Y.; Lichti, C. F.; Hall, R. A.; Raney, K. D.; Jenning, S. F., CLPM: a cross-linked peptide mapping algorithm for mass spectrometric analysis. *BMC Bioinformatics* **2005,** *6* (Suppl 2), S9.

73. Peri, S.; Steen, H.; Pandey, A., GPMAW – a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trend Biochem. Sci.* **2001,** *26*, 687.

74. Seebacher, J.; Mallick, P.; Zhang, N.; Eddes, J. S.; Aebersold, R.; Gelb, M. H., Protein cross-linking analysis using mass spectrometry isotope-coded cross-linkers and integrated computational data processing. *J. Proteom. Res.* **2006,** *5*, 2270-82.

75. Tang, X.; Munske, G. R.; Siems, W. F.; Bruce , J. E., Mass spectrometry identifiable cross-linking strategy for studying protein-protein interactions. *Anal. Chem.* **2005,** *77*, 311-18.

76. Yang, B.; Wu, Y. J.; Zhu, M.; Fan, S. B.; Lin, J.; Zhang, K.; Li, S.; Chi, H.; Li, Y. X.; Chen, H. F.; Luo, S. K.; Ding, Y. H.; Wang, L. H.; Hao, Z.; Xiu, L. Y.; Chen, S.; Ye, K.; He, S. M.; Dong, M. Q., Identification of cross-linked peptides from complex samples. *Nature methods* **2012,** *9* (9), 904-6.

77. Götze, M.; Pettelkau, J.; Schaks, S.; Bosse, K.; Ihling, C. H.; Krauth, F.; Fritzsche, R.; Kühn, U.; Sinz, A., StavroX – A software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J. AM. Mass Spectrom.* **2011,** *23*, 76-87.

78. Rinner, O.; Seebacher, J.; Walzthoeni, T.; Mueller, L. N.; Beck, M.; Schmidt, A.; Mueller, M.; Aebersold, R., Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. *Nat. Methods* **2008,** *5* (4), 315-318.

79. Leitner, A.; Reischl, R.; Walzthoeni, T.; Herzog, F.; Bohn, S.; Förster, F.; Aebersold, R., Expanding the Chemical Cross-Linking Toolbox by the Use of Multiple Proteases and Enrichment by Size Exclusion Chromatography. *Mol. Cell. Prot.* **2012,** *11* (3), 1-12.

80. Herzog, F.; Kahraman, A.; Boehringer, D.; Mak, R.; Bracher, A.; Walzthoeni, T.; Leitner, A.; Beck, M.; Hartl, F.-U.; Ban, N.; Malmström, L.; Aebersold, R., Strucutral Probing of a Protein Phosphatase 2A Network by Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Science* **2012,** *337*, 1348-1352.

81. Rampler, E.; Stranzl, T.; Orban-Nemeth, Z.; Hollenstein, D. M.; Hudecz, O.; Schloegelhofer, P.; Mechtler, K., Comprehensive Cross-Linking Mass Spectrometry Reveals Parallel Orientation and Flexible Conformations of Plant HOP2-MND1. *Journal of proteome research* **2015**.

82. Fritzsche, R.; Ihling, C. H.; Götze, M.; Sinz, A., Optimizing the enrichment of cross-linked products for mass spectrometric protein analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012,** *26*, 653-658.

83. Buncherd, H.; Roseboom, W.; Ghavim, B.; Du, W.; de Koning, L. J.; de Koster, C. G.; de Jong, L., Isolation of cross-linked peptides by diagonal strong cation exchange chromatography for protein complex topology studies by peptide fragment fingerprinting from large sequence databases. *J. Chromatogr. A* **2014,** *1348*, 34-46.

84. Petrotchenko, E. V.; Serpa, J. J.; Borchers, C. H., An isotopically coded CID-cleavable biotinylated cross-linker for structural proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2011,** *10* (2), M110.0014201-8.

85. Trester-Zedlitz, M.; Kamada, K.; Burley, S. K.; Fenyö, D.; Chait, B. T.; Muir, T. W., A modular cross-linking approach for exploring protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2004,** *125*, 2416-2425.

86. Kang, S.; Mou, L.; Lanman, J.; Velu, S.; Brouilette, W. J.; Prevelige, P. E. J., Synthesis of biotin-tagged chemical cross-linkers and their applications for mass spectrometry. *Rapid. Comm. Mass Spectrom.* **2009,** *23*, 1719-1726.

87. Nessen, M. A.; Kramer, G.; Back, J.; Baskin, J. M.; Smeenk, L. E. J.; de Koning, L. J.; van Maarseveen, J. H.; de Jong, L.; Bertozzi, C. R.; Hiemstra, H.; de Koster, C. G., Selective Enrichment of Azide-Containing Peptides from Complex Mixtures. *J. Proteom. Res.* **2009,** *8* (7), 3702-3711.

88. iChemLabs, LLC. *ChemDoodle*, 8; 2016.

89. Schrödinger, LLC, *The PyMol Molecular Graphics System*, 1.5.0.4; 2013.

90. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970,** *227* (5259), 680-85.

91. Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System, https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis/protein-gels/nupage-protein-gels.html (accessed 24.02.2016).

92. Kang, D.; Gho, S. G.; Suh, M.; Kang, C., Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002,** *11*, 1511-1512.

93. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985,** *150* (1), 76-85.

94. Waldmann, H., Der Phenylacetyl-(PhAc-)Rest als enzymatisch ablösbare Schutzgruppe für Peptide und Kohlenhydrate: Selektive Schutzgruppenabspaltung mit Penicillin-Acyclase. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1175-1180.

95. Chambers, M. C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D. L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; Hoff, K.; Kessner, D.;

Tasman, N.; Shulman, N.; Frwen, B.; Baker, T. A.; Brusniak, M. Y.; Paulse, C.; Creasy, D.; Flashner, L.; Kani, K.; Moulding, C.; Seymour, S. L.; Nuwaysir, L. M.; Lefebvre, B.; Kuhlmann, F.; Roark, J.; Rainer, P.; Detlev, S.; Hemenway, T.; Huhmer, A.; Langridge, J.; Connolly, B.; Chadick, T.; Holly, K.; Eckels, J.; Deutsch, E. W.; Moritz, R. L.; Katz, J. E.; Agus, D. B.; MacCoss, M.; Tabb, D. L.; Mallick, P., A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotech.* **2012,** *30* (10), 918-20.

96. Leitner, A.; Walzthoeni, T.; Aebersold, R., Lysine-specific chemical cross-linking of protein complexes and identification of cross-linking sites using LC-MS/MS and the xQuest/xProphet software pipeline. *Nature Prot.* **2014,** *9* (1), 120-137.

97. Taverner, T.; Hall, N. E.; O'Hair, R. A.; Simpson, R. J., Characterization of an antagonist interleukin-6 dimer by stable isotope labeling, cross-linking, and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **2002,** *277* (48), 4687-92.

98. Greene, T. W.; Wutrs, P. G. M., *Protective Group in Organic Synthesis*. Wiley: New York, 1999.

99. MS-Digest, http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest (accessed 20.06.2016).

100. Mourao, A.; Christensen, S. T.; Lorentzen, E., The intraflagellar transport machinery in ciliary signaling. *Curr. Opin. Biol.* **2016,** *41*, 98-108.

101. Beales, P. L.; Warner, A. M.; Hitman, G. A.; Thakker, R.; Flinter, F. A., Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. *J. Med. Genet.* **1997,** *34* (2), 92-98.

102. Zaghloul, N. A.; Katsanis, N., Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J. Clin. Invest.* **2009,** *119* (3), 428-37.

103. Selbitz, H.-J.; Truyen, U.; Valentin-Weigan, P., *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke Verlag: Stuttgart, 2010; Vol. 9., vollständig überarbeitete Auflage.

104. UniProt Q2KJ93 Cell division control protein 42 homolog. http://www.uniprot.org/uniprot/Q2KJ93 (accessed 13.07.2016).

105. UniProt Q026277 Adenosine monophosphate-protein transferase and cysteine protease IbpA. http://www.uniprot.org/uniprot/Q06277 (accessed 13.07.2016).

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen für Chemikalien sind in Kapitel 8.1 („Chemikalien“) im Anhang aufgeführt.

BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
BSA	Bovines Serum Albumin
Cdc42	Cell Division Control Protein 42 Homolog
CAD	Collision-Activated Dissociation
ChaFRADIC	Charge Based Fractional Diagonal Chromatography
CID	Collision Induced Dissociation
CoFRADIC	Combined Fractional Diagonal Chromatography
CRM	Charged Residue Model
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrospray Ionisation
ETD	Electron Transfer Dissociation
FEL	Freie-Elektronen-Laser
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
HCD	Higher Energy Collision Dissociation
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
IbpA	Adenosinmonophosphat Protein Transferase und Cystein Protease
ICR	Ion Cylcotron Resonance
iTRAQ	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification
IEM	Ion Evaporation Model
FT	Fourier-Transformation
LC	Liquid Chromatography
LIT	Linear Ion Trap
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MS	Massenspektrometrie
m/z-Verhältnis	Masse-Ladungs-Verhältnis
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PDB	Protein Data Bank
SAXS	Small Angle X-ray scattering
SCX	Strong Cation Exchange
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
TAP	Tandem Affinity Purification
TIC	Total Ion Current
TOF	Time Of Flight
XIC	Extracted Ion Chromatogram

8 Anhang

8.1 Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Abkürzung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	99,5 %	HEPES	AppliChem (Darmstadt, D)
84 % Acetonitril, 0.1 % TFA	UPLC-grade	Solvent B	Biosolve BV, (Volkenwaard, NL)
Acetonitril	LC-grade	ACN	Biosolve BV, (Volkenwaard, NL)
Ameisensäure	99% ULC/MS	FA	Biosolve BV, (Volkenwaard, NL)
Ammoniumhydrogencarbonat	≥ 99,5 %	ABC	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat	≥ 98 %	$Al_2(SO_4)_3$	Fluka (St. Gallen, CH)
Bis(sulfosuccinimidyl)-2,2,7,7-suberat-$d_{0/4}$	k. A.	BS^3-$d_{0/4}$	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
Boc-Alain-N-Hydroxysuccinimidester	≥ 98 %	Boc-Ala-Osu	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Boc-Glycin-N-Hydroxysuccinimidester	≥ 98 %	Boc-Gly-Osu	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Bovines Hämoglobin	≥ 91 %	Hb	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Bovines Serum Albumin	≥ 96 %	BSA	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
complete Mini EDTA free	-	-	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Coomassie Brilliant Blue G-250	für Elektrophorese	-	Merck (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid	≥ 99,9 %	DMSO	Merck (Darmstadt, D)
Dithiothreitol	≥ 97 %	DTT	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Essigsäure	100 %	HOAc	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol	99,6 %	EtOH	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol	≥ 99,9 %, p. A.	EtOH	Merck (Darmstadt, D)
Ethylendiamintetraessigsäure	pure	EDTA	Merck (Darmstadt, D)
Dinatriumhydrogenphosphat	99,95 %	Na_2HPO_4	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Guanidin-Hydrochlorid	≥ 99 %	GuHCl	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Iodoacetamid	≥ 99 %	IAA	Sigma Aldrich (Steinheim, D)

Chemikalie	Reinheit	Abkürzung	Hersteller
Kaliumchlorid	Suprapur	Kcl	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumdihydrogensulfat	Suprapur	KH_2PO_4	Merck (Darmstadt, D)
Kalziumchlorid	≥ 98 %	$CaCl_2$	Merck (Darmstadt, D)
Lysozym	≥ 90 %	-	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Magnesiumchlorid	≥ 98 %	$MgCl_2$	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Natriumchlorid	Suprapur	NaCl	Merck (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	NaH_2PO_4	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Natriumdodecylsulfat	≥ 99 %	SDS	AppliChem (Darmstadt, D)
Ovalbumin	≥ 97 %	-	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Phenylacetyl-N-hydroxysuccinimid	k. A.	PhAc-Osu	hausinterne Synthese[1]
Phosphorsäure	85 %	H_3PO_4	Merck (Darmstadt, D)
Sulfosuccinimidyl-6(4,4'-azipentanamido)hexanoat	k. A.	SDA	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
Triflouressigsäure	≥ 99,5 %, ULC/MS	TFA	Biosolve (Volkenwaard, NL)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid	≥ 99,9 %	Tris	Applichem (Darmstadt, D)

k. A. = keine Angabe

8.2 Enzyme

Enzym	Reinheit	Hersteller
Benzonase	> 90 %	Merck (Darmstadt, D)
Chymotrypsin	> 90 %, sequencing grade	Roche (Risch, CH)
rLysC	≥ 95 %, Mass Spectrometry Grade	Promega (Mannheim, D)
Penicillin-Acyclase	Lösung, 5-10 U/mg	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Subtilisin	k. A.	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin Gold	Mass Spectrometry Grade	Promega (Mannheim, D)
Trypsin T1426	> 90 %	Sigma Aldrich (Steinheim, D)

k. A. = keine Angabe

[1] Zur Verfügung gestellt von der Gruppe „Synthetische Biomoleküle“ am ISAS

8.3 Weitere Verbrauchsmaterialien

0.5/1.5/2.0/5.0 mL LoBind Eppendorfgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
0.5/1.5/2.0 mL Safelock Eppendorfgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
20x MOPS Laufpuffer	Invitrogen[2] (Karlsruhe, D)
3M Empore C18 Filter	3M Bioanalytical Tech. (St. Paul, USA)
4x LDS Probenpuffer für SDS-PAGE	Invitrogen[2] (Karlsruhe, D)
96-Well Microplatten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Acclaim PepMap-HPLC-Säulen - Vorsäule 2 cm x 100 µm, 2 µm, 100 Å - Hauptsäule 25 oder 50 cm x 75 µm, 2 µm, 100 Å	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
BioBasic-4 C4 Bulk Material	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
Mark12 Unstained Protein Standard	Invitrogen[2] (Karlsruhe, D)
NuPAGE Bis-Tris Gel, 3-12%, 12 Probentaschen	Invitrogen[2] (Karlsruhe, D)
Oligo R3 Bulk Media	Applied Biosystems[2] (Darmstadt, D)
PD SpinTrap G-25 Säulen	GE Healthcare (Freiburg, D)
PepSwift Monolithische HPLC-Säulen - Vorsäule: 5 mm x 200 µm - Hauptsäule: 5 cm x 200 µm	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
Pipettenspitzen 0.1-2.5 µL, 0.5-10 µL, 1-20 µL, 10-100 µL 20-200 µL, 50-1000 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
Polysulfoethyl-A SCX HPLC-Säulen - 150 x 0,3 mm, 5 µm, 200 Å - 150 x 1,0 mm, 5 µm, 200 Å	PolyLC INC (Columbia, USA)
SPEC C18 AR Tips	Agilent Technologies (Böblingen, D)
Whatman Papier	GE Healthcare (Freiburg, D)
Zeba Spin Columns MWCO 7 kDa	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)

[2] Eine Marke von Thermo Fisher Scientific

8.4 Geräte

Pipetten 0.1-2.5 µL, 0.5-10 µL, 1-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 50-1000 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
5425 Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg, D)
Präzisionswaage Cubis®	Sartorius (Göttingen, D)
Inkubationsofen	Memmert (Schwabach, D)
Kühlzentrifuge 5417R	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
LTQ-Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
LTQ-Orbitrap Velos Pro	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
LTQ-Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium Granat-Laser Minilite II	Continuum (San Jose, USA)
Orbitrap Fusion Lumos	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
pH Elektrode blue line pH 16	Schott Instruments (Mainz, D)
Plate Reader Mulitskan FC mit zugehörigem Computerprogramm	Thermo Fisher (Dreicheich, D)
Electrophoresis Power Supply EPS3501 XL	Pharmacia Biotech (Uppsala, S)
Thermomixer comfort (0.5 mL, 1.5 mL, 2.0 mL)	Eppendorf (Hamburg, D)
UltiMate 3000 RSLCnano HPLC System mit Chromeleon	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
UV Lampe, 245 und 365 nm, 8 Watt	Herolab (Wiesloch, D)
Vakuumstation zum Entsalzen	Agilent Technologies (Böblingen, D)
Vakuumzentrifuge Savant SPD 121P mit Kühlfalle RVT4104 und Pumpe	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D) Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D) Vaccubrand (Wertheim, D)
Xcell SureLock MiniCell Electrophoresis System	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)

8.5 Computerprogramme

Alle LC-MS/MS-Systeme wurden mit Chromeleon (Version 6.8) und Xcalibur (Version 2.2) von Thermo Fisher gesteuert. MS- und MS/MS-Spektren wurden mit Xcalibur von Thermo Fisher Scientific gesichtet. Zur Datenbanksuche wurden Mascot 2.4 (Matrix Science) im Proteom Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific), pLink[76], xQuest[78] und StavroX[77] genutzt. Alle gezeigten chemischen Strukturen wurden mit dem Programm ChemDoodle[88] angefertigt. 3D-Strukturen von Proteinen wurden mit PyMol erstellt[89], welches für akademische Zwecke kostenfrei verwendet werden kann.

8.6 Zu Kapitel 4.2.1 Datenauswertung mi pLink, StavroX und xQuest

Tabelle 8-1: Peptidsequenzen der identifizierten Cross-Links beim Vergleich der drei Suchprogramme pLink, xQuest und StavroX in BSA-BS^3-$d_{0/4}$ (Tabelle 4-2). Die Zahlen in Klammern bezeichnen die verlinkten Aminosäuren.

AA1	AA2	distance (Å)	
1	12	19,5	DTHK(1)-FKDLGEEHFK(2)
1	93	30,5	DTHK(1)-VASLRETYGDMADCCEKQEPER(17)
12	556	65,2	FKDLGEEHFK(2)-TVMENFVAFVDKCCAADDK(12)
106	535	35,6	NECFLSHKDDSPDLPK(8)-HKPK(2)
116	431	21,3	LKPDPNTLCDEFK(2)-SLGKVGTR(4)
131	221	36,0	PDPNTLCDEFKADEKK(15)-LSQKFPK(4)
136	180	18,4	FWGKYLYEIAR(4)-GACLLPKIETMR(7)
136	221	35,1	FWGKYLYEIARR(4)-AWSVARLSQKFPK(10)
173	465	41,7	YNGVFQECCQAEDKGACLLPK(14)-LCVLHEKTPVSEK(7)
180	187	11,0	GACLLPKIETMR(7)-EKVLTSSAR(2)
180	275	27,2	GACLLPKIETMR(7)-LKECCDK(2)
187	221	20,3	EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)
187	431	13,7	EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)
187	439	18,2	EKVLTSSAR(2)-CCTKPESER(4)
187	280	20,0	EKVLTSSAR(2)-ECCDKPLLEK(5)
187	465	25,7	IETMREKVLTSSAR(7)-LCVLHEKTPVSEK(7)
204	316	30,0	CASIQKFGER(6)-DVCKNYQEAK(4)
204	350	16,4	CASIQKFGER(6)-LAKEYEATLEECCAK(3)
211	439	29,6	ALKAWSVAR(3)-CCTKPESER(4)
221	439	20,5	LSQKFPK(4)-CCTKPESER(4)
221	232	14,9	LSQKFPK(4)-AEFVEVTKLVTDLTK(8)
350	474	18,0	LAKEYEATLEECCAK(3)-VTKCCTESLVNR(3)
396	439	16,3	QNCDQFEKLGEYGFQNALIVR(8)-CCTKPESERMPCTEDYLSLILNR(4)
396	474	32,7	HLVDEPQNLIKQNCDQFEKLGEYGFQNALIVR(19)-VTKCCTESLVNRR(3)
431	439	13,5	SLGKVGTR(4)-CCTKPESER(4)
431	537	26,1	SLGKVGTRCCTK(4)-PKATEEQLKTVMENFVAFVDK(2)
524	544	14,3	KQTALVELLK(1)-ATEEQLKTVMENFVAFVDK(7)

8.7 Zu Kapitel 4.3.2 Untersuchung der Aktivierungszeit eines Diazirin-Cross-Linkers

Tabelle 8-2: Ergebnisse der Intensitäten (AUC) des Peptids QYFAETER (gelöst in Wasser) mit SDA-Modifikation mit nicht-aktiviertem und aktiviertem (Monolink, Intralink) Diazirin nach verschiedenen Bestrahlungszeiten, sowie die Intensitäten des unmodifizierten Peptids und der daraus berechneten Normalisierungsfaktoren. StAbw. = Standardabweichung, StAbw % = prozentuale Standardabweichung, AUC = Area Under Curve (Peakfläche). Der Normalisierungswert ist grau gekennzeichnet.

In Wasser gelöst								
Bestrahlungszeit	**0s**	**4s**	**10s**	**30s**	**2min**	**10min**	**30min**	**60min**
	Peptid mit nicht aktiviertem SDA							
Rep1 (AUC)	1,29E+09	1,33E+09	9,90E+08	1,11E+09	4,38E+08	4,76E+08	1,15E+08	1,09E+07
Rep2 (AUC)	1,39E+09	1,38E+09	1,19E+09	1,19E+09	4,65E+08	5,42E+08	1,02E+08	9,93E+06
Rep3 (AUC)	1,35E+09	1,43E+09	1,58E+09	9,16E+08	4,50E+08	5,60E+08	1,27E+08	1,02E+07
Durschnitt	1,34E+09	1,38E+09	1,25E+09	1,07E+09	4,51E+08	5,26E+08	1,15E+08	1,04E+07
StAbw.	4,84E+07	4,68E+07	2,98E+08	1,43E+08	1,34E+07	4,43E+07	1,24E+07	5,08E+05
StAbw %	3,6%	3,4%	23,8%	13,3%	3,0%	8,4%	10,9%	4,9%
	Peptid mit aktiviertem SDA: Monolink							
Rep1 (AUC)	2,03E+06	7,34E+06	1,15E+07	3,48E+07	4,90E+07	2,96E+08	5,11E+08	5,25E+08
Rep2 (AUC)	2,38E+06	7,01E+06	1,39E+07	3,28E+07	6,44E+07	3,92E+08	5,01E+08	5,69E+08
Rep3 (AUC)	2,34E+06	8,20E+06	1,85E+07	3,08E+07	5,88E+07	3,74E+08	5,82E+08	5,50E+08
Durschnitt	2,25E+06	7,51E+06	1,46E+07	3,28E+07	5,74E+07	3,54E+08	5,31E+08	5,48E+08
StAbw.	1,89E+05	6,14E+05	3,55E+06	1,97E+06	7,82E+06	5,12E+07	4,39E+07	2,18E+07
StAbw %	8,4%	8,2%	24,3%	6,0%	13,6%	14,4%	8,3%	4,0%
	Peptid mit aktiviertem SDA: Intralink							
Rep1 (AUC)	1,85E+07	2,51E+07	2,88E+07	6,14E+07	8,71E+07	4,21E+08	9,37E+08	9,38E+08
Rep2 (AUC)	2,08E+07	2,70E+07	3,55E+07	7,09E+07	1,01E+08	6,40E+08	7,95E+08	9,23E+08
Rep3 (AUC)	1,79E+07	2,76E+07	4,82E+07	5,24E+07	9,79E+07	6,54E+08	1,06E+09	9,29E+08
Durschnitt	1,91E+07	2,66E+07	3,75E+07	6,16E+07	9,54E+07	5,72E+08	9,30E+08	9,30E+08
StAbw.	1,49E+06	1,31E+06	9,85E+06	9,28E+06	7,44E+06	1,31E+08	1,31E+08	7,48E+06
StAbw %	7,8%	4,9%	26,3%	15,1%	7,8%	22,9%	14,1%	0,8%
	Peptid ohne Modifikation							
Rep1 (AUC)	2,98E+09	1,44E+09	1,26E+09	3,06E+09	7,75E+09	3,59E+09	4,28E+09	4,77E+09
Rep2 (AUC)	3,25E+09	1,44E+09	1,55E+09	3,09E+09	5,22E+09	3,95E+09	4,54E+09	4,90E+09
Rep3 (AUC)	3,19E+09	1,58E+09	2,13E+09	2,96E+09	6,08E+09	4,53E+09	4,46E+09	4,75E+09
Durschnitt	3,14E+09	1,49E+09	1,64E+09	3,04E+09	6,35E+09	4,02E+09	4,43E+09	4,81E+09
StAbw.	1,42E+08	8,08E+07	4,42E+08	6,70E+07	1,29E+09	4,75E+08	1,34E+08	7,98E+07
StAbw %	4,5%	5,4%	26,9%	2,2%	20,3%	11,8%	3,0%	1,7%
	Normalisierungsfaktoren							
Bestrahlungszeit	0s	4s	10s	30s	2min	10min	30min	60min
Faktor	0,473	1,000	0,903	0,489	0,234	0,369	0,336	0,309

Tabelle 8-3: Ergebnisse der Intensitäten (AUC) des Peptids QYFAETER (gelöst in HEPES 20 mM, pH7.4) mit SDA-Modifikation mit nicht-aktiviertem und aktiviertem (Monolink, Intralink) Diazirin nach verschiedenen Bestrahlungszeiten, sowie die Intensitäten des unmodifizierten Peptids und der daraus berechneten Normalisierungsfaktoren. StAbw. = Standardabweichung, StAbw % = relative Standardabweichung, AUC = Area Under Curve (Peakfläche). Der Normalisierungswert ist grau gekennzeichnet.

In HEPES (20 mM, pH 7.4) gelöst								
Bestrahlungszeit	**0s**	**4s**	**10s**	**30s**	**2min**	**10min**	**30min**	**60min**
	Peptid mit nicht aktiviertem SDA							
Rep1 (AUC)	3,87E+09	4,67E+09	4,69E+09	4,53E+09	2,02E+09	2,58E+09	5,71E+08	5,22E+07
Rep2 (AUC)	3,60E+09	4,41E+09	3,89E+09	4,09E+09	1,84E+09	2,52E+09	4,26E+08	5,80E+07
Rep3 (AUC)	3,72E+09	4,93E+09	4,16E+09	4,17E+09	2,02E+09	2,35E+09	4,68E+08	6,38E+07
Durschnitt	3,73E+09	4,67E+09	4,25E+09	4,26E+09	1,96E+09	2,48E+09	4,88E+08	5,80E+07
StAbw.	1,36E+08	2,58E+08	4,07E+08	2,36E+08	1,04E+08	1,22E+08	7,44E+07	5,81E+06
StAbw %	3,6%	5,5%	9,6%	5,5%	5,3%	4,9%	15,2%	10,0%
	Peptid mit aktiviertem SDA: Monolink							
Rep1 (AUC)	8,46E+06	3,83E+07	6,79E+07	1,50E+08	2,09E+08	1,90E+09	2,53E+09	2,54E+09
Rep2 (AUC)	6,52E+06	3,36E+07	4,79E+07	1,25E+08	2,00E+08	1,97E+09	2,16E+09	2,66E+09
Rep3 (AUC)	7,21E+06	4,11E+07	5,67E+07	1,31E+08	2,29E+08	1,85E+09	2,43E+09	2,79E+09
Durschnitt	7,40E+06	3,77E+07	5,75E+07	1,36E+08	2,13E+08	1,91E+09	2,37E+09	2,66E+09
StAbw.	9,86E+05	3,79E+06	9,99E+06	1,31E+07	1,51E+07	5,74E+07	1,89E+08	1,27E+08
StAbw %	13,3%	10,1%	17,4%	9,7%	7,1%	3,0%	8,0%	4,8%
	Peptid mit aktiviertem SDA: Intralink							
Rep1 (AUC)	6,43E+07	1,14E+08	1,61E+08	2,82E+08	3,51E+08	3,09E+09	3,27E+09	3,90E+09
Rep2 (AUC)	5,52E+07	1,07E+08	1,19E+08	2,39E+08	3,50E+08	3,04E+09	3,24E+09	4,23E+09
Rep3 (AUC)	5,76E+07	1,23E+08	1,36E+08	2,55E+08	4,04E+08	2,86E+09	3,59E+09	4,53E+09
Durschnitt	5,90E+07	1,15E+08	1,39E+08	2,59E+08	3,68E+08	3,00E+09	3,37E+09	4,22E+09
StAbw.	4,68E+06	8,40E+06	2,13E+07	2,16E+07	3,07E+07	1,20E+08	1,98E+08	3,16E+08
StAbw %	7,9%	7,3%	15,3%	8,4%	8,3%	4,0%	5,9%	7,5%
	Peptid ohne Modifikation							
Rep1 (AUC)	5,55E+09	3,39E+09	3,85E+09	4,04E+09	3,80E+09	3,16E+09	4,20E+09	3,95E+09
Rep2 (AUC)	4,53E+09	3,14E+09	2,74E+09	3,41E+09	3,92E+09	2,96E+09	3,39E+09	3,31E+09
Rep3 (AUC)	3,14E+09	3,68E+09	3,99E+09	3,61E+09	4,37E+09	2,85E+09	2,94E+09	3,36E+09
Durschnitt	4,40E+09	3,40E+09	3,53E+09	3,69E+09	4,03E+09	2,99E+09	3,51E+09	3,54E+09
StAbw.	1,21E+09	2,73E+08	6,84E+08	3,20E+08	3,01E+08	1,54E+08	6,40E+08	3,57E+08
StAbw %	27,5%	8,0%	19,4%	8,7%	7,5%	5,2%	18,2%	10,1%
	Normalisierungsfaktoren							
Bestrahlungszeit	0s	4s	10s	30s	2min	10min	30min	60min
Faktor	0,679	0,879	0,848	0,812	0,742	1,000	0,852	0,846

8.8 Zu Kapitel 4.4.2 Alternative Label-Methoden für ChaFRADIC

Tabelle 8-4: Detaillierte Ergebnisse der identifizierten Cross-Links in BSA-BS^3-d$_{0/4}$ mit und ohne Gly-Modifikation. Proben wurden jeweils ohne vorheriges Entsalzen gemessen. AA1/2 = Aminosäure ½, ppm = Massenabweichung in ppm.

			BSA XL+Gly 1			BSA XL+Gly 2			BSA XL+Gly 3			BSA XL 1			BSA XL 2			BSA XL 3		
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	Score	ppm	Isotopen-muster	Score	ppm	Isotopen-muster	Score	ppm	Isotopen-muster	Score	ppm	Isotopen-muster	Score	ppm	Isotopen-muster	Score	ppm	Isotopen-muster
1	12	19,5	8.71E-05	-0.39	ja	2.94E-07	1.11	ja	2.82E-06	-1.03	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	431	19,9	6.08E-04	0.93	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	431	21,3	9.40E-05	1.30	ja	1.24E-04	1.28	ja	3.79E-04	0.39	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	187	11,0	5.73E-03	2.00	ja	-	-	-	4.86E-04	0.93	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-
187	221	20,3	9.77E-08	0.51	ja	1.28E-06	-0.61	ja	2.78E-07	-0.26	ja	8.40E-04	-2.09	ja	1.25E-02	-2.61	ja	-	-	-
187	431	13,7	2.03E-04	-0.14	ja	1.17E-04	-1.09	ja	1.28E-04	0.33	ja	8.15E-05	-0.75	ja	1.73E-04	0.70	ja	1.56E-02	1.02	ja
187	439	18,2	2.56E-07	0.34	ja	5.03E-06	1.70	ja	4.43E-07	0.12	ja	1.04E-06	-0.88	ja	3.53E-05	1.26	ja	1.05E-08	-1.28	ja
187	280	20,0	3.53E-05	6.67	ja	6.78E-05	3.47	ja	-	-	-	1.35E-04	1.15	ja	2.78E-03	-1.65	ja	-	-	-
204	221	26,4	-	-	-	-	-	-	1.40E-04	-1.94	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-
221	439	20,5	5.10E-07	-2.67	ja	1.09E-05	1.18	ja	2.93E-06	0.87	ja	3.25E-03	-0.86	ja	1.39E-02	0.73	ja	2.21E-03	3.20	ja
350	474	18,0	1.22E-06	-1.59	ja	-	-	-	8.13E-05	-1.57	ja	1.52E-05	2.40	ja	8.66E-05	-1.48	ja	-	-	-
431	439	13,5	9.17E-06	-0.59	ja	1.10E-05	-0.66	ja	3.51E-06	0.41	ja	-	-	-	1.09E-04	-0.75	ja	1.21E-04	-0.33	ja

Tabelle 8-5: Detaillierte Ergebnisse der identifizierten Cross-Links in BSA-BS^3-d$_{0/4}$ mit Gly-Modifikation nach C4- und C18-Entsalzen. AA1/2 = Aminosäure ½, ppm = Massenabweichung in ppm.

			C4									C18								
			Rep1			Rep2			Rep3			Rep1			Rep2			Rep3		
AA1	**AA2**	**Abstand (Å)**	**Score**	**ppm**	**MS1**	**Score**	**ppm**	**MS1**	**Score**	**ppm**	**MS1**	**Score**	**ppm**	**MS1**	**Score**	**ppm**	**MS1**	**Score**	**ppm**	**MS1**
1	12	19,5	3.48E-06	0.31	ja	2.11E-05	-0.76	ja	1.15E-03	-1.19	ja	5.27E-04	-3.71	ja	2.90E-06	-0.28	ja	6.72E-05	-2.25	ja
116	431	21,3	4.12E-04	-2.03	ja	1.70E-05	2.29	ja	-	-	-	-	-	-	1.40E-03	0.94	ja	7.89E-05	-1.03	ja
180	187	11,0	2.65E-04	-1.71	ja	1.06E-03	0.17	ja	2.11E-04	-1.31	ja	5.57E-04	-3.34	ja	9.02E-04	0.17	ja	1.57E-05	-1.31	ja
187	221	20,3	1.64E-06	0.08	ja	5.81E-07	0.47	ja	8.75E-08	-1.76	ja	2.32E-09	-1.38	ja	3.54E-06	0.76	ja	3.34E-08	-1.71	ja
187	431	13,7	6.85E-06	1.31	ja	5.36E-07	0.55	ja	2.67E-04	-2.27	ja	3.92E-05	2.50	ja	1.80E-05	0.16	ja	1.45E-06	-3.58	ja
187	439	18,2	2.11E-05	2.08	ja	4.26E-08	-2.63	ja	3.69E-08	-2.78	ja	1.56E-05	0.33	ja	1.87E-06	0.33	ja	1.13E-07	-3.01	ja
187	280	20,0	1.06E-04	1.72	nein	-	-	-	-	-	-	1.65E-04	-3.88	nein	9.84E-05	-0.12	nein	-	-	-
204	431	27,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.29E-05	-1.68	nein	1.02E-05	-2.24	ja	-	-	-
221	439	20,5	1.64E-07	-2.59	ja	6.96E-10	0.16	ja	1.91E-08	-0.95	ja	2.19E-08	-3.87	ja	1.39E-09	2.13	ja	9.76E-10	-3.16	ja
350	474	18,0	6.58E-06	-1.77	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.68E-05	-3.06	ja
431	439	13,5	5.07E-07	1.22	ja	2.66E-06	1.57	ja	1.17E-08	-0.09	ja	5.28E-08	0.97	ja	2.32E-06	1.63	ja	1.15E-06	0.89	ja

8.9 Zu Kapitel 4.4.3 ChaFRADIC mit GlyBoc-Labeling

Tabelle 8-6: Detaillierte Ergebnisse der Anreicherung mit Gly-ChaFRADIC von BSA-BS^3-d$_{0/4}$, jeweils drei Replikate mit 10 µg Startmaterial. AA1/2 = Aminosäure ½, ppm = Massenabweichung in ppm. Das Vorhandensein des Isotopenmusters im MS1-Spektrum ist nicht aufgeführt, da es für jeden Treffer vorhanden war.

			Replikat 1						Replikat 2						Replikat 3					
			Fraktion 1		Fraktion 2		Fraktion 3		Fraktion 1		Fraktion 2		Fraktion 3		Fraktion 1		Fraktion 2		Fraktion 3	
AA1	AA2	Abstand (Å)	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm
1	239	22,7	-	-	5.58E-07	0.41	-	-	1.05E-03	0.12	-	-	-	-	-	-	6.68E-06	-1.96	-	-
1	12	19,5	-	-	6.53E-06	0.82	5.41E-05	-0.32	-	-	4.19E-06	1.73	1.78E-06	-1.99	-	-	1.50E-06	-0.48	2.01E-07	-2.36
116	431	21,3	2.95E-06	0.12	1.94E-05	1.11	5.07E-05	0.94	6.97E-05	1.28	1.04E-05	-1.56	4.12E-05	1.41	-	-	3.64E-05	0.66	2.81E-05	-0.51
116	523	18,0	-	-	1.80E-08	1.20	5.41E-05	-0.32	8.68E-06	-1.79	1.03E-05	-0.15	-	-	3.40E-04	0.15	2.88E-06	1.27	-	-
180	187	11,0	-	-	5.99E-07	0.08	9.19E-05	0.13	-	-	2.59E-06	0.87	-	-	2.53E-04	-1.49	1.02E-04	-1.00	1.07E-03	-2.14
187	280	20,0	-	-	7.87E-08	0.87	-	-	1.26E-04	1.72	4.88E-07	0.08	-	-	1.31E-06	-0.63	7.29E-08	-5.31	-	-
187	221	20,3	1.85E-10	3.40	2.66E-08	1.69	2.23E-06	-0.44	2.98E-09	0.41	1.56E-08	-3.26	3.20E-10	-0.17	4.54E-08	-5.22	2.92E-08	-0.70	1.92E-07	-0.26
187	439	18,2	-	-	2.82E-07	1.66	3.76E-06	-1.33	-	-	4.57E-08	0.11	1.15E-06	-2.54	8.90E-05	0.26	2.35E-06	-0.58	4.99E-08	-1.72
187	431	13,7	-	-	6.68E-08	0.87	1.53E-06	-3.92	-	-	1.57E-05	2.11	2.08E-06	0.16	-	-	7.25E-06	-0.01	1.46E-06	-5.43
221	439	20,5	5.81E-10	0.39	5.99E-07	0.08	3.26E-08	0.71	-	-	1.94E-09	0.56	5.09E-08	-0.87	1.40E-08	-0.70	2.34E-08	1.34	5.04E-09	-0.40
431	439	13,5	-	-	6.53E-06	0.82	1.97E-06	-0.83	-	-	7.16E-07	0.25	5.16E-06	0.57	1.34E-04	0.07	4.25E-08	-0.34	1.47E-06	-0.74

Tabelle 8-7: Ergebnisse der Kontroll-Messung vor Anreicherung mit Gly-ChaFRADIC von BSA-BS^3-d$_{0/4}$. 3 Replikate, jeweils 2 pmol.

AA1	AA2	Abstand (Å)	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 2
1	12	19,5	-	6.01E-06	2.66E-05
114	431	19,9	1.75E-03	1.64E-02	-
116	431	21,3	1.33E-05	2.06E-05	6.75E-04
180	187	11,0	5.26E-05	3.80E-05	1.04E-05
187	221	20,3	8.28E-06	8.43E-06	7.01E-05
187	431	13,7	2.01E-04	8.93E-05	3.39E-06
187	439	18,2	2.68E-07	1.10E-06	6.50E-07
221	439	20,5	8.43E-06	5.84E-07	1.08E-05
431	439	13,5	3.53E-06	1.83E-05	3.12E-06
524	544	14,3	-	7.16E-04	3.87E-04

Tabelle 8-8: Peptidsequenzen der identifizierten Cross-Links mit Gly-ChaFRADIC Anreicherung der Probe pBSA. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die verlinkten Aminosäuren.

Gly-ChaFRADIC pBSA			
AA1	AA2	distance (Å)	Peptid-Sequenzen
1	239	22,7	DTHK(1)-LVTDLTKVHK(7)
1	12	19,5	DTHK(1)-FKDLGEEHFK(2)
114	431	19,9	DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK(8)-SLGKVGTR(4)
116	431	21,3	LKPDPNTLCDEFK(2)-SLGKVGTR(4)
116	523	18,0	LKPDPNTLCDEFK(2)-QIKK(3)
180	187	11,0	GACLLPKIETMR(7)-EKVLTSSAR(2)
187	280	20,0	EKVLTSSAR(2)-LKECCDKPLLEK(7)
187	221	20,3	EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)
187	431	13,7	EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)
187	439	18,2	EKVLTSSAR(2)-CCTKPESER(4)
221	439	20,5	LSQKFPK(4)-CCTKPESER(4)
431	439	13,5	SLGKVGTR(4)-CCTKPESER(4)
524	544	14,3	KQTALVELLK(1)-ATEEQLKTVMENFVAFVDK(7)

Tabelle 8-9: Identifizierte lineare Peptide von BSA in den Kontrollen und den Gly-ChaFRADIC-Fraktionen zur Berechnung der Anreicherungseffizienz unter Angabe der Ladungszustände der Peptide mit Gly- bzw. GlyBoc-Modifikationen. Die Peptide wurden mit Mascot identifiziert. Nur Treffer, die in zwei von drei Replikaten identifiziert werden konnten, wurden akzeptiert. Modifikationen: Carbamidomethyl = Carbmidomethylierung an Cystein, Xlink:DSS = BS^3-Monolink an Lysin oder N-Terminus, Gly = Gly-Modifikation an Lysin oder N-Terminus. Werte für Ladungszustände der Peptide, die nur in der Kontrolle gefunden wurden, sind nicht angegeben, da diese für die Berechnung der Anreicherungs-Effizienz keine Rolle spielten.

Peptidsequenzen	Ladungszustand ohne Modifikation = mit Gly-Modifikation	Ladungs-zustand mit GlyBoc-Modifikation	Modifikationen
nur in Kontrolle			
YNGVFQEccQAEDKGAcLLPK	-	-	C8(Carbamidomethyl); C9(Carbamidomethyl); C17(Carbamidomethyl)
ADLAkYIcDNQDTISSK	-	-	K5(Xlink:DSS); C8(Carbamidomethyl)
ccAADDkEAcFAVEGPK	-	-	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); K7(Xlink:DSS); C10(Carbamidomethyl)
GAcLLPkIETMR	-	-	C3(Carbamidomethyl); K7(Xlink:DSS)
kVPQVSTPTLVEVSR	-	-	K1(Xlink:DSS)
LAkEYEATLEEccAK	-	-	K3(Xlink:DSS); C12(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
LGEYGFQNAILVR	-	-	
HLVDEPQNLIkQNcDQFEK	-	-	K11(Xlink:DSS); C14(Carbamidomethyl)
LAKEYEATLEEccAK	-	-	C12(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
LkHLVDEPQNLIK	-	-	
VASLRETYGDMADccEK	-	-	C14(Carbamidomethyl); C15(Carbamidomethyl)

Fortsetzung Tabelle 8-9

Peptidsequenzen	Ladungszustand ohne Modifikation = mit Gly-Modifikation	Ladungs-zustand mit GlyBoc-Modifikation	Modifikationen
in Kontrolle und Gly-ChaFRADIC			
ccAADDKEAcFAVEGPK	3	0	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
DAIPENLPPLTADFAEDK	2	0	
DDPHAcYSTVFDK	3	1	C6(Carbamidomethyl)
DDSPDLPkLKPDPNTLcDEFK	3	0	K8(Xlink:DSS); C17(Carbamidomethyl)
EccHGDLLEcADDR	3	2	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
EccHGDLLEcADDRADLAK	4	2	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
ETYGDMADccEK	2	0	C9(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
EYEATLEEccAK	2	0	C9(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
EYEATLEEccAKDDPHAcYSTVFDK	4	1	C9(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl); C18(Carbamidomethyl)
FkDLGEEHFK	3	1	K2(Xlink:DSS)
FKDLGEEHFK	4	1	
GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVK	3	1	C14(Carbamidomethyl)
HLVDEPQNLIK	3	1	
KQTALVELLK	3	0	
KVPQVSTPTLVEVSR	3	1	
LcVLHEKTPVSEK	4	1	C2(Carbamidomethyl)
LFTFHADIcTLPDTEK	3	1	C9(Carbamidomethyl)
LKEccDKPLLEK	4	0	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)
mPcTEDYLSLILNR	2	1	M1(Oxidation); C3(Carbamidomethyl)
NEcFLSHKDDSPDLPK	4	1	C3(Carbamidomethyl)
RHPEYAVSVLLR	4	3	
RPcFSALTPDETYVPK	3	1	C3(Carbamidomethyl)
SHcIAEVEK	3	1	C3(Carbamidomethyl)
SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK	4	1	C3(Carbamidomethyl)
SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVcK	5	1	C3(Carbamidomethyl); C30(Carbamidomethyl)
SLHTLFGDELcK	3	1	C11(Carbamidomethyl)
TcVADESHAGcEK	3	1	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)
TcVADESHAGcEkSLHTLFGDELcK	4	2	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl); K13(Xlink:DSS); C24(Carbamidomethyl)
VHkEccHGDLLEcADDR	4	3	K3(Xlink:DSS); C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
VHKEccHGDLLEcADDR	5	3	C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
YNGVFQEccQAEDK	2	0	C8(Carbamidomethyl); C9(Carbamidomethyl)

Fortsetzung Tabelle 8-9

Peptidsequenzen	Ladungszustand ohne Modifikation = mit Gly-Modifikation	Ladungs-zustand mit GlyBoc-Modifikation	Modifikationen
nur in Gly-ChaFRADIC			
qNcDQFEk	2	0	N-Term(Gly); C3(Carbamidomethyl); K8(Gly)
yIcDNQDTISSk	2	0	N-Term(Gly); C3(Carbamidomethyl); K12(Gly)
hPEYAVSVLLR	2	1	N-Term(Gly)
dAIPENLPPLTADFAEDkDVck	3	0	N-Term(Gly); K18(Gly); C21(Carbamidomethyl); K22(Gly)
eccDkPILEk	3	0	N-Term(Gly); C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); K5(Gly); K10(Gly)
hLVDEPQNLIkQNcDQFEk	3	0	N-Term(Gly); K11(Gly); C14(Carbamidomethyl); K19(Gly)
ccTkPESER	3	1	N-Term(Gly); C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); K4(Gly)
dDPHAcYSTVFDk	3	1	N-Term(Gly); C6(Carbamidomethyl); K13(Gly)
dLGEEHFk	3	1	N-Term(Gly); K8(Gly)
eTYGDmADccEkQEPER	3	1	N-Term(Gly); M6(Oxidation); C9(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl); K12(Gly)
nEcFLSHk	3	1	N-Term(Gly); C3(Carbamidomethyl); K8(Gly)
lkPDPNTLcDEFkADEk	4	0	N-Term(Gly); K2(Gly); C9(Carbamidomethyl); K13(Gly); K17(Gly)
lkHLVDEPQNLIk	4	1	N-Term(Gly); K2(Xlink); K13(Gly)
qEPERNEcFLSHk	4	2	N-Term(Gly); C8(Carbamidomethyl); K13(Gly)
lkPDPNTLcDEFkADEkk	5	0	N-Term(Gly); K2(Gly); C9(Carbamidomethyl); K13(Gly); K17(Gly); K18(Gly)
qEPERNEcFLSHkDDSPDLPk	5	2	N-Term(Gly); C8(Carbamidomethyl); K13(Gly); K21(Gly)
dTHkSEIAHR	5	3	N-Term(Gly); K4(Gly)
vHkEccHGDLLEcADDRADLAk	6	3	N-Term(Gly); K3(Gly); C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl); K22(Gly)
vHkEccHGDLLEcADDRADLAk	6	3	N-Term(Gly); K3(Xlink); C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl); K22(Gly)

8.10 Zu Kapitel 4.4.4 Alternative Enzyme für Cross-Link Analyse

Tabelle 8-10: Peptidsequenzen nach *in silico* Verdau von BSA mit LysC und Trypsin. Mit MSDigest[99] durchgeführt: maximal eine überlesene Schnittstelle, keine Modifikationen, minimale Peptidlänge 5 Aminosäuren. Grafische Darstellung in Abbildung 4-27 (S. 92).

BSA LysC Verdau: Peptidsequenzen	Ladung	BSA Trypsin Verdau: Peptidsequenzen	Ladung
LVVSTQTALA	1	LVVSTQTALA	1
ATEEQLK	2	ATEEQLK	2
DDSPDLPK	2	DDSPDLPK	2
AEFVEVTK	2	AEFVEVTK	2
QNCDQFEK	2	YLYEIAR	2
QTALVELLK	2	QNCDQFEK	2
EACFAVEGPK	2	QTALVELLK	2
LVNELTEFAK	2	CCTESLVNR	2
YICDNQDTISSK	2	EACFAVEGPK	2
EYEATLEECCAK	2	LVNELTEFAK	2
TVMENFVAFVDK	2	ETYGDMADCCEK	2
YNGVFQECCQAEDK	2	YICDNQDTISSK	2
DAIPENLPPLTADFAEDK	2	EYEATLEECCAK	2
EACFAVEGPKLVVSTQTALA	2	TVMENFVAFVDK	2
FGERALK	3	LGEYGFQNALIVR	2
IETMREK	3	VPQVSTPTLVEVSR	2
DLGEEHFK	3	DAFLGSFLYEYSR	2
TPVSEKVTK	3	YNGVFQECCQAEDK	2
SHCIAEVEK	3	MPCTEDYLSLILNR	2
KQTALVELLK	3	DAIPENLPPLTADFAEDK	2
AWSVARLSQK	3	EACFAVEGPKLVVSTQTALA	2
ECCDKPLLEK	3	SLGKVGTR	3
DVCKNYQEAK	3	FGERALK	3
FPKAEFVEVTK	3	LCVLHEK	3
HLVDEPQNLIK	3	LSQKFPK	3
TCVADESHAGCEK	3	IETMREK	3
SLHTLFGDELCK	3	LRCASIQK	3
DDPHACYSTVFDK	3	DLGEEHFK	3
LKPDPNTLCDEFK	3	NECFLSHK	3
YICDNQDTISSKLK	3	TPVSEKVTK	3
AEFVEVTKLVTDLTK	3	EKVLTSSAR	3
CCAADDKEACFAVEGPK	3	ALKAWSVAR	3
LFTFHADICTLPDTEK	3	SHCIAEVEK	3
VASLRETYGDMADCCEK	3	VLTSSARQR	3
VPQVSTPTLVEVSRSLGK	3	CCTKPESER	3
TVMENFVAFVDKCCAADDK	3	YLYEIARR	3
ATEEQLKTVMENFVAFVDK	3	CASIQKFGER	3
YNGVFQECCQAEDKGACLLPK	3	KQTALVELLK	3

Fortsetzung Tabelle 8-10

BSA LysC Verdau: Peptidsequenzen	Ladung	BSA Trypsin Verdau: Peptidsequenzen	Ladung
DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK	3	AWSVARLSQK	3
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	3	ECCDKPLLEK	3
SEIAHRFK	4	DVCKNYQEAK	3
LVTDLTKVHK	4	HPEYAVSVLLR	3
LKECCDKPLLEK	4	FPKAEFVEVTK	3
AWSVARLSQKFPK	4	HLVDEPQNLIK	3
LKHLVDEPQNLIK	4	GACLLPKIETMR	3
GACLLPKIETMREK	4	TCVADESHAGCEK	3
QEPERNECFLSHK	4	VTKCCTESLVNR	3
DDPHACYSTVFDKLK	4	SLHTLFGDELCK	3
LKPDPNTLCDEFKADEK	4	FWGKYLYEIAR	3
LGEYGFQNALIVRYTRK	4	DDPHACYSTVFDK	3
ECCHGDLLECADDRADLAK	4	LKPDPNTLCDEFK	3
LFTFHADICTLPDTEKQIK	4	ECCHGDLLECADDR	3
HLVDEPQNLIKQNCDQFEK	4	YICDNQDTISSKLK	3
DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK	4	KVPQVSTPTLVEVSR	3
AFDEKLFTFHADICTLPDTEK	4	AEFVEVTKLVTDLTK	3
LVNELTEFAKTCVADESHAGCEK	4	LAKEYEATLEECCAK	3
CCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK	4	DAFLGSFLYEYSRR	3
EYEATLEECCAKDDPHACYSTVFDK	4	CCAADDKEACFAVEGPK	3
SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK	4	RPCFSALTPDETYVPK	3
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAK	4	LFTFHADICTLPDTEK	3
HKPKATEEQLK	5	ADLAKYICDNQDTISSK	3
QTALVELLKHKPK	5	HPYFYAPELLYYANK	3
VLTSSARQRLRCASIQK	5	VASLRETYGDMADCCEK	3
FGERALKAWSVARLSQK	5	VPQVSTPTLVEVSRSLGK	3
ECCDKPLLEKSHCIAEVEK	5	LGEYGFQNALIVRYTR	3
QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	5	ETYGDMADCCEKQEPER	3
TCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCK	5	TVMENFVAFVDKCCAADDK	3
YLYEIARRHPYFYAPELLYYANK	5	ATEEQLKTVMENFVAFVDK	3
QNCDQFEKLGEYGFQNALIVRYTRK	5	NYQEAKDAFLGSFLYEYSR	3
VTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK	5	YNGVFQECCQAEDKGACLLPK	3
SLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEK	5	DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK	3
DLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	5	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	3
CCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEK	5	QNCDQFEKLGEYGFQNALIVR	3
ECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSK	5	SEIAHRFK	4
DTHKSEIAHRFK	6	LVTDLTKVHK	4
SEIAHRFKDLGEEHFK	6	FKDLGEEHFK	4
VHKECCHGDLLECADDRADLAK	6	LKECCDKPLLEK	4
DAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAK	6	RHPEYAVSVLLR	4
FWGKYLYEIARRHPYFYAPELLYYANK	6	VGTRCCTKPESER	4
VASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHK	6	LCVLHEKTPVSEK	4

Fortsetzung Tabelle 8-10

BSA LysC Verdau: Peptidsequenzen	Ladung	BSA Trypsin Verdau: Peptidsequenzen	Ladung
LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGK	6	LKHLVDEPQNLIK	4
VLTSSARQRLRCASIQKFGERALK	7	HPEYAVSVLLRLAK	4
IETMREKVLTSSARQRLRCASIQK	7	QEPERNECFLSHK	4
VGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEK	7	DDPHACYSTVFDKLK	4
-	-	NECFLSHKDDSPDLPK	4
-	-	SLHTLFGDELCKVASLR	4
-	-	LKPDPNTLCDEFKADEK	4
-	-	RHPYFYAPELLYYANK	4
-	-	ECCHGDLLECADDRADLAK	4
-	-	LFTFHADICTLPDTEKQIK	4
-	-	HLVDEPQNLIKQNCDQFEK	4
-	-	DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK	4
-	-	RPCFSALTPDETYVPKAFDEK	4
-	-	AFDEKLFTFHADICTLPDTEK	4
-	-	MPCTEDYLSLILNRLCVLHEK	4
-	-	LVNELTEFAKTCVADESHAGCEK	4
-	-	CCTKPESERMPCTEDYLSLILNR	4
-	-	CCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK	4
-	-	EYEATLEECCAKDDPHACYSTVFDK	4
-	-	SHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK	4
-	-	HPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDK	4
-	-	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAK	4
-	-	DTHKSEIAHR	5
-	-	HKPKATEEQLK	5
-	-	QTALVELLKHKPK	5
-	-	VHKECCHGDLLECADDR	5
-	-	ECCDKPLLEKSHCIAEVEK	5
-	-	TCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCK	5
-	-	DLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	5

Tabelle 8-11: Peptidsequenzen und Ladungszustände der identifizierten Cross-Links. Keine Modifikationen und überlesenen Schnittstellen berücksichtigt. Grafische Darstellung in Abbildung 4-27 (S. 92).

BSA Trypsin Verdau: XL-Peptide	Peptid 1	Ladung	Peptid 2	Ladung	Ladung gesamt
CCTKPESER(4)-SLGKVGTR(4)	CCTKPESER	3	SLGKVGTR	3	4
CCTKPESER(4)-LSQKFPK(4)	CCTKPESER	3	LSQKFPK	3	4
EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)	EKVLTSSAR	3	SLGKVGTR	3	4
LAKEYEATLEECCAK(3)-VTKCCTESLVNR(3)	LAKEYEATLEECCAK	3	VTKCCTESLVNR	4	5
LAKEYEATLEECCAK(3)-LKHLVDEPQNLIK(2)	LAKEYEATLEECCAK	3	LKHLVDEPQNLIK	3	4
LAKEYEATLEECCAK(3)-DTHK(1)	LAKEYEATLEECCAK	3	DTHK	3	4
ECCDKPLLEK(5)-EKVLTSSAR(2)	ECCDKPLLEK	3	EKVLTSSA	3	4
CCTKPESER(4)-EKVLTSSAR(2)	CCTKPESER	3	EKVLTSSAR	3	4
EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)	EKVLTSSAR	3	LSQKFPK	3	4
EKVLTSSAR(2)-DTHK(1)	EKVLTSSAR	3	DTHK	3	4
GACLLPKIETMR(7)-EKVLTSSAR(2)	GACLLPKIETMR	3	EKVLTSSAR	3	4
FKDLGEEHFK(2)-DTHK(1)	FKDLGEEHFK	4	DTHK	3	5
LKPDPNTLCDEFK(2)-SLGKVGTR(4)	LKPDPNTLCDEFK	3	SLGKVGTR	3	4
DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK(8)-SLGKVGTR(4)	DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK	4	SLGKVGTR	3	5

Tabelle 8-12: Peptidsequenzen und Ladungszustände von theoretisch erstellen LysC-Peptide der identifizierten Cross-Links aus Tabelle 8-11. Keine Modifikationen und überlesenen Schnittstellen berücksichtigt. Grafische Darstellung in Abbildung 4-27.

BSA LysC Verdau: XL-Peptide	Peptid 1	Ladung	Peptid 2	Ladung	Ladung gesamt
CCTKPESER(4)-SLGKVGTR(4)	VGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEK	7	VPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTK	5	10
CCTKPESER(4)-LSQKFPK(4)	VGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEK	7	AWSVARLSQKFPK	4	9
EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)	IETMREKVLTSSARQRLRCASIQ	6	VPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTK	5	9
LAKEYEATLEECCAK(3)-VTKCCTESLVNR(3)	DAFLGSFLYEYSEEHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAK	5	VTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK	5	8
LAKEYEATLEECCAK(3)-LKHLVDEPQNLIK(2)	DAFLGSFLYEYSEEHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAK	5	LKHLVDEPQNLIK	4	7
LAKEYEATLEECCAK(3)-DTHK(1)	DAFLGSFLYEYSEEHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAK	5	DTHKSEIAHRFK	6	9
ECCDKPLLEK(5)-EKVLTSSAR(2)	ECCDKPLLEK	3	IETMREKVLTSSARQRLRCASIQ	6	7
CCTKPESER(4)-EKVLTSSAR(2)	VGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEK	7	IETMREKVLTSSARQRLRCASIQ	6	11
EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)	IETMREKVLTSSARQRLRCASIQ	6	AWSVARLSQKFPK	4	8
EKVLTSSAR(2)-DTHK(1)	IETMREKVLTSSARQRLRCASIQ	6	DTHKSEIAHRFK	6	10
GACLLPKIETMR(7)-EKVLTSSAR(2)	GACLLPKIETMR	3	IETMREKVLTSSARQRLRCASIQ	6	7
FKDLGEEHFK(2)-DTHK(1)	DTHKSEIAHRFKDLGEEHFK*	6			6
LKPDPNTLCDEFK(2)-SLGKVGTR(4)	LKPDPNTLCDEFK	3	VPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTK	5	6
DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK(8)-SLGKVGTR(4)	DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK	4	VPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTK	5	7

*Loop-Link nach LysC-Verdau

8.11 Zu Kapitel 4.4.5 ChaFRADIC mit zweistufigem Verdau (XL-ChaFRADIC)

Tabelle 8-13: Detaillierte Ergebnisse des Vergleichs von BSA-BS^3-d$_{0/4}$, jeweils drei Replikate verdaut mit Trypsin oder mit LysC und Trypsin. AA1/2 = Aminosäure 1/2, ppm = Massenabweichung in ppm, MS1 = Vorhandensein des typischen Isotopenmusters bedingt durch BS^3-d$^{0/4}$.

			Trypsin-Verdau									LysC-Trypsin-Verdau								
			Replikat 1			Replikat 2			Replikat 3			Replikat 1			Replikat 2			Replikat 3		
AA1	AA2	Abstand (Å)	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1
1	12	19,5	-	-	-	-	-	-	1.27E-04	-1.16	ja	-	-	-	5.77E-04	-1.84	ja	-	-	-
1	261	25,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.48E-04	-0.28	ja	2.88E-04	1.86	ja	1.03E-03	-0.30	ja
116	431	21,3	1.09E-03	-0.32	ja	2.83E-03	-2.05	ja	2.18E-04	-1.56	ja	6.59E-04	-1.19	ja	3.57E-05	-0.52	ja	1.00E-03	0.10	ja
180	187	11,0	1.34E-05	-0.79	ja	6.15E-06	-3.06	ja	3.50E-06	-0.02	ja	3.24E-04	0.37	ja	3.98E-05	-0.31	ja	-	-	-
187	439	18,2	1.47E-05	-3.51	ja	1.67E-08	0.62	ja	3.13E-04	-0.18	ja	9.12E-06	-2.33	ja	3,63E-04	-1.77	ja	8.37E-06	0.46	ja
187	221	20,3	1.32E-04	-1.63	ja	1.99E-04	-0.03	ja	5.91E-05	-0.43	ja	4.83E-05	-2.65	ja	7.85E-05	0.16	ja	6.31E-06	-0.70	ja
187	431	13,7	3.40E-04	0.38	ja	5.62E-04	-1.36	ja	7.31E-04	-0.27	ja	3.04E-04	-0.30	ja	8,07E-03	-0.73	ja	3.61E-03	-0.82	ja
187	280	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.47E-04	-3.20	ja	4.93E-05	1.72	ja	2.99E-03	0.20	ja
204	350	16,4	3.78E-02	1.44	ja	-	-	-	-	-	-	1.57E-04	0.45	ja	-	-	-	3.96E-06	-0.84	ja
221	439	20,5	1.21E-02	3.28	ja	-	-	-	3.89E-05	-0.37	ja	2.89E-04	-0.63	ja	6.39E-04	-0.46	ja	8.30E-05	-2.69	ja
431	439	13,5	8.75E-06	-0.74	ja	2.26E-06	-0.24	ja	7.79E-06	0.45	ja	1.68E-06	-0.67	ja	3.89E-04	-0.67	ja	2.35E-03	-3.36	ja
524	544	14,3	2.78E-04	-3.55	ja	1.05E-04	-0.79	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.96E-04	0.06	ja
			9			7			8			10			10			10		

Tabelle 8-14: Peptidsequenzen der identifizierten Cross-Links mit XL-ChaFRADIC Anreicherung der Probe pBSA. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die verlinkten Aminosäuren.

XL-ChaFRADIC pBSA			
AA1	AA2	Abstand (Å)	Peptid-Sequenzen
1	12	19,5	DTHK(1)-FKDLGEEHFK(2)
12	131	20,4	ADEKK(4)-FKDLGEEHFK(2)
114	431	19,9	DDSPDLPKLK(8)-SLGKVGTR(4)
116	431	21,3	LKPDPNTLCDEFK(2)-SLGKVGTR(4)
180	187	11,0	GACLLPKIETMR(7)-EKVLTSSAR(2)
187	221	20,3	EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)
187	280	20,0	EKVLTSSAR(2)-ECCDKPLLEK(5)
187	431	13,7	EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)
187	439	18,2	EKVLTSSAR(2)-CCTKPESER(4)
204	350	16,4	CASIQKFGER(6)-LAKEYEATLEECCAK(3)
211	239	9,0	LVTDLTKVHK(7)-ALKAWSVAR(3)
221	439	20,5	LSQKFPK(4)-CCTKPESER(4)
350	474	18,0	LAKEYEATLEECCAK(3)-VTKCCTESLVNR(3)
431	439	13,5	SLGKVGTR(4)-CCTKPESER(4)
524	544	14,3	KQTALVELLK(1)-ATEEQLKTVMENFVAFVDK(7)

Tabelle 8-15: Peptidsequenzen der identifizierten Cross-Links mit XL-ChaFRADIC Anreicherung der Probe mBSA. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die verlinkten Aminosäuren.

XL-ChaFRADIC mBSA			
AA1	AA2	Abstand (Å)	Peptid-Sequenzen
1	12	19,5	DTHK(1)-FKDLGEEHFK(2)
1	261	25,4	DTHK(1)-ADLAKYICDNQDTISSK(5)
1	239	22,7	DTHK(1)-LVTDLTKVHK(7)
114	431	19,9	DDSPDLPKLK(8)-SLGKVGTR(4)
116	431	21,3	LKPDPNTLCDEFKADEK(2)-SLGKVGTR(4)
187	221	20,3	EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)
187	431	13,7	EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)
187	439	18,2	EKVLTSSAR(2)-CCTKPESER(4)
204	221	26,4	CASIQKFGER(6)-LSQKFPK(4):0
211	221	15,5	ALKAWSVAR(3)-LSQKFPK(4)
211	350	13,5	ALKAWSVAR(3)-LAKEYEATLEECCAK(3)
221	239	19,3	LSQKFPK(4)-LVTDLTKVHK(7)
221	439	20,5	LSQKFPK(4)-CCTKPESER(4)
413	537	11,4	KVPQVSTPTLVEVSR(1)-HKPKATEEQLK(4)
431	439	13,5	SLGKVGTR(4)-CCTKPESER(4)
520	524	6,4	LFTFHADICTLPDTEKQIK(16)-KQTALVELLK(1)
524	544	14,3	KQTALVELLK(1)-ATEEQLKTVMENFVAFVDK(7)

Tabelle 8-16: Peptidsequenzen der identifizierten Cross-Links mit XL-ChaFRADIC Anreicherung der Probe hBSA. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die verlinkten Aminosäuren.

XL-ChaFRADIC hBSA			
AA1	AA2	Abstand (Å)	Peptid-Sequenzen
1	12	19,5	DTHK(1)-FKDLGEEHFK(2)
1	239	22,7	DTHK(1)-LVTDLTKVHK(7)
1	261	25,4	DTHK(1)-ADLAKYICDNQDTISSK(5)
12	131	20,4	FKDLGEEHFK(2)-ADEKK(4)
12	280	21,0	FKDLGEEHFK(2)-ECCDKPLLEK(5)
116	431	21,3	LKPDPNTLCDEFK(2)-SLGKVGTR(4)
180	187	11,0	GACLLPKIETMR(7)-EKVLTSSAR(2)
187	221	20,3	EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)
187	280	20,0	EKVLTSSAR(2)-ECCDKPLLEK(5)
187	431	13,7	EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)
187	439	18,2	EKVLTSSAR(2)-CCTKPESER(4)
211	350	13,5	ALKAWSVAR(3)-LAKEYEATLEECCAK(3)
221	239	19,3	LSQKFPK(4)-LVTDLTKVHK(7)
221	439	20,5	LSQKFPK(4)-CCTKPESER(4)
350	474	18,0	LAKEYEATLEECCAK(3)-VTKCCTESLVNR(3)
431	439	13,5	SLGKVGTR(4)-CCTKPESER(4)
524	544	14,3	KQTALVELLK(1)-ATEEQLKTVMENFVAFVDK(7)

Tabelle 8-17: Identifizierte lineare Peptide von BSA in den Kontrollen und den XL-ChaFRADIC-Fraktionen zur Berechnung der Anreicherungseffizienz (mit Mascot identifiziert) und die daraus theoretisch erstellen LysC-Peptide. Nur Treffer, die in zwei von drei Replikaten identifiziert werden konnten, wurden akzeptiert. Modifikationen: Carbamidomethyl = Carbmidomethylierung an Cystein, Xlink = BS^3-Monolink an Lysin oder N-Terminus, Werte für Ladungszustände der Peptide, die nur in der Kontrolle gefunden wurden, nicht angegeben, da diese für die Berechnung der Anreicherungs-Effizienz keine Rolle spielten.

Peptidsequenz Trypsin	Peptidsequenz LysC	Ladungszustand LysC-Verdau	Ladungs-zustand Trypsin-Verdau	
nur in Kontrolle				
ADLAkYIcDNQDTISSK	-	-	-	K5(Xlink); C8(Carbamidomethyl)
ATEEQLkTVMENFVAFVDK	-	-	-	K7(Xlink)
ccAADDKEAcFAVEGPK	-	-	-	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
DAFLGSFLYEYSR	-	-	-	-
DAIPENLPPLTADFAEDkDVcK	-	-	-	K18(Xlink); C21(Carbamidomethyl)
DDPHAcYSTVFDK	-	-	-	C6(Carbamidomethyl)
EccHGDLLEcADDRADLAkYIcDNQDTISSK	-	-	-	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl); K19(Xlink); C22(Carbamidomethyl)
GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVK	-	-	-	C14(Carbamidomethyl)
HLVDEPQNLIkQNcDQFEK	-	-	-	K11(Xlink); C14(Carbamidomethyl)
KQTALVELLK	-	-	-	-
kVPQVSTPTLVEVSR	-	-	-	K1(Xlink)
KVPQVSTPTLVEVSR	-	-	-	-
LAkEYEATLEEccAK	-	-	-	K3(Xlink); C12(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
LFTFHADIcTLPDTEK	-	-	-	C9(Carbamidomethyl)
LGEYGFQNALLVR	-	-	-	-
LkHLVDEPQNLIK	-	-	-	K2(Xlink)
LKPDPNTLcDEFK	-	-	-	C9(Carbamidomethyl)
mPcTEDYLSLILNR	-	-	-	M1(Oxidation); C3(Carbamidomethyl)
MPcTEDYLSLILNR	-	-	-	C3(Carbamidomethyl)
QNcDQFEkLGEYGFQNALIVR	-	-	-	C3(Carbamidomethyl); K8(Xlink)

Fortsetzung Tabelle 8-17

Peptidsequenz Trypsin	Peptidsequenz LysC	Ladungszustand LysC-Verdau	Ladungs-zustand Trypsin-Verdau	
TcVADESHAGcEkSLHTLFGDELcK	-	-	-	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl); K13(Xlink); C24(Carbamidomethyl)
VASLRETYGDMADccEK	-	-	-	C14(Carbamidomethyl); C15(Carbamidomethyl)
VHkEccHGDLLEcADDRADLAK	-	-	-	K3(Xlink); C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
VPQVSTPTLVEVSR	-	-	-	-
YNGVFQEccQAEDK	-	-	-	C8(Carbamidomethyl); C9(Carbamidomethyl)
in Kontrolle und XL-ChaFRADIC				
DAIPENLPPLTADFAEDK	DAIPENLPPLTADFAEDK	2	2	
DDSPDLPkLKPDPNTLcDEFK	DDSPDLPkLKPDPNTLcDEFK	3	3	K8(Xlink); C17(Carbamidomethyl)
EccDKPLLEkSHcIAEVEK	EccDKPLLEkSHcIAEVEK	4	4	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); K10(Xlink); C13(Carbamidomethyl)
EccHGDLLEcADDR	EccHGDLLEcADDRADLAK	4	3	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
EccHGDLLEcADDRADLAK	EccHGDLLEcADDRADLAK	4	3	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
HLVDEPQNLIK	HLVDEPQNLIK	3	3	-
HPYFYAPELLYYANK	YLYEIARRHPYFYAPELLYYANK	5	3	-
LKEccDKPLLEK	LKEccDKPLLEK	4	4	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)
RHPEYAVSVLLR	DAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAK	6	4	-
RHPYFYAPELLYYANK	YLYEIARRHPYFYAPELLYYANK	5	4	-
RPcFSALTPDETYVPK	CCTESLVNRRPcFSALTPDETYVPK	4	3	C3(Carbamidomethyl)
SHcIAEVEK	SHcIAEVEK	3	3	C3(Carbamidomethyl)
SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVcK	SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVcK	5	5	C3(Carbamidomethyl); C30(Carbamidomethyl)
SLHTLFGDELcK	SLHTLFGDELcK	3	3	C11(Carbamidomethyl)
VHkEccHGDLLEcADDR	VHkEccHGDLLEcADDRADLAK	5	4	K3(Xlink); C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
VHkEccHGDLLEcADDRADLAK	VHkEccHGDLLEcADDRADLAK	5	5	K3(XlinkR); C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)

Fortsetzung Tabelle 8-17

Peptidsequenz Trypsin	Peptidsequenz LysC	Ladungszustand LysC-Verdau	Ladungs-zustand Trypsin-Verdau	
nur in XL-ChaFRADIC				
DTHkSEIAHR	DTHkSEIAHRRFK	6	4	K4(Xlink)
EccHGDLLEcADDRADLAk	EccHGDLLEcADDRADLAk	3	3	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl); K19(Xlink)
FKDLGEEHFK	SEIAHRFkDLGEEHFK	5	3	-
FkDLGEEHFK	SEIAHRFkDLGEEHFK	5	4	K2(Xlink)
HKPkATEEQLK	HKPkATEEQLK	4	4	K4(Xlink)
LcVLHEK	VGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEK	7	3	C2(Carbamidomethyl)
LGEYGFQNALIVRYTRK	LGEYGFQNALIVRYTRK	4	4	-
LKHLVDEPQNLIK	LKHLVDEPQNLIK	4	4	-
QEPERNEcFLSHK	QEPERNEcFLSHK	4	4	C8(Carbamidomethyl)
SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK	SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK	4	4	C3(Carbamidomethyl)
TcVADESHAGcEK	TcVADESHAGcEK	3	3	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)
TcVADESHAGcEKSLHTLFGDELcK	TcVADESHAGcEKSLHTLFGDELcK	5	5	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl); C24(Carbamidomethyl)
VASLRETYGDmADccEK	VASLRETYGDmADccEK	3	3	M11(Oxidation); C14(Carbamidomethyl); C15(Carbamidomethyl)

8.12 Zu Kapitel 4.4.6 Kombination von Größenausschluss-Chromatographie mit ChaFRADIC

Tabelle 8-18: Detaillierte Ergebnisse der Berechnung der Peptidlängenverteilung in den SEC-Fraktionen 1-8 von drei Replikaten. SEC = SEC Fraktion, #AA = Peptidlänge, MW = Mittelwert der PSM für eine Peptidlänge der drei Replikate, Abw. = Standardabweichung der Peptidlänge der drei Replikate, Rel = relative Standardabweichung.

SEC	1			2			3			4			5			6			7			8		
#AA	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	R	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel
5	19	13	71%	20	14	67%	47	7	15%	28	25	89%	51	3	6%	48	7	14%	35	5	15%	48	8	16%
6	72	13	18%	84	6	7%	141	7	5%	110	79	72%	173	2	1%	158	4	3%	136	12	8%	150	5	3%
7	100	4	4%	121	15	13%	147	3	2%	107	74	70%	165	18	11%	141	9	7%	136	8	6%	132	5	4%
8	167	8	5%	182	24	13%	212	11	5%	167	91	55%	220	17	8%	230	12	5%	233	13	6%	246	2	1%
9	225	14	6%	243	17	7%	279	30	11%	231	103	45%	327	37	11%	311	3	1%	343	14	4%	348	33	10%
10	374	23	6%	411	29	7%	422	47	11%	396	109	28%	504	46	9%	534	40	8%	529	48	9%	555	11	2%
11	481	32	7%	489	45	9%	505	47	9%	458	101	22%	558	48	9%	542	34	6%	545	55	10%	595	17	3%
12	500	26	5%	502	30	6%	502	48	10%	473	61	13%	557	67	12%	579	47	8%	545	95	17%	600	9	2%
13	423	19	5%	451	24	5%	452	43	10%	437	39	9%	496	24	5%	477	36	8%	431	66	15%	461	16	4%
14	376	26	7%	387	11	3%	381	28	7%	373	34	9%	418	44	10%	405	33	8%	333	68	21%	351	18	5%
15	317	9	3%	386	16	4%	395	7	2%	381	54	14%	414	11	3%	364	65	18%	273	65	24%	298	8	3%
16	342	16	5%	418	8	2%	423	38	9%	405	70	17%	426	12	3%	366	63	17%	248	95	38%	281	3	1%
17	261	35	13%	397	12	3%	384	42	11%	371	55	15%	384	23	6%	305	84	28%	192	69	36%	192	7	4%
18	192	16	8%	306	46	15%	326	79	24%	311	104	33%	323	63	20%	213	54	26%	127	46	36%	134	2	1%
19	189	21	11%	312	15	5%	320	66	21%	315	74	23%	317	57	18%	212	58	27%	113	37	32%	118	3	3%
20	138	9	7%	233	10	4%	233	40	17%	223	61	27%	225	40	18%	146	43	30%	74	31	42%	73	7	10%
21	99	12	12%	233	31	13%	255	78	31%	226	67	30%	235	60	26%	122	41	34%	53	24	46%	58	5	9%
22	102	18	17%	189	21	11%	196	51	26%	191	54	28%	190	37	20%	103	36	35%	53	19	35%	60	8	13%
23	61	13	21%	135	29	22%	160	53	33%	137	47	34%	133	37	28%	71	31	44%	26	14	53%	23	3	13%
24	41	7	17%	111	30	27%	122	42	34%	109	47	43%	110	36	33%	48	22	46%	18	12	65%	20	1	3%
25	45	14	31%	101	22	22%	113	29	26%	100	40	40%	94	25	26%	35	17	50%	11	6	54%	13	1	9%
26	22	7	30%	76	28	37%	93	40	42%	80	35	44%	75	26	34%	27	16	58%	8	5	62%	8	1	13%
27	31	15	49%	85	17	20%	82	22	27%	73	27	37%	71	25	35%	35	17	48%	8	9	107%	8	1	7%
28	10	8	75%	61	21	35%	77	33	43%	65	26	39%	56	18	32%	24	15	63%	5	3	60%	3	0	0%

Fortsetzung Tabelle 8-18

SEC	1			2			3			4			5			6			7			8		
#AA	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	R	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel	MW	Abw.	Rel
29	21	5	22%	54	21	38%	56	21	39%	45	21	47%	40	19	48%	15	5	33%	6	2	33%	7	2	21%
30	7	4	55%	36	24	66%	42	21	50%	39	18	47%	31	17	55%	10	7	67%	2	1	50%	0	1	173%
31	14	7	50%	53	15	27%	57	25	44%	45	22	50%	45	16	36%	16	12	77%	2	3	108%	3	2	46%
32	11	8	69%	36	15	41%	44	22	50%	38	17	45%	34	16	48%	13	8	59%	4	2	57%	4	2	43%
33	7	1	9%	14	6	41%	22	13	57%	18	10	53%	13	6	48%	5	1	11%	3	2	67%	3	2	58%
34	10	4	44%	26	10	37%	29	12	40%	23	17	73%	21	9	41%	6	2	24%	5	2	40%	4	1	31%
35	7	1	14%	11	7	64%	19	13	65%	16	7	43%	9	5	51%	4	1	27%	3	2	57%	3	1	17%
36	7	1	14%	13	6	45%	18	10	52%	18	7	36%	14	5	35%	6	1	20%	2	2	99%	4	2	42%
37	9	3	34%	17	5	30%	20	6	31%	16	2	13%	12	3	26%	7	4	48%	3	1	33%	2	1	35%
38	3	1	33%	9	3	38%	6	3	54%	3	2	62%	3	2	67%	0	0	-	1	0	0%	0	1	173%
39	0	0	-	2	3	173%	6	5	91%	2	2	87%	2	2	89%	0	0	-	0	0	-	0	0	-
40	3	2	62%	4	2	42%	4	2	43%	3	1	35%	3	1	43%	1	1	100%	1	1	87%	2	1	50%
41	0	0	-	3	3	88%	3	3	87%	1	2	115%	1	1	87%	0	0		0	0		0	0	-
42	3	1	35%	4	2	43%	4	2	35%	3	1	33%	3	1	33%	2	1	49%	1	2	173%	2	1	50%
43	1	1	43%	3	2	78%	3	2	58%	3	1	43%	2	1	50%	1	1	100%	0	0	-	0	0	-
44	0	0	-	2	0	0%	3	2	67%	2	1	35%	2	1	49%	1	1	87%	0	0	-	0	0	-
45	0	0	-	1	1	87%	1	1	100%	1	1	173%	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
46	0	0	-	0	0	-	1	1	173%	0	1	173%	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-

Tabelle 8-19: Peptidsequenzen der identifizierten Cross-Links mit SEC-SEC Anreicherung der Probe hBSA. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die verlinkten Aminosäuren.

AA1	AA2	Abstand (Å)	Peptid-Sequenzen
1	12	19,5	DTHK(1)-FKDLGEEHFK(2)
1	239	22,7	DTHK(1)-LVTDLTKVHK(7)
1	261	25,4	DTHK(1)-ADLAKYICDNQDTISSK(5)
12	131	20,4	FKDLGEEHFK(2)-ADEKK(4)
12	280	21,0	FKDLGEEHFK(2)-ECCDKPLLEK(5)
114	431	19,9	DDSPDLPKLKPDPNTLCDEFK(8)-SLGKVGTR(4)
116	431	21,3	LKPDPNTLCDEFK(2)-SLGKVGTR(4)
180	187	11,0	GACLLPKIETMR(7)-EKVLTSSAR(2)
187	221	20,3	EKVLTSSAR(2)-LSQKFPK(4)
187	280	20,0	EKVLTSSAR(2)-ECCDKPLLEK(5)
187	431	13,7	EKVLTSSAR(2)-SLGKVGTR(4)
187	439	18,2	EKVLTSSAR(2)-CCTKPESER(4)
211	350	13,5	ALKAWSVAR(3)-LAKEYEATLEECCAK(3)
221	239	19,3	LSQKFPK(4)-LVTDLTKVHK(7)
221	439	20,5	LSQKFPK(4)-CCTKPESER(4)
350	474	18,0	LAKEYEATLEECCAK(3)-VTKCCTESLVNR(3)
431	439	13,5	CCTKPESER(4)-SLGKVGTR(4)
524	544	14,3	KQTALVELLK(1)-ATEEQLKTVMENFVAFVDK(7)

Tabelle 8-20: Identifizierte lineare BSA-Peptide in den Kontrollen und den SEC-SCX-Fraktionen zur Berechnung der Anreicherungseffizienz (mit Mascot identifiziert) mit Angabe des Ladungszustands und die daraus theoretisch erstellten LysC-Peptide mit Angabe der Peptidlänge. Nur Treffer, die in zwei von drei Replikaten identifiziert wurden, wurden akzeptiert. Modifikationen: Carbamidomethyl = Carbmidomethylierung an Cystein, Xlink = BS^3-Monolink an Lysin oder N-Terminus, Werte für Länge der Peptide, die nur in der Kontrolle gefunden wurden, nicht angegeben, da diese für die Berechnung der Anreicherungs-Effizienz keine Rolle spielten.

Peptidsequenz nach Trypsin-Verdau	Ladung	Peptidsequenz nach LysC-Verdau	Länge	Modifikation
In Kontrolle und SEC-SCX				
DLGEEHFK	3	DLGEEHFK	8	-
SHcIAEVEK	3	SHcIAEVEK	9	C3(Carbamidomethyl)
EccDKPILEK	3	EccDKPILEK	10	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl)
KQTALVELLK	3	KQTALVELLK	10	-
HLVDEPQNLIK	3	HLVDEPQNLIK	11	-
SLHTLFGDELcK	3	SLHTLFGDELcK	12	C11(Carbamidomethyl)
DDPHAcYSTVFDK	3	DDPHAcYSTVFDK	13	C6(Carbamidomethyl)
LkHLVDEPQNLIK	3	LkHLVDEPQNLIK	13	K2(Xlink:DSS)
LKPDPNTLcDEFK	3	LKPDPNTLcDEFK	13	C9(Carbamidomethyl)
TcVADESHAGcEK	3	TcVADESHAGcEK	13	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)
FkDLGEEHFK	3	SEIAHRFkDLGEEHFK	16	K2(Xlink:DSS)
LFTFHADIcTLPDTEK	3	LFTFHADIcTLPDTEK	16	C9(Carbamidomethyl)
LKEccDKPLLEK	4	LKEccDKPLLEK	12	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)
FKDLGEEHFK	4	SEIAHRFkDLGEEHFK	16	-
DAIPENLPPLTADFAEDK	2	DAIPENLPPLTADFAEDK	18	-
VPQVSTPTLVEVSR	2	VPQVSTPTLVEVSRSLGK	18	-
EccHGDLLEcADDR	3	EccHGDLLEcADDRADLAK	19	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
DDSPDLPkLKPDPNTLcDEFK	3	DDSPDLPkLKPDPNTLcDEFK	21	K8(Xlink:DSS); C17(Carbamidomethyl)
GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVK	3	GLVLIAFSQYLQQcPFDEHVK	21	C14(Carbamidomethyl)
RPcFSALTPDETYVPK	3	CCTESLVNRRPcFSALTPDETYVPK	25	C3(Carbamidomethyl)
LcVLHEK	3	VGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEK	34	C2(Carbamidomethyl)
KVPQVSTPTLVEVSR	3	LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGK	35	-
VHkEccHGDLLEcADDR	4	VHkEccHGDLLEcADDRADLAK	22	K3(Xlink:DSS); C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)

Fortsetzung Tabelle 8-20

In Kontrolle und SEC-SCX				
RHPEYAVSVLLR	4	DLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	29	-
nur SEC-SCX				
HKPkATEEQLK	4	HKPkATEEQLK	11	K4(Xlink)
dTHKSEIAHR	5	dTHKSEIAHRFK	12	N-Term(Xlink)
QEPERNEcFLSHK	4	QEPERNEcFLSHK	13	C8(Carbamidomethyl)
LGEYGFQNALIVRYTk	2	LGEYGFQNALIVRYTk	16	K16(Xlink:DSS)
VASLRETYGDmADccEK	3	VASLRETYGDmADccEK	17	M11(Oxidation); C14(Carbamidomethyl); C15(Carbamidomethyl)
VASLRETYGDMADccEK	3	VASLRETYGDmADccEK	17	-
LGEYGFQNALIVRYTRK	4	LGEYGFQNALIVRYTRK	17	-
VPQVSTPTLVEVSRSLGK	3	VPQVSTPTLVEVSRSLGK	18	-
EccHGDLLEcADDRADLAK	4	EccHGDLLEcADDRADLAK	19	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
DDSPDLPKLkPDPNTLcDEFK	3	DDSPDLPKLkPDPNTLcDEFK	21	K10(Xlink); C17(Carbamidomethyl)
RHPYFYAPELLYYANK	4	YLYEIARRHPYFYAPELLYYANK	23	-
HPEYAVSVLLR	3	DAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAK	28	-
nur Kontrolle				
DAIPENLPPLTADFAEDkDVcK	2	-	-	K18(Xlink:DSS); C21(Carbamidomethyl)
GAcLLPkIETMR	2	-	-	C3(Carbamidomethyl); K7(Xlink:DSS)
LAkEYEATLEEccAK	2	-	-	K3(Xlink:DSS); C12(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)
LGEYGFQNAILVR	2	-	-	-
MPcTEDYLSLILNR	2	-	-	C3(Carbamidomethyl)
TVMENFVAFVDK	2	-	-	-
YNGVFQEccQAEDK	2	-	-	C8(Carbamidomethyl); C9(Carbamidomethyl)
ccAADDKEAcFAVEGPK	3	-	-	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)
DAIPENLPPLTADFAEDKDVcK	3	-	-	C21(Carbamidomethyl)
NEcFLSHKDDSPDLPK	4	-	-	C3(Carbamidomethyl)
SHcIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK	4	-	-	C3(Carbamidomethyl)
TcVADESHAGcEkSLHTLFGDELcK	4	-	-	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl); K13(Xlink); C24(Carbamidomethyl)

8.13 Zu Kapitel 4.5.1 BBSome-Komplex

Tabelle 8-21: Detaillierte Ergebnisse der identifizierten Cross-Links im BBSome-Komplex mit 50-fachem molarem Überschuss von BS^3-$d_{0/4}$ von zwei Versuchen mit jeweils zwei MS-Messungen (Replikat 1.1-2.2). ppm = Massenabweichung, MS1 = Vorhandensein des Isotopenmusters von BS^3-$d_{0/4}$.

				Versuch 1						Versuch 2					
				Replikat 1.1			Replikat 1.2			Replikat 2.1			Replikat 2.2		
Protein 1	AA1	Protein 2	AA2	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1
BBS1	195	BBS4	29	-	-	-	4.48E-03	0.83	ja	-	-	-	1.36E-05	-2.22	ja
BBS1	195	BBS4	34	1.44E-03	0.63	ja	3.64E-05	-1.33	ja	-	-	-	-	-	-
BBS1	565	BBS9	454	-	-	-	-	-	-	4.41E-04	-0.64	ja	2.76E-05	-0.52	ja
BBS8	482	BBS9	393	3.15E-05	-0.35	ja	4.22E-05	1.19	ja	8.03E-06	0.90	ja	3.23E-06	-0.17	ja
BBS8	482	BBS9	397	2.96E-03	2.03	ja	-	-	-	2.09E-03	-0.98	ja	3.03E-04	-3.62	ja
BBS1	53	BBS1	72	-	-	-	-	-	-	1.31E-03	2.42	ja	1.49E-02	7.15	ja
BBS4	29	BBS4	34	6.71E-03	0.73	ja	3.49E-04	0.59	ja	3.12E-03	0.90	ja	6.65E-04	-0.28	ja
BBS5	135	BBS5	141	1.88E-04	-1.11	ja	2.37E-03	-0.74	ja	-	-	-	7.34E-05	0.86	ja
BBS9	786	BBS9	810	3.81E-03	-1.16	ja	1.14E-04	-1.51	ja	2.69E-05	0.74	ja	7.35E-07	-2.19	ja

Tabelle 8-22: Detaillierte Ergebnisse der identifizierten Cross-Links im BBSome-Komplex mit 100-fachem molarem Überschuss von BS^3-$d_{0/4}$ von zwei Versuchen mit jeweils zwei MS-Messungen (Replikat 1.1-2.2). ppm = Massenabweichung, MS1 = Vorhandensein des Isotopenmusters von BS^3-$d_{0/4}$. Replikat 1.2 fehlt hier aufgrund von Messfehlern.

				Versuch 1						Versuch 1					
				Replikat 1.1			Replikat 1.2			Replikat 2.1			Replikat 2.2		
Protein 1	**AA1**	**Protein 2**	**AA2**	**Score**	**ppm**	**MS1**	-	-	-	**Score**	**ppm**	**MS1**	**Score**	**ppm**	**MS1**
BBS1	195	BBS4	29	5.36E-04	-0.56	ja	-	-	-	-	-	-	5.70E-04	-0.25	ja
BBS5	87	BBS9	454	-	-	-	-	-	-	4.78E-06	-1.23	ja	4.85E-06	-0.79	ja
BBS8	482	BBS9	393	2.87E-06	0.51	ja	-	-	-	4.44E-05	-1.72	ja	1.50E-05	-1.90	ja
BBS8	482	BBS9	397	-	-	-	-	-	-	3.99E-05	1.92	ja	4.01E-03	-1.44	ja
BBS8	482	BBS18	1	1.58E-05	1.54	ja	-	-	-	2.04E-04	1.18	ja	-	-	-
BBS4	29	BBS4	34	-	-	-	-	-	-	2.38E-05	-0.14	ja	4.40E-05	0.30	ja
BBS5	135	BBS5	141	-	-	-	-	-	-	5.54E-04	-1.53	ja	3.80E-05	2.07	ja
BBS5	135	BBS5	150	-	-	-	-	-	-	2.60E-04	-0.02	ja	2.17E-05	0.21	ja
BBS9	786	BBS9	810	8.17E-06	-1.67	ja	-	-	-	-	-	-	1.09E-05	0.24	ja

Tabelle 8-23: Detaillierte Ergebnisse der identifizierten Cross-Links im BBSome-Komplex mit 50-fachem molarem Überschuss von $BS^2G\text{-}d_{0/4}$ von zwei Versuchen mit jeweils zwei MS-Messungen (Replikat 1.1-2.2). ppm = Massenabweichung, MS1 = Vorhandensein des Isotopenmusters von $BS^2G\text{-}d_{0/4}$.

				VERSUCH 1						VERSUCH 2					
				Replikat 1.1			Replikat 1.2			Replikat 2.1			Replikat 2.2		
Protein1	**AA1**	**Protein2**	**AA2**	**Score**	**ppm**	**MS1**	**Score**	**ppm**	**MS1**	Score	ppm	MS1	**Score**	**ppm**	**MS1**
BBS1	1	BBS5	135	-	-	-	1.41E-05	3.82	ja	4.49E-05	-2.81	ja	-	-	-
BBS1	565	BBS9	454	1.68E-05	-0.93	ja	6.56E-07	2.85	ja	-	-	-	-	-	-
BBS8	482	BBS9	393	2.22E-06	0.83	ja	3.05E-05	0.35	ja	-	-	-	1.93E-04	-3.63	ja
BBS8	482	BBS9	397	1.15E-06	-1.89	ja	5.69E-07	1.14	ja	-	-	-	-	-	-
BBS9	2	BBS18	21	-	-	-	-	-	-	3.09E-04	-5.97	ja	8.31E-05	-3.13	ja
BBS5	135	BBS5	141	-	-	-	3.14E-03	1.04	ja	4.42E-04	-0.59	ja	1.03E-04	-0.12	ja
BBS9	542	BBS9	594	1.18E-02	1.98	ja	2.52E-03	1.88	ja	-	-	-	-	-	-
BBS9	786	BBS9	810	2.47E-06	-1.53	ja	4.61E-05	1.03	ja	-	-	-	-	-	-
BBS18	1	BBS18	10	-	-	-	7.82E-05	2.18	ja	-	-	-	1.31E-04	2.73	ja

Tabelle 8-24: Detaillierte Ergebnisse der identifizierten Cross-Links im BBSome-Komplex mit 100-fachem molarem Überschuss von $BS^2G\text{-}d_{0/4}$ von zwei Versuchen mit jeweils zwei MS-Messungen (Replikat 1.1-2.2). ppm = Massenabweichung, MS1 = Vorhandensein des Isotopenmusters von $BS^2G\text{-}d_{0/4}$.

				VERSUCH 1						VERSUCH 2					
				Replikat 1.1			Replikat 1.2			Replikat 2.1			Replikat 2.2		
Protein1	AA1	Protein2	AA2	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1	Score	ppm	MS1
BBS1	195	BBS4	34	2.84E-04	-0.83	ja	-	-	-	-	-	-	6.62E-04	1.34	ja
BBS1	565	BBS9	454	4.33E-06	5.57	ja	9.68E-07	3.43	ja	-	-	-	-	-	-
BBS8	482	BBS9	393	1.30E-04	0.34	ja	-	-	-	-	-	-	1.89E-06	1.72	ja
BBS8	482	BBS9	397	1.87E-05	0.33	ja	-	-	-	-	-	-	5.05E-06	-3.40	ja
BBS9	2	BBS18	21	-	-	-	-	-	-	7.66E-05	-2.97	ja	4.39E-04	-2.57	ja
BBS4	29	BBS4	34	-	-	-	7.63E-04	1.23	ja	5.83E-03	0.08	ja	-	-	-
BBS4	29	BBS4	195	-	-	-	5.69E-04	0.23	ja	8.87E-03	0.01	ja	-	-	-
BBS4	29	BBS4	55	1.43E-04	-2.54	ja	-	-	-	-	-	-	6.10E-05	-1.39	ja
BBS5	135	BBS5	141	4.60E-05	0.31	ja	-	-	-	1.97E-03	-0.36	ja	3.58E-05	0.03	ja
BBS9	786	BBS9	810	2.81E-06	0.94	ja	9.91E-04	1.44	ja	-	-	-	9.95E-03	-0.69	ja
BBS9	789	BBS9	810	2.28E-07	-2.41	ja	1.16E-02	1.41	ja	-	-	-	-	-	-

8.14 Zu Kapitel 4.6.1 Herstellung von synthetischen Cross-Link Peptiden

Tabelle 8-25: Peptidnummern (ID) und Peptid-Sequenzen der synthetischen Cross-Link Peptide (Ausgangspeptide) mit den Ergebnissen der Loop-Links vor Trypsin-Verdau und der Cross-Links und Mono-Links nach Trypsin-Verdau. ppm = Massenabweichung. manuell = Cross-Link wurde nicht von pLink, sondern manuell identifiziert. Rot markierte Peptide sind nach der Loop-Link Reaktion verloren gegangen. Der Median der Scores der Loop-Links ist blau markiert. Peptide, die für den 20-Peptid-Standard ausgewählt wurden, sind grau markiert.

		Vor Verdau		Nach Verdau		
		Loop-Link		Cross-Link		Mono-
ID	Sequence	Score	ppm	Score	ppm	Link
160802B01	ARHETKDSRYDKVQPR	7.67E-13	0.65	3.52E-02	0.37	ja
160222G08	ARVPLDKSVRFQKQEQR	1.26E-12	1.35	4.62E-05	0.20	ja
160222F06	ARIQNKQERFIKAQSAR	5.81E-12	1.23	9.07E-05	-2.09	ja
160222B07	ARYDILKAQRGYKGGSR	1.33E-11	0.67	1.59E-04	0.35	ja
160222C10	ARQIVYKFSRNPKVPTR	1.54E-11	-0.43	7.78E-05	-6.76	ja
160222A11	ARSFITKNLRFPKPDHR	1.64E-11	2.06	1.19E-03	-0.17	ja
160222D03	ARQNPKIDRNDKEQLHR	1.77E-11	0.81	-	-	ja
160222G07	ARYPAKSVREDKVPLR	1.15E-10	-0.60	manuell	-	-
160802H01	ARSHDKAERSIKQIQR	1.88E-10	1.68	2.36E-04	-0.62	ja
160222D11	ARLIDKDDREFKPLYR	1.90E-10	0.33	1.91E-02	0.33	ja
160222A08	ARQSIKGARVIKSLSGR	4.37E-10	-1.59	1.17E-02	-0.89	ja
160222D01	AREHEKQDRETKGHDDR	4.79E-10	-0.42	-	-	ja
160222C12	ARLVVKYDRFIKTNVR	5.45E-10	-1.39	3.30E-03	0.40	ja
160222B09	ARYTDKVSGREAKLLPR	9.79E-10	-2.72	1.89E-05	-0.69	ja
160222G09	ARAHSKEFRFWKGGPHR	1.24E-09	-1.99	-	-	nein
160222C04	ARNDPKEFRSGKGVDTR	1.63E-09	-1.43	1.22E-05	1.87	ja
160222A10	ARQPLKNVRYGKNWTER	1.66E-09	-0.24	-	-	ja
160802A01	ARYQEGKVSRENKDAHR	1.78E-09	-0.78	3.36E-03	0.16	ja
160222A03	ARTENKTERLNKPTAR	1.79E-09	-0.83	1.82E-04	-0.18	ja
160222B06	ARHINKDERVDKVHFTR	1.89E-09	-1.32	-	-	ja
160222H07	ARIDYKGARSYKSTLR	2.53E-09	0.51	3.77E-05	-0.87	ja
160222F08	ARSITKPARNKSFLER	2.54E-09	-1.37	7.51E-06	-0.32	ja
160222C09	ARVAGKVLREGKSIAVR	3.09E-09	-1.51	1.37E-05	1.61	ja
160222G12	ARELLKLDRIQKILQSR	4.41E-09	-3.15	6.09E-05	0.29	ja
160222E07	ARAGIKVDRNVKQVFHR	5.21E-09	-1.63	6.97E-02	-0.18	ja
160222A09	ARISIKDPRLQKYDER	1.08E-08	-6.72	2.60E-04	0.10	ja
160222D07	ARTSIKSDRIFKNETR	1.11E-08	-0.10	5.40E-06	-0.55	ja
160222B12	ARVIALKLPRGPKLVGR	1.12E-08	0.87	4.50E-04	1.31	ja
160222F09	ARSVSVKLPRYQKDGLR	1.19E-08	-0.34	7.22E-04	0.16	ja

Fortsetzung Tabelle 8-25

		Vor Verdau		Nach Verdau		
		Loop-Link		Cross-Link		Mono-
ID	Sequence	Score	ppm	Score	ppm	Link
160222F04	AREHNKDVRSAKVFTR	1.22E-08	-3.04	9.56E-02	-0.39	ja
160222H11	ARFSGKDIFRGYKQTFR	1.34E-08	-3.06	2.54E-06	-0.71	ja
160222A05	ARGQFAKDQRVKHPYR	1.35E-08	-0.57	8.26E-04	-1.01	ja
160222C03	ARSDSKNTIRDSKIPQR	1.80E-08	-0.62	1.46E-03	-0.15	ja
160222D05	ARGETKFVRQEKDGVR	1.99E-08	0.44	manuell		ja
160222H08	ARDQTKGERIGKWPIR	2.05E-08	-0.76	1.46E-04	0.38	ja
160222D10	ARQNTKLLDRDLKDEIR	3.65E-08	0.77	1.71E-03	0.93	ja
160222H04	ARHYIKNIRLHKNQTNR	3.73E-08	-3.30	-	-	ja
160222H05	ARHFYGKESRNGKGFER	4.37E-08	-2.02	-	-	ja
160222C07	ARTNIIKDPRVYKPGNR	4.55E-08	-0.37	1.64E-04	0.99	ja
160222F03	ARINFKHRAGKHEEER	5.57E-08	-0.03	-	-	ja
160222B01	ARNDDKTNRSHKNEHSR	5.85E-08	-2.76	2.95E-03	-3.22	ja
160222G03	ARSETKDPRFAKHETR	7.15E-08	-2.04	-	-	ja
160802C01	ARNSQKEERDAKHDLR	8.65E-08	-1.40	8.27E-04	0.05	ja
160222E01	ARVSQKQDRGDKNSANR	9.45E-08	0.39	3.58E-05	0.70	ja
160222B04	ARDVTKIARSAKDVGR	1.13E-07	-1.95	4.55E-05	-1.26	ja
160222H06	ARNSIKNVRSQKWGVR	1.13E-07	-0.01	2.64E-03	0.64	ja
160222E04	ARDAHKTNRILKNYER	1.20E-07	-2.95	-	-	ja
160222F10	ARAPIKFFRGVKNEQR	1.21E-07	-0.05	1.85E-05	-0.41	ja
160222B05	ARLDGKNFRHSKNEYR	1.30E-07	-0.87	2.27E-02	-0.28	ja
160222E10	ARTPAEKFTRVAKNFDR	1.36E-07	-0.17	4.15E-05	-1.27	ja
160222D12	ARLNHKNFRLWKPIPR	1.52E-07	-0.09	-	-	ja
160222E09	ARDFAKPHRLVKQHLR	1.56E-07	-0.07	1.38E-03	-1.08	ja
160222G11	ARAPTKFIRISKFQDR	1.58E-07	0.95	3.21E-05	-0.13	ja
160222H10	ARQFQKFVRDTKWPSR	3.12E-07	-0.12	manuell	-	-
160802G01	ARYPTKGSREAKPHER	3.51E-07	-2.23	-	-	ja
160222D04	ARAVKIERSDKNGLHR	3.93E-07	-1.67	-	-	ja
160802D01	ARHSEKANFRQTKEHPR	5.02E-07	-4.09	-	-	ja
160222G05	ARNLQKLDHRGNKEFTR	6.61E-07	-1.59	2.49E-03	-0.57	ja
160222C01	ARDPNKTNRSHKDNSR	6.91E-07	-0.13	7.26E-06	-0.41	ja
160222F05	ARISYGKTDRIPKSSTR	9.56E-07	0.59	4.96E-04	-0.35	ja
160222H03	ARTLHHKEARGEKNFER	1.07E-06	-1.10	-	-	ja
160222D09	ARYQNSKQSRAFKFHYR	1.09E-06	0.69	-	-	nein
160222G10	ARLNNKYIGRYVKYVR	1.45E-06	0.52	2.37E-05	-0.89	ja
160222F01	ARQSEKDPRDPKEDQR	1.78E-06	-3.00	1.35E-04	-4.14	ja

Fortsetzung Tabelle 8-25

		Vor Verdau		Nach Verdau		
		Loop-Link		Cross-Link		Mono-Link
ID	Sequence	Score	ppm	Score	ppm	
160222A06	ARHLIKEYRTSKDHVVR	2.05E-06	-0.47	-	-	ja
160222G04	ARFEIKVTRHDKSHQR	2.05E-06	-0.34	-	-	ja
160222C08	ARHPVKAFREVKGDIR	2.10E-06	-0.25	-	-	ja
160222C05	AREYVKNHRIYKQYGSR	2.80E-06	-0.21	-	-	ja
160222F11	ARLVFFKHERLTKPQHR	2.82E-06	0.11	-	-	ja
160222E12	ARFNHKAIRLFKLTVR	3.04E-06	-0.41	2.01E-04	-0.01	ja
160222D08	ARDFHKSDRILKGYAR	3.99E-06	0.70	-	-	ja
160222B10	ARTSLFKAQRNVKNFNR	6.04E-06	0.87	1.20E-05	-3.76	ja
160222E06	ARYNISKYLRHQKDTR	6.25E-06	-1.24	3.15E-03	1.15	ja
160222E03	ARYSTKNNRLHKHLDR	7.37E-06	-2.25	-	-	ja
160222A01	ARETKHNRSHKTHGNR	1.05E-05	-0.51	-	-	ja
160222A04	ARGPLTKHSREEKQEYR	1.21E-05	-0.30	-	-	ja
160222G01	ARQTNKHEDRYSKHTVR	1.74E-05	-2.19	-	-	ja
160222H09	ARNPIVKDHRHFKIGIR	2.25E-05	-0.52	-	-	ja
160222B08	ARLDEEKYDRELKHIHR	2.49E-05	-0.88	-	-	ja
160222E05	ARFDAKYHRQLKQNGR	2.72E-05	-1.71	-	-	ja
160802E01	ARQAGKHLRQIKTGHR	3.62E-05	-2.84	-	-	ja
160222E08	ARIHQKVDRYIKGIDDR	3.96E-05	-0.09	7.95E-05	0.04	ja
160222H01	ARNSTKNPRGVKHQYR	5.13E-05	-1.29	-	-	ja
160802F01	AREQYKGHFRQGKSTNR	6.99E-05	-0.55	-	-	ja
160222B03	ARYSSHKSVRSGKVYQR	8.35E-05	-1.03	-	-	ja
160222D06	ARLTFKIGERSNKTHHR	8.63E-05	-2.52	-	-	ja
160222A07	ARHPEKFQRLQKYHPR	1.13E-04	-1.30	-	-	ja
160222F12	ARSILKIHRVAKPWELR	1.23E-04	-1.34	1.76E-01	0.36	ja
160222B11	ARSQENKHIRTVKFLLR	1.31E-04	-5.51	-	-	ja
160222C11	ARWEVKGYRHDKFSLR	1.67E-04	-8.39	-	-	ja
160222F07	ARVPTKHARAHKPPLFR	8.37E-04	0.61	-	-	ja
160222A12	ARWGFKYHRGHKGNFFR			-	-	

8.15 Zu Kapitel 4.6.2 Untersuchung der optimalen Fragmentierung für Cross-Link Peptide

Tabelle 8-26: Ergebnisse des Fragmentierungstests mit 20 synthetischen Cross-Link Peptiden. Jeweils zwei Replikate mit drei Fragmentierungsmethoden wurden verglichen: HCD in der Orbitrap, CID in der Orbitrap und CID in der Ionenfalle. ppm = Massenabweichung

		HCD Orbitrap				CID Orbitrap				CID Ionenfalle			
		Replikat 1		Replikat 2		Replikat 1		Replikat 2		Replikat 1		Replikat 2	
#	Peptid ID	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm	Score	ppm
1	160222B09	1.06E-08	-0.98	3.14E-10	0.17	2.89E-08	0.36	2.60E-07	1.29	-	-	5.44E-05	-0.12
2	160222C04	3.18E-08	-0.1	8.51E-08	0.39	5.47E-03	-0.38	2.34E-07	-0.88	-	-	3.44E-02	0.83
3	160222B10	4.51E-08	0.03	3.51E-03	-0.25	9.59E-04	-0.26	5.08E-04	0.02	-	-	6.88E-04	0.11
4	160222E01	1.10E-07	2.17	2.47E-08	1.68	1.26E-05	-2.93	2.38E-05	-1.0	1.13E-03	3.16	1.88E-04	3.06
5	160222B04	6.20E-07	2.22	1.00E-07	0.91	1.22E-08	0.38	1.86E-08	3.1	8.89E-05	3.1		
6	160222H07	2.14E-06	0.03	7.57E-05	-0.06	2.04E-04	0.23	4.27E-04	0.83	6.05E-04	0.53	1.34E-03	0.23
7	160222F10	8.23E-06	0.10	4.07E-03	-0.71	2.27E-03	-0.01	3.23E-05	0.48	-	-	-	-
8	160222C09	3.16E-05	0.24	4.46E-05	-0.92	5.77E-08	0.24	9.45E-10	0.75	-	-	-	-
9	160222C10	3.54E-05	-1.06	-	-	-	-	8.85E-04	0.95	-	-	-	-
10	160222E10	6.48E-05	0.13	9.37E-07	0,.23	9.96E-04	-0.71	3.58E-03	1.27	-	-	-	-
11	160222F08	1.29E-04	0.22	1.31E-03	0.03	4.04E-04	-0.07	6.20E-04	0.64	-	-	7.62E-05	0.16
12	160222G11	2.39E-04	0.74	2.73E-03	0.26	8.20E-03	0.46	3.45E-05	0.53	1.97E-03	1.14	-	-
13	160222G08	3.26E-04	0.75	2.89E-03	-0.05	1.93E-03	0.11	5.62E-04	0.39	-	-	3.34E-04	-0.34
14	160222H11	6.39E-04	-0.37	9.57E-03	0.09	6.83E-04	1.55	2.58E-05	0.63	-	-	-	-
15	160222G12	1.64E-03	0.96	7.96E-06	-0.22	2.67E-05	0.03	7.16E-05	1.3	-	-	-	-
16	160222D07	2.70E-03	0.84	3.67E-03	-0.33	7.48E-04	-0.75	2.51E-04	0.44	4.47E-04	0.74	2.82E-05	1.03
17	160222A05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	160222C01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	160222E08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	160222G10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		16		15		15		16		5		8	

8.16 FASTA-Dateien

8.16.1 Bovines Serum Albumin

>4F5S:A|BSA

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCE
KSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTLCDE
FKADEKKFWGKYLYEIARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMRE
KVLTSSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGD
LLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDK
DVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAKDDPHACYSTVFD
KLKHLVDEPQNLIKQNCDQFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRC
CTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKA
FDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADD
KEACFAVEGPKLVVSTQTALA

8.16.2 IbpA und Cdc42

>IbpA 3483-3797 I3755C Q06277

GHMETANKVNYQDLEDNLNLKGLISLEDDRNANFESNVLKNEKFLDEAREISKKSIPEATVK
QMSHLPEFDDILTEGAKKVESRINKAITFRPSVEEFSEIQDLVKTLPKTKVIEDLSTKTNEITEAL
AATSKTIQRTPELKEQLKTAIEDFLQNSQGKPLTVQMIENLNHGLRPDEGEGRLLYKKENLTK
ENAVFSSPEAAKIQLAETVDFINRAKNEGIEPSVVGALVYQRLIAYHPFAEGNGRMARVIVNKI
LLDAGYPAFTKFSDEFEPQICPQTKASTKSATSSEVVVEFLKELAKKGSKEDNEQNLEKTDRT

>Cdc42 Q2KJ93

GAMAMQTIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNKFPSEYVPTVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLFDT
AGLEDYDRLRPLSYPQTDVFLVCFSVVSPSSFENVKEKWVPEITHHCPKTPFLLVGTQIDLRDD
PSTIEKLAKNKQKPITPETAEKLARDLKAVKYVECSALTQKGLKNVFDEAILAALEPPEPKKSR
RCVLL

8.16.3 BBSome-Komplex

>sp|Q96RK4|BBS4_HUMAN Bardet-Biedl syndrome 4 protein OS=Homo sapiens GN=BBS4 PE=1 SV=2

MHHHHHHGPMAEERVATRTQFPVSTESQKPRQKKAPEFPILEKQNWLIHLHYIRKDYEACKA
VIKEQLQETQGLCEYAIYVQALIFRLEGNIQESLELFQTCAVLSPQSADNLKQVARSLFLLGKH
KAAIEVYNEAAKLNQKDWEISHNLGVCYIYLKQFNKAQDQLHNALNLNRHDLTYIMLGKIH
LLEGDLDKAIEVYKKAVEFSPENTELLTTLGLLYLQLGIYQKAFEHLGNALTYDPTNYKAILA
AGSMMQTHGDFDVALTKYRVVACAVPESPPLWNNIGMCFFGKKKYVAAISCLKRANYLAPF
DWKILYNLGLVHLTMQQYASAFHFLSAAINFQPKMGELYMLLAVALTNLEDIENAKRAYAE
AVHLDKCNPLVNLNYAVLLYNQGEKKNALAQYQEMEKKVSLLKDNSSLEFDSEMVEMAQK
LGAALQVGEALVWTKPVKDPKSKHQTTSTSKPASFQQPLGSNQALGQAMSSAAAYRTLPSG
AGGTSQFTKPPSLPLEPEPAVESSPTETSEQIREK

>sp|Q8NFJ9|BBS1_HUMAN Bardet-Biedl syndrome 1 protein OS=Homo sapiens GN=BBS1 PE=1 SV=1

MAAASSSDSDACGAESNEANSKWLDAHYDPMANIHTFSACLALADLHGDGEYKLVVGDLG
PGGQQPRLKVLKGPLVMTESPLPALPAAAATFLMEQHEPRTPALALASGPCVYVYKNLRPYF
KFSLPQLPPNPLEQDLWNQAKEDRIDPLTLKEMLESIRETAEEPLSIQSLRFLQLELSEMEAFVN
QHKSNSIKRQTVITTMTTLKKNLADEDAVSCLVLGTENKELLVLDPEAFTILAKMSLPSVPVF
LEVSGQFDVEFRLAAACRNGNIYILRRDSKHPKYCIELSAQPVGLIRVHKVLVVGSTQDSLHG
FTHKGKKLWTVQMPAAILTMNLLEQHSRGLQAVMAGLANGEVRIYRDKALLNVIHTPDAVT
SLCFGRYGREDNTLIMTTRGGGLIIKILKRTAVFVEGGSEVGPPPAQAMKLNVPRKTRLYVDQ
TLREREAGTAMHRAFQTDLYLLRLRAARAYLQALESSLSPLSTTAREPLKLHAVVQGLGPTF
KLTLHLQNTSTTRPVLGLLVCFLYNEALYSLPRAFFKVPLLVPGLNYPLETFVESLSNKGISDII
KVLVLREGQSAPLLSAHVNMPGSEGLAAA

>sp|Q3SYG4|BBS9_PTHB1_HUMAN Protein PTHB1 OS=Homo sapiens GN=BBS9 PE=1 SV=1

MSLFKARDWWSTILGDKEEFDQGCLCLANVDNSGNGQDKIIVGSFMGYLRIFSPHPAKTGDG
AQAEDLLLEVDLRDPVLQVEVGKFVSGTEMLHLAVLHSRKLCVYSVSGTLGNVEHGNQCQ
MKLMYEHNLQRTACNMTYGSFGGVKGRDLICIQSMDGMLMVFEQESYAFGRFLPGFLLPGP
LAYSSRTDSFLTVSSCQQVESYKYQVLAFATDADKRQETEQQKLGSGKRLVVDWTLNIGEQA
LDICIVSFNQSASSVFVLGERNFFCLKDNGQIRFMKKLDWSPSCFLPYCSVSEGTINTLIGNHN
NMLHIYQDVTLKWATQLPHIPVAVRVGCLHDLKGVIVTLSDDGHLQCSYLGTDPSLFQAPNV
QSRELNYDELDVEMKELQKIIKDVNKSQGVWPMTEREDDLNVSVVVSPNFDSVSQATDVEV
GTDLVPSVTVKVTLQNRVILQKAKLSVYVQPPLELTCDQFTFEFMTPDLTRTVSFSVYLKRSY
TPSELEGNAVVSYSRPTDRNPDGIPRVIQCKFRLPLKLICLPGQPSKTASHKITIDTNKSPVSLLS
LFPGFASQSDDDQVNVMGFHFLGGARITVLASKTSQRYRIQSEQFEDLWLITNELILRLQEYFE
KQGVKDFACSFSGSIPLQEYFELIDHHFELRINGEKLEELLSERAVQFRAIQRRLLARFKDKTPA
PLQHLDTLLDGTYKQVIALADAVEENQGNLFQSFTRLKSATHLVILLIALWQKLSADQVAILE
AAFLPLQEDTQELGWEETVDAAISHLLKTCLSKSSKEQALNLNSQLNIPKDTSQLKKHITLLCD
RLSKGGRLCLSTDAAAPQTMVMPGGCTTIPESDLEERSVEQDSTELFTNHRHLTAETPRPEVS
PLQGVSE

>sp|Q4R649|BBS5_MACFA Bardet-Biedl syndrome 5 protein homolog OS=Macaca fascicularis GN=BBS5 PE=2 SV=2

MSVLDALWEDRDVRFDLSSQQMKTRPGEVLIDCLDSIEDTKGNNGDRGRLLVTNLRILWHSL
ALSRVNVSVGYNCILNITTRTANSKLRGQTEALYILTKCNSTRFEFIFTNLVPGSPRLFTSVMA
VHRAYETSKMYRDFKLRSALIQNKQLRLLPQEHVYDKINGVWNLSSDQGNLGTFFITNVRIV
WHANMNDSFNVSIPYLQIRSIKIRDSKFGLALVIESSQQSGGYVLGFKIDPVEKLQESVKEINSL
HKVYSASPIFGVDYEMEEKPQPLEALTVEQIQDDVEIDSDDHTDAFVAYFADGNKQQDREPV
FSEELGLAIEKLKDGFTLQGLWEVMS

>sp|A8MTZ0|BBS18_BBIP1_HUMAN BBSome-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=BBIP1 PE=1 SV=2

GPKRAEFMLKAAAKRPELSGKNTISNNSDMAEVKSMFREVLPKQGPLFVEDIMTMVLCKPKL
LPLKSLTLEKLEKMHQAAQNTIRQQEMAEKDQRQITH

>sp|Q8TAM2|BBS8_TTC8_HUMAN Tetratricopeptide repeat protein 8 OS=Homo sapiens GN=TTC8 PE=1 SV=2

MDYKDDDDKAGPMSSEMEPLLLAWSYFRRRKFQLCADLCTQMLEKSPYDQEPDPELPVHQA
AWILKARALTEMVYIDEIDVDQEGIAEMMLDENAIAQVPRPGTSLKLPGTNQTGGPSQAVRPI
TQAGRPITGFLRPSTQSGRPGTMEQAIRTPRTAYTARPITSSSGRFVRLGTASMLTSPDGPFINL
SRLNLTKYSQKPKLAKALFEYIFHHENDVKTIHLEDVVLHLGIYPFLLRNKNHIEKNALDLAA
LSTEHSQYKDWWWKVQIGKCYYRLGMYREAEKQFKSALKQQEMVDTFLYLAKVYVSLDQ
PVTALNLFKQGLDKFPGEVTLLCGIARIYEEMNNMSSAAEYYKEVLKQDNTHVEAIACIGSN
HFYSDQPEIALRFYRRLLQMGIYNGQLFNNLGLCCFYAQQYDMTLTSFERALSLAENEEEAA
DVWYNLGHVAVGIGDTNLAHQCFRLALVNNNNHAEAYNNLAVLEMRKGHVEQARALLQT
ASSLAPHMYEPHFNFATISDKIGDLQRSYVAAQKSEAAFPDHVDTQHLIKQLRQHFAML

8.16.4 Synthetische Cross-Link Peptide

>Peptide160802E01
ARQAGKHLRQIKTGHR
>Peptide160222E03
ARYSTKNNRLHKHLDR
>Peptide160222E04
ARDAHKTNRILKNYER
>Peptide160222E05
ARFDAKYHRQLKQNGR
>Peptide160222E06
ARYNISKYLRHQKDTR
>Peptide160222E07
ARAGIKVDRNVKQVFHR
>Peptide160222E08
ARIHQKVDRYIKGIDDR
>Peptide160222E09
ARDFAKPHRLVKQHLR
>Peptide160222E10
ARTPAEKFTRVAKNFDR
>Peptide160222E11
ARNHNKQVFRVWKTIYR
>Peptide160222E12
ARFNHKAIRLFKLTVR
>Peptide160222A01
ARETKHNRSHKTHGNR
>Peptide160222A03
ARTENKTERLNKPTAR
>Peptide160222A04
ARGPLTKHSREEKQEYR
>Peptide160222A05
>Peptide160222D03
ARQNPKIDRNDKEQLHR
>Peptide160222D04
ARAVKIERSDKNGLHR
>Peptide160222D05
ARGETKFVRQEKDGVR
>Peptide160222D06
ARLTFKIGERSNKTHHR
>Peptide160222D07
ARTSIKSDRIFKNETR
>Peptide160222D08
ARDFHKSDRILKGYAR
>Peptide160222D09
ARYQNSKQSRAFKFHYR
>Peptide160222D10
ARQNTKLLDRDLKDEIR
>Peptide160222D11
ARLIDKDDREFKPLYR
>Peptide160222D12
ARLNHKNFRLWKPIPR
>Peptide160222F01
ARQSEKDPRDPKEDQR
>Peptide160222F03
ARINFKHRAGKHEEER
>Peptide160222F04
AREHNKDVRSAKVFTR
>Peptide160222F05
ARISYGKTDRIPKSSTR
>Peptide160222F06

ARGQFAKDQRVKHPYR
>Peptide160222A06
ARHLIKEYRTSKDHVVR
>Peptide160222A07
ARHPEKFQRLQKYHPR
>Peptide160222A08
ARQSIKGARVIKSLSGR
>Peptide160222A09
ARISIKDPRLQKYDER
>Peptide160222A10
ARQPLKNVRYGKNWTER
>Peptide160222A11
ARSFITKNLRFPKPDHR
>Peptide160222A12
ARWGFKYHRGHKGNFFR
>Peptide160222B01
ARNDDKTNRSHKNEHSR
>Peptide160222B03
ARYSSHKSVRSGKVYQR
>Peptide160222B04
ARDVTKIARSAKDVGR
>Peptide160222B05
ARLDGKNFRHSKNEYR
>Peptide160222B06
ARHINKDERVDKVHFTR
>Peptide160222B07
ARYDILKAQRGYKGGSR
>Peptide160222B08
ARLDEEKYDRELKHIHR
>Peptide160222B09
ARYTDKVSGREAKLLPR
>Peptide160222B10
ARTSLFKAQRNVKNFNR
>Peptide160222B11
ARSQENKHIRTVKFLLR
>Peptide160222B12
ARVIALKLPRGPKLVGR
>Peptide160222C01
ARDPNKTNRSHKDNSR
>Peptide160222C03
ARSDSKNTIRDSKIPQR
>Peptide160222C04
ARNDPKEFRSGKGVDTR
>Peptide160222C05
AREYVKNHRIYKQYGSR
>Peptide160222C06
ARSEDHKAFRGTKLISR
>Peptide160222C07
ARTNIIKDPRVYKPGNR
>Peptide160222C08
ARHPVKAFREVKGDIR
ARIQNKQERFIKAQSAR
>Peptide160222F07
ARVPTKHARAHKPPLFR
>Peptide160222F08
ARSITKPARNKSFLER
>Peptide160222F09
ARSVSVKLPRYQKDGLR
>Peptide160222F10
ARAPIKFFRGVKNEQR
>Peptide160222F11
ARLVFFKHERLTKPQHR
>Peptide160222F12
ARSILKIHRVAKPWELR
>Peptide160222G01
ARQTNKHEDRYSKHTVR
>Peptide160222G03
ARSETKDPRFAKHETR
>Peptide160222G04
ARFEIKVTRHDKSHQR
>Peptide160222G05
ARNLQKLDHRGNKEFTR
>Peptide160222G06
ARFQTKAPRSIKHIGR
>Peptide160222G07
ARYPAKSVREDKVPLR
>Peptide160222G08
ARVPLDKSVRFQKQEQR
>Peptide160222G09
ARAHSKEFRFWKGGPHR
>Peptide160222G10
ARLNNKYIGRYVKYVR
>Peptide160222G11
ARAPTKFIRISKFQDR
>Peptide160222G12
ARELLKLDRIQKILQSR
>Peptide160222H01
ARNSTKNPRGVKHQYR
>Peptide160222H03
ARTLHHKEARGEKNFER
>Peptide160222H04
ARHYIKNIRLHKNQTNR
>Peptide160222H05
ARHFYGKESRNGKGFER
>Peptide160222H06
ARNSIKNVRSQKWGVR
>Peptide160222H07
ARIDYKGARSYKSTLR
>Peptide160222H08
ARDQTKGERIGKWPIR
>Peptide160222H09
ARNPIVKDHRHFKIGIR

>Peptide160222C09
ARVAGKVLREGKSIAVR
>Peptide160222C10
ARQIVYKFSRNPKVPTR
>Peptide160222C11
ARWEVKGYRHDKFSLR
>Peptide160222C12
ARLVVKYDRFIKTNVR
>Peptide160222D01
AREHEKQDRETKGHDDR
>Peptide160802F01
AREQYKGHFRQGKSTNR
>Peptide160802G01
ARYPTKGSREAKPHER
>Peptide160222H10
ARQFQKFVRDTKWPSR
>Peptide160222H11
ARFSGKDIFRGYKQTFR
>Peptide160802A01
ARYQEGKVSRENKDAHR
>Peptide160802B01
ARHETKDSRYDKVQPR
>Peptide160802C01
ARNSQKEERDAKHDLR
>Peptide160802D01
ARHSEKANFRQTKEHPR
>Peptide160802H01
ARSHDKAERSIKQIQR

8.17 Lebenslauf

Verena Tinnefeld, geb. Eck am 20.08.1987 in Ludwigshafen am Rhein

Mendelssohnstr. 12, 70619 Stuttgart – tinnefeld.verena@gmail.com

Berufserfahrung

10/2016 – heute	GLP-Prüfleiterin bei Eurofins Agroscience Services, Niefern-Öschelbronn

Studium

03/2013 – 08/2016	Doktorarbeit „Methodenentwicklung zur Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen mittels Cross-Linking und Massenspektrometrie" am Leibniz-Institut für analytische Wissenschaften ISAS e.V. / Fachbereich Bio- und Chemieingenieurwesen TU Dortmund
06/2012 – 01/2013	Diplomarbeit "Verbesserung der Pyrolyse-GC/MS" am Kriminaltechnischen Institut des Bundeskriminalamts, Wiesbaden
04/2007 – 01/2013	Diplom Biomedizinische Chemie, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz Schwerpunk: Analytische Chemie

Schule

08/1998 – 03/2007	Abitur am Edith-Stein-Gymnasium, Speyer Hauptfächer: Chemie, Mathematik, Geschichte

8.18 Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Albert Sickmann für die Überlassung des interessanten Themas, die Begleitung meiner Promotion und die zahlreichen Möglichkeiten zum Besuch internationaler Konferenzen.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Oliver Kayser und Prof. Dr. Jörg Tiller, die als Zweitgutachter und Prüfer an meiner Promotion mitgewirkt haben.

Ein besonderer Dank gilt Dr. René Zahedi, der im Verlauf meiner Promotionszeit als Arbeitsgruppenleiter die Betreuung dieser Arbeit übernommen und durch kritische Diskussionen und hilfreiche Anregungen zu deren Gelingen beigetragen hat.

Darüber hinaus danke ich meinen Kooperationspartnern für die gute Zusammenarbeit: Prof. Dr. Wittinghofer und Dr. Björn Klink vom MPI für molekulare Physiologie in Dortmund für die Bereitstellung des BBSome-Komplexes sowie Prof. Dr. Christian Hedberg von der Universität Umeå in Schweden und Prof. Dr. Aymelt Itzen von der TU München für die Bereitstellung der IbpA-Proben.

Ein weiterer Dank geht außerdem an Prof. Dr. Christoph Borchers und Dr. Evgeniy Petrochenko vom UVic-Genome BC Proteomics Centre in Victoria in Kanada, die mir einen lehrreichen Aufenthalt in ihrem Labor ermöglichten.

Besonders bedanke ich mich bei allen Kollegen am ISAS, die für eine schöne Arbeitsatmosphäre und einen angenehmen Arbeitsalltag gesorgt haben. Insbesondere meine Bürokollegen Humberto und Margherita sowie meine geschätzte Kollegin Clarissa haben den Alltag mit Humor bereichert und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ingo und Konstantin danke ich für ihr Engagement bei der Peptid-Synthese.

Ich danke auch meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich dadurch angetrieben haben, niemals aufzugeben.

Meinem Mann Robert, der mir nun schon über sieben Jahre zur Seite steht, danke ich für das gemeinsame Durchstehen aller Höhen und Tiefen während dieser Arbeit. Auf Deine Unterstützung konnte und kann ich mich jederzeit verlassen und daher widme ich Dir und unserem Sohn diese Arbeit.

8.19 Erklärung

§ 8 (2) 4.

Ich erkläre, dass beim Verfassen der eingereichten Dissertation keine anderen als die angegebenen Personen mitgewirkt haben, nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und übernommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

§ 8 (2) 6.

Ich erkläre, dass ich bisher keinen Promotionsversuch unternommen habe.

§ 8 (3) 4.

Ich widerspreche der Öffentlichkeit bei der mündlichen Prüfung.

Stuttgart, den

(Unterschrift Doktorandin/Doktorand)