

Elektrospray-Ionisations- Massenspektrometrie als Tool für die Qualitative und die Quantitative Protein- und Peptidanalytik

Dissertation

**zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III-Chemie, Pharmazie, Bio- und
Werkstoffwissenschaften- der Universität des Saarlandes**

von

MSc. Chem. Bilgin Vatansever

Saarbrücken 2007

Tag des Kolloquiums: 13. Februar 2008

Dekan : Prof. Dr. Uli Müller

Vorsitzender : Prof. Dr. Gerhard Wenz

Berichterstatter : Prof. Dr. Christian Huber

: Prof. Dr. Elmar Heinzle

Akad. Mitarbeiter : Dr. Markus Martin

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Herrn **Univ. Prof. Dr. Christian G. Huber**. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt daher vor allem meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Christian G. Huber** für die Vergabe dieses interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung. Dafür, dass er nicht nur in beruflichen, sondern auch in privaten Bereichen stets großes Interesse für meine Person gezeigt hat und so dass er jederzeit ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.

Des Weiteren möchte ich Herrn **Prof. Dr. Dr. h. c. Heinz Engelhardt**, Herrn **PD Dr. Frank Steiner** und Herrn **Dr. Markus Martin** für die Hilfestellung bei zahlreichen theoretischen Fragen danken.

Weiterhin möchte ich Herrn **Reiner Wintringer (Windy)** für die praktischen Tipps und Hilfestellungen, die mir den Laboralltag sehr erleichtert haben und für die Herstellung der monolithischen Säulen,

Frau **Christa Göllen** möchte ich für die nette Unterstützung bei bürokratischen Angelegenheiten und für die gute Laune, die sie im ganzen Institut verbreitete.

Für das angenehme Arbeitsklima möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Diskussionen danken. Hierbei sind zu erwähnen **Verena Fraaß, Manuela Hügel (Manu)**, und **Sascha Quinten (das Büroteam)** sowie **Christian Schley, Andreas Leinenbach, Nathanaël Delmotte, Katja Melchior, Anis Mahsunah, Rainer Geiss, Jens Mohr, Eva Luxenburger, Devid Hero, Patrick Eschhold** und **Iris Gostomski**.

Ein Dank gilt **Bettina Mayr** und **Hansjörg Toll** für ihre Hilfsbereitschaft sowie ihre fachliche Unterstützung zu Beginn meiner Doktorarbeit.

Ich danke auch den Mitarbeitern der Werkstatt **Norbert Ochs** und **Jens Wiegert**, für das schnelle Beheben kleiner und größerer apparativer Probleme.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner **Mutter**, die mich auf meinem bisherigen Weg stets unterstützte und mir mit viel Geduld immer zur Seite stand.

Für die gute Zusammenarbeit sowie für die finanzielle und materielle Unterstützung bedanke ich mich bei **Dr. Thomas Koch**, **Dr. Agnes Nyeki** und **Dr. Uwe Kobold** von **Roche Diagnostics**, sowie bei den Firmen **LC Packings** und **Bruker Daltonics**, bei **Dr. Christoph Klein** vom **Institut für Referenzmaterialien und -messungen** der Europäischen Union und bei **Dr. Peter Oefner**.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	9
Abstract	13
Abkürzungsverzeichnis	17
Kapitel-I	
1 Einführung	16
1.1 Biologische Funktionen von Peptiden und Proteinen	16
1.2 Struktur und Eigenschaften der Aminosäuren	18
1.3 Struktur und Eigenschaften der Peptide und Proteine	21
1.3.1 3D- Strukturen von Proteinen	23
1.4 Proteolytische Spaltung von Proteinen	26
1.4.1 Strategie eines In-Lösung-Verdaus von Proteinen	27
1.5 Chromatographie in der Bioanalytik	32
1.5.1 Chromatographische Trennmethoden für Biopolymere	32
1.5.2 Umkehrphasen und Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie von Peptiden und Proteinen	33
1.5.3 Mikro-HPLC	36
1.5.3.1 Instrumentelle Aufbauanforderungen der Mikro-HPLC	38
1.6 Massenspektrometrie für die Bioanalytik	40
1.6.1 Einführung in die Technik der Massenspektrometrie	40
1.6.2 Das generelle Aufbauprinzip eines Massenspektrometers	41
1.6.2.1 Das Prinzip der Elektrospray Ionisation (ESI)	42
1.6.2.2 Detektionseinheit	46
1.6.3 Betriebsweise des Ionenfallen-Massenanalysators	47
1.6.3.1 Dekonvolution und Auswertung der ESI-Massenspektren	49
1.6.4 Identifizierung von Proteinen und Peptiden durch ESI-MS/MS	51
1.6.4.1 Fragmentierung von Peptidionen	51
1.7 Einführung in die Glutenchemie	55
1.7.1 Eigenschaften von Gluten	56
1.7.1.1 Eigenschaften von Gliadinen	56
1.7.1.2 Eigenschaften von Gluteninen	58

1.8 Einführung in die Glutentoxizität	59
1.8.1 Zöliakie	59
1.9 Literaturverzeichnis	63

Kapitel-II

2 Problemstellung und Zielsetzung	79
2.1 Optimierung des ESI-MS Systems für die Analyse von Gliadinen	80
2.1.1 Chemikalien und Materialien	80
2.1.2 Geräte	80
2.1.3 Aufbau des Sprayer-Systems	81
2.1.4 Durchführung der Methodenoptimierung durch Direkteinfusion	83
2.1.5 Ergebnisse	86
2.1.5.1 Die resultierende Tuningmethode mit Cytochrom C zum Zweck der Detektion von intakten Gliadinen	86
2.2 Die Vorbereitungsprozedur vom Institut für Referenzmaterialien und -messungen der Europäischen Union zur Extraktion der Gliadine	88
2.2.1 IP-RP-HPLC-ESI-MS Analyse von intakten Glutenproteinen mit der optimierten Cytochrom C Tuningmethode	89
2.2.2 Studien zur qualitativen Bestätigung der Glutenproteine durch ihre Aminosäuresequenzen	93
2.2.2.1 Klassischer Verdau von Gliadinextrakten (mit Reduktion)	93
2.2.2.2 Denaturierung und Dialyse des Gliadinextraktes (ohne Reduktion)	94
2.2.2.3 Durchführung des peptischen Verdaus	94
2.2.2.4 Durchführung des chymotryptischen Verdaus	94
2.2.3 IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analyse vom verdauten Gliadinextrakt mit Pepsin und Chymotrypsin (ohne und mit Reduktion)	95
2.3 Diskussion der Identifizierungsergebnisse	98
2.3.1 Gruppierung der GHG (Gliadin-Hordein-Glutenin) Datenbank	100
2.3.2 Einstellung der verwendeten Tools und Suchparameter	100
2.3.3 Konsensidentifikation der MS/MS-Analysen	102
2.3.4 Resultate der Konsensidentifikation	103
2.3.5 Protein- und Peptididentifizierung verschiedener Glutenproteine	104
2.4 Zusammenfassung	109
2.5 Literaturverzeichnis	111

Kapitel-III

3	Problemstellung und Zielsetzung	115
3.1	Experimenteller Teil	116
3.1.1	Chemikalien und Materialien	116
3.1.2	Geräte	116
3.1.3	Identifizierung der toxischen Peptide in einem Gliadinextrakt	118
3.1.4	Denaturierungsdetergenz RapiGest™-SF	122
3.1.5	Peptischer Verdau von BSA mit RapiGest™-SF	125
3.1.6	Peptischer Verdau des Gliadinextraktes durch Denaturierung mittels RapiGest™SF	128
3.1.7	Studie zur Optimierung der Verdauzeit über die Peakflächen des 30-mer toxischen Peptides	131
3.1.8	Studie zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der drei parallelen Verdaue bei 3 Std. über die Peakflächen des 30-mer toxischen Peptides	134
3.1.9	Auswahl und Analyse des isotopenmarkierten Standards	138
3.1.10	Bestimmung der unteren Nachweisgrenze des 30-mer IS	140
3.2	Absolute Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides in einem Gliadinextrakt mittels IP-RP-HPLC-MS	141
3.2.1	Vorbereitung der peptischen Verdaue zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide	141
3.3	Auswertung	144
3.3.1	Manuelle Auswertung	144
3.3.2	Automatische Auswertung	144
3.3.2.1	Extraktion der 30-mer toxischen Peptide und markierten 30-mer Peptide (IS) aus den Totalionenchromatogrammen bei der automatischen Auswertung	145
3.3.3	Quantifizierungsergebnisse nach der manuellen Auswertung	148
3.3.4	Quantifizierungsergebnisse nach automatischer Auswertung	156
3.3.5	Vergleich der Quantifizierungsergebnisse zwischen den manuellen automatischen Auswertungen	164
3.4	Zusammenfassung	165
3.5	Absolute Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides in Weizenmehl	169

3.5.1 Motivation	169
3.5.2 Praktischer Teil	169
3.5.3 Chemikalien und Materialien	169
3.5.4 Geräte	170
3.5.5 Entfetten des Weizenmehls	171
3.5.6 Extraktion der Gliadine aus dem entfettetem Weizenmehl	171
3.5.7 Peptischer Verdau des Gliadinextrakts	171
3.5.8 RP-HPLC-MS/MS Analyse des peptisch verdauten Gliadinextrakts	173
3.5.9 Herstellung der Proben zum Erstellen der Kalibrierkurve	175
3.5.10 Diskussion und Ergebnisse	176
3.6 Zusammenfassung	178
3.7 Literaturverzeichnis	179

Zusammenfassung

Aufgrund der immer noch hohen Zahl an offenen Fragenstellungen in den Biowissenschaften gilt die Proteomanalyse als eine der wichtigsten Forschungsgebiete in der Bioanalytik, welche sich intensiv mit der Aufklärung der Gesamtheit aller Proteine der Zelle beschäftigt. Auf dem Weg zum Lösen der Fragestellungen spielt die Schnelligkeit und die Zuverlässigkeit der ausgewählten Analysemethoden eine große Rolle. Aufgrund der geringen Menge an verfügbarem Probenmaterial werden häufig miniaturisierte chromatographische Trenntechniken wie Mikro-HPLC innerhalb der biowissenschaftlichen Forschung eingesetzt, welche mit verschiedenen massenspektrometrischen Detektionstechniken kombiniert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Elektrospray-Ionisation-(ESI)-Ionenfallen-Massenspektrometer sowohl für die qualitativen als auch für die quantitativen Analysen verwendet, welches sich auch als sehr empfindliche und schnelle Detektionsmethode herausstellte.

Im ersten praktischen Teil der Arbeit wurden Gliadine identifiziert, die zu den Glutenproteinen gehören. Die erste Art der Identifizierung wurde mit Hilfe der intakten molekularen Massen der Gliadine durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Tuningmethode durch Verwendung von Cytochrom-C optimiert. Mit dem optimierten System wurden unter 17 verschiedenen Peaks insgesamt 41 Proteinmassen ermittelt. Daraus wurden zwei α/β -Gliadine, ein α -Gliadin und drei γ -Gliadine identifiziert. Da die - zumal mit der Genauigkeit einer Ionenfalle - gemessene Proteinmasse keinesfalls ausreichende Informationen zur Proteinidentifizierung liefert, wurden als zweiter Weg die Proteine chymotryptisch und peptisch verdaut. Anschließend wurden die resultierenden Peptide mittels Tandem-MS durch Peptidfragmentfingerprinting (PFF) identifiziert. Mit Hilfe einer Kombination der Suchmaschinen *Mascot*, *InsPect*, *OMSSA* und deren Algorithmen wurden die Peptide identifiziert. Zur Identifizierung konnten diese sechs Gliadine eindeutig nach ihrer Gliadinfamilie zugeordnet werden. Eine eindeutige Identifizierung dieser sechs Gliadine war jedoch aufgrund der Homologie nicht möglich.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Quantifizierungsmethode entwickelt, mit der ein toxisches 30-mer Peptid quantifiziert wurde. Das toxische

30-mer Peptid wurde durch peptischen Verdau in Gegenwart einer besonderen aktiven Denaturierungssubstanz (RapiGest™) aus einem Weizenextrakt gewonnen. Dabei wurden die Verdaubedingungen hinsichtlich der Verdauzeit optimiert. Entsprechend dieser Optimierungsstudien wurden vier parallele peptische Verdau zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit und zur Quantifizierung durchgeführt. Die Kalibrierung für die absolute Quantifizierung wurde mit einem isopenmarkierten internen Standard vorgenommen. Als interner Standard wurde ein Peptid verwendet, welches dieselbe Sequenz des toxischen 30-mer Peptides hatte und am N-terminalen Valin durch sechs C-13-Atome isopenmarkiert war.

Der letzte Schritt dieser Quantifizierungsstudie bestand in der Auswertung der Rohdaten nach einem Feature-Finder-Algorithmus mit dem Ziel, dass durch die Automatisierung der Auswertungsprozesse eine schnelle Datenauswertung erreicht werden kann. Zur Kontrolle der automatischen Auswertung wurde eine manuelle Auswertung der Daten durchgeführt. Dabei wurde eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Auswertungsprozesse festgestellt.

Um diese Quantifizierungsmethode in der alltäglichen Praxis der Lebensmittelindustrie zu realisieren, wurde anschließend zu diesem Zweck das toxische 30-mer Peptid in einem kommerziell erhältlichen Weizenmehl von Typ 405 erfolgreich qualitativ und quantitativ untersucht.

Abstract

Due to the still remaining high number of unanswered questions in life sciences, the proteome analysis is currently considered as one of the most important research tools of bioanalysis. In general, proteome analysis deals with identification, structural studies and posttranslational modification studies of the whole cell proteome. Hereby the rapidity and reliability of the selected analysis method are some of the most challenging issues. Due to the usually small sample amounts to be analyzed, a miniaturized chromatographic separation technique such as micro-HPLC combined with mass-spectrometric detection techniques is frequently used.

In the present work an electrospray ionization (ESI) ion trap mass spectrometer was used for the qualitative and quantitative analyses. The method represented itself as a very sensitive and fast detection method.

In the first part of the present work gliadins were identified, which belong to the gluten proteins. The first way of identification was accomplished by measuring the molecular masses of the intact gliadins. For this purpose a tuning-method could be optimized using cytochrome c. With this optimized system, 17 different peaks were determined, which represented a total number of 41 protein masses. From these 41 protein masses two α/β -gliadins, one α -gliadin and three γ -gliadins were identified. To confirm these results, a second method for protein identification using peptic and chymotryptic digestions of proteins, Tandem-MS and Peptide Fragment Fingerprinting (PFF) was applied. The identified peptides were used to determine their corresponding proteins using a combination of the search machines Mascot, InsPect, OMSSA and their algorithms. Six gliadins could be clearly assigned to their gliadin family. A doubtless identification of these six gliadins was not possible due to their structural homology.

In the second part of the present work, a quantification method was developed to quantify a toxic 30-mer peptide. The toxic 30-mer peptide was isolated from a wheat extract by peptic digestion in presence of a special denaturing agent (RapiGestTM). The digest conditions were optimized with respect to the digestion time. According to the optimization studies four parallel peptic digests were prepared for quantification and reproducibility study purposes. An isotope-labeled internal standard was used for

the calibration. A synthetic 30-mer toxic peptide containing six C-13 atoms in the N-terminal valine was used as an internal standard.

The last step in this quantification study consisted of the analysis of the raw data applying the Feature Finder algorithm to achieve a quick data analysis by automating the evaluation process. A manual data analysis was also performed to validate the results of the automatic data evaluation. The results of both the manual and the automatic data analysis showed to be in very good agreement.

The project then was finalized by applying this optimized analysis method to commercially available type 405 wheat flour where this toxic 30-mer peptide was analysed successfully qualitatively and quantitatively.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
chym_red	chymotryptischer Verdau mit Reduktion
chym_nonred	chymotryptischer Verdau ohne Reduktion
Cyt C	Cytochrom C
CRM	Charged Residue Model
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Da	Dalton
ESI	Elektrospray-Ionisation
EIC	Extrahiertes Ionenstromchromatogramm
Exp.	Expasy
Expasy	Expert Protein Analysis System
Gl.	Gleichung
GHG	Gliadin-Hordein-Glutenin und Prolamin Datenbank
GS	Glutenin Subunit
HMW	High Molecular Weight
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
ICC	Automatische Regulierung der Ionenfallen-Füllung
InsPect	Datenbankfilter
I.D.	Innendurchmesser
IP	Ionenpaar
IEM	Ionenemissionsmodell
LMW	Low Molecular Weight
LC	Flüssigkeitschromatographie
MMW	Medium Molecular Weight
MASCOT	Suchmaschine der Firma Matrix Science Ltd.

MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MOWSE	Molecular Weight Search
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSDB	Mass Spectrometry Protein Sequence Data-Base
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMSSA	Open Mass Spectrometry Search Algorithm
OD	Außendurchmesser
Pk.#	Peak
pep_red	Peptischer Verdau mit Reduktion
pep_nonred	Peptischer Verdau ohne Reduktion
PFF	Peptid-Fragment-Fingerprint
PMF	Peptid-Massen-Fingerprint
PS-DVB	Poly (Styrol-Divinylbenzol)
RP	Umkehrphase
RPC	Umkehrphasenchromatographie
RSD	Relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SEV	Sekundär-Elektronenvervielfacher
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer
v:v	Zusammensetzung in Volumenprozent
w:w	Zusammensetzung in Gewichtsprozent
WW	Wechselwirkung
2D	Zweidimensional
x-HMW-GS	x-Typ High Molecular Weight Glutenin Subunit
y-HMW-GS	y-Typ High Molecular Weight Glutenin Subunit

Kapitel I

Allgemeiner Teil

1 Einführung

Proteine (auch Eiweiße genannt) sind Bausteine in unserem Körper und haben wichtige Funktionen bei nahezu allen biologischen Prozessen. Betrachtet man die Nucleinsäuren als den Konstruktionsplan, so sind die Proteine das Material, das zur Realisierung der Bauanleitung dient. Sie erfüllen zahlreiche Funktionen sowie als Strukturelemente, als Enzyme für Stoffwechselfvorgänge, als Rezeptoren und Hormone sowie inter- und intrazelluläre Signalstoffe. Viele Wirkstoffe wie Immunglobuline, Antibiotika, tierische und pflanzliche Toxine, etc., sind Peptide bzw. Proteine. Sie sind die Hauptbestandteile der Biomasse in den Zellen und machen zusammen mit den Nucleinsäuren mehr als 2/3 der Trockenmasse der Zelle aus.

1.1 Biologische Funktionen von Peptiden und Proteinen

Proteine sind Baustoffe lebender Systeme. Die chemische Zusammensetzung der Organismen weicht deutlich vom Aufbau ihrer abiotischen Umwelt ab. In den Lebewesen überwiegen der Zahl nach die organischen Verbindungen, vielfach von makromolekularem Bau. Sie werden unter dem Begriff Biomoleküle zusammengefasst. Die wichtigsten Gruppen dieser Biomoleküle sind die Proteine (Eiweißstoffe) und ihre Bausteine, die Aminosäuren. Im Zellplasma aller Organismen finden sich makromolekulare Substanzen, die in ihrem Bau und in ihren Eigenschaften dem Eiweiß des Vogeleies gleichen und daher Eiweißstoffe genannt werden. Die von J. Berzelius vorgeschlagene Bezeichnung **Protein** weist auf ihre überragende Bedeutung für das Leben hin. Wie die Kohlenhydrate übernehmen die Proteine eine Vielzahl von Aufgaben innerhalb des Organismus. Einige von vielen biologische Funktionen sind unten zusammengefasst (1-3):

1. Enzymatische Katalyse: Fast alle chemischen Reaktionen in biologischen Systemen werden durch spezifische Makromoleküle katalysiert, die man Enzyme nennt. Einige dieser Reaktionen wie die Anlagerung von Wasser an Kohlendioxid sind relativ einfach, andere, etwa die Replikation eines ganzen Chromosoms, hochkompliziert. Enzyme weisen ein enormes katalytisches Potenzial auf: Gewöhnlich

erhöhen sie die Reaktionsgeschwindigkeit millionenfach. In vivo (im lebenden Organismus) laufen chemische Umsetzungen ohne diese Katalysatoren nur selten in nennenswertem Umfang ab. Mehrere tausend Proteine sind bisher charakterisiert und viele auch davon kristallisiert worden. Dabei fällt auf, dass nahezu alle bekannten Enzyme Proteine sind. Diesen kommt also die einzigartige Rolle zu, das Muster der chemischen Umsetzung in biologischen Systemen zu bestimmen.

2. Transport und Speicherung: Viele kleine Moleküle und Ionen werden durch spezifische Proteine transportiert. Zum Beispiel dient Hämoglobin als Träger des Sauerstoffs in den Erythrocyten, während Myoglobin, ein verwandtes Protein, diese Aufgabe im Muskel wahrnimmt. Eisen wird im Blutplasma durch Transferrin transportiert und in der Leber als Komplex mit einem anderen Protein, dem Ferritin, gespeichert.

3. Immunabwehr: Antikörper (auch Immunoglobuline) im Immunsystem sind hochspezifische Proteine, die Fremdsubstanzen (Antigene) wie Viren, Bakterien und Zellen von anderen Organismen erkennen und binden können. Somit spielen Proteine auch bei der Unterscheidung zwischen "eigen" und "fremd" eine entscheidende Rolle.

4. Erzeugung und Übertragung von Nervenimpulsen: Die Antwort von Nervenzellen auf spezifische Reize wird durch Rezeptorproteine vermittelt. Rhodopsin zum Beispiel ist das Photorezeptorprotein in den Stäbchen der Retina. Rezeptorproteine, die durch spezifische kleine Moleküle wie etwa Acetylcholin stimuliert werden können, sind verantwortlich für die Übertragung von Nervenimpulsen an den Synapsen, den Verbindungsgliedern der Nervenzellen untereinander. Auch Peptide erfüllen an nahezu allen biologischen Systemen zahlreiche wichtige Aufgaben. Beispielweise wirken das Peptidhormon Insulin und sein Gegenspieler Glucagon als Regulatoren des Blutzuckers. Die Liste kann fortgesetzt werden und das Zusammenspiel der einzelnen Proteine wurde noch nicht einmal angedeutet. Diese Interaktion der einzelnen Proteine ist ungeheuer komplex und ist erst in den letzten Jahren andeutungsweise beschrieben worden. Diese Gesamtheit aller Proteine in einem Organismus wird als **Proteom** bezeichnet, und ist als Begriff vergleichbar mit dem des **Genoms**; der Gesamtheit aller Gene innerhalb eines Organismus.

1.2 Struktur und Eigenschaften der Aminosäuren

Aminosäuren werden als Bausteine der Peptide und Proteine definiert. Sie werden formal von den Carbonsäuren durch den Einbau einer *Aminogruppe* ($-\text{NH}_2$) abgeleitet. Im Hydrolysat der natürlichen Proteine treten regelmäßig nur etwa 20 verschiedene Aminosäuren auf, die übereinstimmend ihre Aminogruppe in alpha-Stellung zur Carboxylgruppe tragen. Der einfachste Vertreter, **Glycin**, besitzt als Seitenkette lediglich ein Wasserstoffatom. **Alanin** weist stattdessen eine Methylgruppe auf. Größere Kohlenwasserstoffseitenketten (mit 3 und 4 C-Atomen) findet man bei **Valin**, **Leucin** und **Isoleucin**. All diese Reste sind hydrophob und neigen dazu sich zusammen zu lagern (dieses wirkt stabilisierend für die dreidimensionale Struktur wasserlöslicher Proteine). Auch **Prolin** besitzt eine aliphatische Seitenkette; es unterscheidet sich jedoch von den anderen 19 Aminosäuren dadurch, dass seine Seitenkette sowohl mit dem Stickstoffatom als auch mit dem alpha-Kohlenstoffatom verbunden ist. Die dadurch entstehende Ringstruktur übt einen deutlichen Einfluss auf die Architektur von Proteinen aus. Zu den Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten gehören **Phenylalanin**, **Tryptophan** und **Tyrosin**. Tryptophan besitzt einen Indolring an einer Methylengruppe; diese Seitengruppe enthält außer Kohlenstoff- und Wasserstoff-Atomen noch ein Stickstoffatom. Phenylalanin und Tryptophan sind stark hydrophob. Der aromatische Ring des Tyrosins enthält eine Hydroxylgruppe, die diese Aminosäure weniger hydrophob als Phenylalanin macht. Die aromatischen Ringe von Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin besitzen delokalisierte pi-Elektronenwolken, die es ermöglichen, mit anderen pi-Systemen in Wechselwirkung zu treten und Elektronen zu übertragen. Zu den schwefelhaltigen Aminosäuren gehören **Cystein** und **Methionin**. Cystein enthält eine Sulfhydrylgruppe ($-\text{SH}$) und Methionin ein Schwefelatom in einer Thioetherbindung ($-\text{S}-\text{CH}_3$). Die Sulfudrylgruppe des Cysteins ist *hochreaktiv* und bildet Disulfidgruppen ("Schwefelbrücken") welche für den inneren Zusammenhalt der Proteine von äußerster Wichtigkeit sind. Weitere Aminosäuren mit aliphatischen Hydroxylgruppen sind **Serin** und **Threonin**. Serin ist im Prinzip ein hydroxyliertes Alanin, Threonin ist ein hydroxyliertes Valin. Die Hydroxylgruppen machen Serin und Threonin aber *sehr viel hydrophiler* (also "wasserfreundlicher") und *reaktiver* als Alanin und Valin. Zu Aminosäuren mit basischen Seitenketten gehören **Lysin**, **Arginin** und **Histidin**. Sie haben sehr polare Seitenketten und sind deswegen *stark hydrophil*. Lysin und Arginin sind bei neutralem pH-Wert *positiv geladen*. Histidin

kann je nach Umgebung ungeladen oder positiv geladen sein; man findet es häufig im aktiven Zentrum von Enzymen, wo sein Imidazolring rasch zwischen beiden Ionisationsformen umschalten kann, um das Knüpfen und Lösen von Bindungen zu katalysieren. Die Seitenketten von Lysin und Arginin sind die längsten der 20 proteinogenen Aminosäuren. **Asparaginsäure** und **Glutaminsäure** sind Aminosäuren mit sauren Seitengruppen. Sie sind auch stark *hydrophil*. Man nennt sie üblicherweise *Aspartat* und *Glutamat* (nach ihren Salzen), um zu betonen, dass ihre Seitenketten bei physiologischem pH-Wert fast stets *negativ* geladen sind. Ungeladene Derivate von Aspartat und Glutamat sind **Asparagin** und **Glutamin**, die statt der endständigen Carboxylgruppe eine Amidgruppe aufweisen. Bis auf Glycin findet man bei allen proteinogenen Aminosäuren aufgrund der unterschiedlichen Seitenketten ein Asymmetriezentrum in α -Position zur Carboxylgruppe. Aminosäuren werden oft mit einer Abkürzung aus drei Buchstaben oder einem Ein-Buchstaben-Symbol bezeichnet wie in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 1. Klassifizierung der proteinogenen Aminosäuren nach ihren Seitenketten.

<i>aliphatische Aminosäuren:</i>	Gly, Ala, Val, Leu, Ile
<i>Hydroxyaminosäuren:</i>	Ser, Thr
<i>Aminodicarbonsäuren:</i>	Asp, Glu
<i>Aminodicarbonsäureamide:</i>	Asn, Gln
<i>basische Aminosäuren:</i>	Lys, Arg, His
<i>schwefelhaltige Aminosäuren:</i>	Cys, Met
<i>cyclische Aminosäure:</i>	Pro
<i>arom. bzw. heteroarom. AS:</i>	Phe, Tyr, Trp

Tabelle 2. Strukturen und Buchstabencodierung der 20 proteinogenen Aminosäuren.

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

1.3 Struktur und Eigenschaften der Peptide und Proteine

In Proteinen ist die α -Carboxylgruppe (-COOH) mit der α -Aminogruppe (-NH₂) einer zweiten Aminosäure durch eine **Peptidbindung** (auch Amidbindung genannt) verknüpft. Man nennt diesen Vorgang *Peptidkondensation* (s. Abbildung 1).

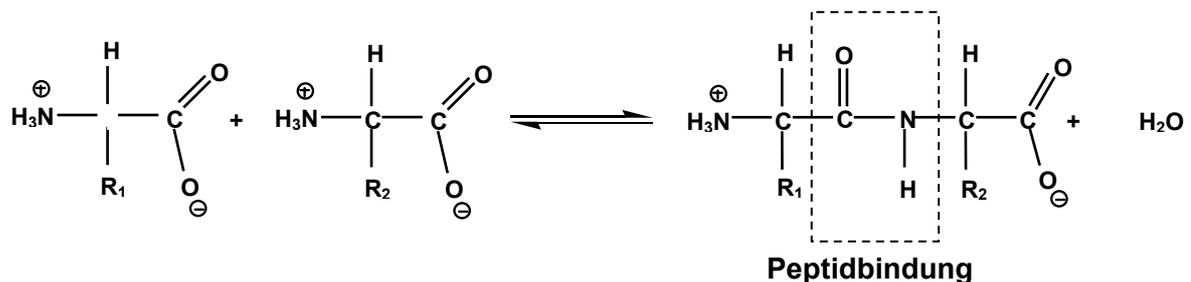


Abbildung 1. Entstehung der Peptidbindungen

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf Seiten der Hydrolyse (Edukte); daher bedarf die Biosynthese von Peptidbindungen eines beträchtlichen Energieaufwands, während ihre Spaltung thermodynamisch freiwillig abläuft. Viele durch Peptidbindung verknüpfte Aminosäuren bilden eine unverzweigte **Polypeptidkette**, deren einzelne Aminosäureeinheiten als *Reste* bezeichnet werden. Als Peptide werden definitionsgemäß Polypeptidketten im Längenbereich von 2 bis zu etwa 100 Aminosäuren bezeichnet. Es wird zwischen Oligopeptiden und Polypeptiden unterscheiden, wobei Oligopeptide 2-9 und Polypeptide 10-100 Aminosäuren besitzen. Proteine werden üblicherweise als Polypeptide mit einer Länge mehr als 50 Aminosäuren bezeichnet. Das Zusammenkommen von mehreren Proteinen wird als Proteinkomplex bezeichnet. In Abbildung 2 ist ein Beispiel für ein Tripeptid mit N-terminalem Glycin (rotonierte Gruppe) und C-terminalem Valin (Carboxylat-Gruppe) gezeigt. Die Anordnung der Aminosäuren in bestimmter Reihenfolge bezeichnet man als Sequenz (Primärstruktur).

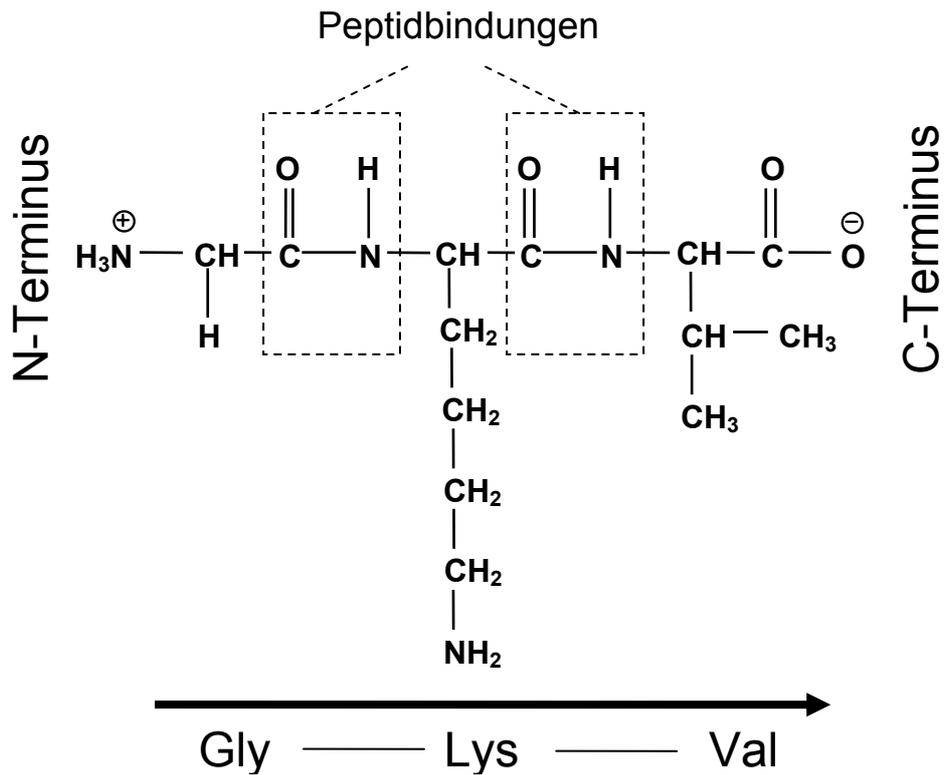


Abbildung 2. Primärstruktur eines Tripeptides

Es ist festgelegt worden, dass Proteinsequenzen immer vom N-terminalen Ende zum C-terminalen Ende bezeichnet werden. Man erhält so für das in Abbildung 2 gezeigte Tripeptid die Sequenz **Gly-Lys-Val** im Dreibuchstaben- bzw. **GKV** im Einbuchstaben-Code.

1.3.1 3D- Strukturen von Proteinen

Ein Hauptkennzeichen von Proteinen ist, dass sie eine definierte dreidimensionale Struktur besitzen. Eine langgestreckte oder ungeordnete Polypeptidkette hat keine biologische Aktivität. Die Funktion ergibt sich erst aus der Konformation, der dreidimensionalen Anordnung der Atome in einer Struktur. Es sind vier verschiedene Strukturarten der Proteine anzutreffen: Primärstruktur, Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und Quartärstruktur (s. Abbildung 3).

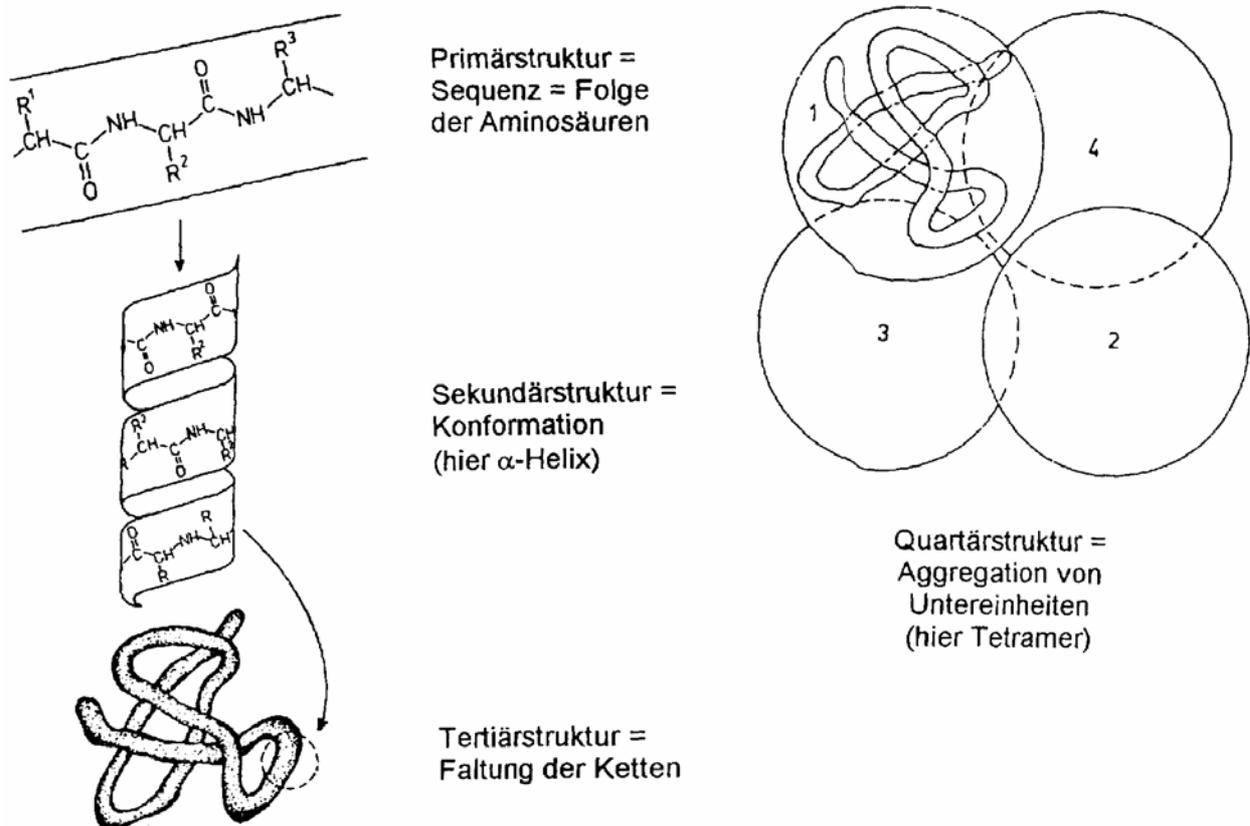


Abbildung 3. Illustration der Begriffe Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins.

a. Die Primärstruktur

Die Aminosäuresequenz spielt dabei eine fundamentale Rolle, weil sie die spätere Konformation der Proteine bestimmt. Diese Aminosäuresequenz und die Stellung der Disulfidbrücken (falls vorhanden) bestimmen die sogenannte Primärstruktur der Proteine. Die Primärstruktur ist eine komplette Beschreibung

der kovalenten Bindungen eines Proteins. Eine wichtige Voraussetzung für die dreidimensionale Struktur der Proteine ist die in sich **starre und planare** Peptidbindung. Der Wasserstoff der substituierten Aminogruppe liegt fast immer in *trans* Position zum Sauerstoff der Carbonylgruppe. Eine freie Rotation um die Bindung zwischen dem Carbonyl-C-Atom und dem Stickstoffatom der Peptidbindung ist nicht möglich, weil diese Bindung *partiellen Doppelbindungscharakter* besitzt. Im Gegensatz dazu ist die Bindung zwischen dem α -C-Atom und dem Carbonylkohlenstoffatom eine reine Einfachbindung, genau wie jene zwischen dem α -C-Atom und dem Stickstoffatom. Die Bindungen beiderseits der starren Peptidbindung weisen folglich eine große Rotationsfreiheit auf.

b. Die Sekundärstruktur

Die **Sekundärstruktur** der Proteine wird über Wasserstoffbrücken zwischen einzelnen Molekülteilen vermittelt und bezieht sich auf die räumliche Anordnung von Aminosäurenresten, die in der linearen Sequenz nahe beieinander liegen. Durch die Primärstruktur festgelegt ergeben sich zwei periodische Polypeptidstrukturen, die **α -Helix**- und die **β -Faltblatt**-Struktur. Die α -Helix ist eine stabförmige Struktur; die eng aufgewickelte Polypeptidhauptkette bildet den inneren Teil des Stabes, während die Seitenketten in schraubenartiger Anordnung nach außen weisen. Die α -Helix wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den NH- und CO-Gruppen der Hauptkette stabilisiert; dabei bildet die CO-Gruppe jeder AS eine Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe jener AS, die in der linearen Sequenz vier Reste vor ihr liegt. Die β -Faltblatt-Struktur unterscheidet sich wesentlich von der α -Helix, da sie mehr platten- als stabförmige Gestalt besitzt. Die Polypeptidkette eines β -Faltblattes ist fast völlig gestreckt und nicht eng verknäult wie in der α -Helix. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die β -Faltblattstruktur durch Wasserstoffbrücken zwischen CO- und NH-Gruppen verschiedener Polypeptidstränge stabilisiert werden kann, wobei zur Stabilisierung einer α -Helixstruktur Wechselwirkungen zwischen CO- und NH-Gruppen nur eines Polypeptidstranges ausgebildet werden.

c. Die Tertiärstruktur

Unter Tertiärstruktur der Proteine versteht man die räumliche Beziehung von Aminosäurenresten, die innerhalb der linearen Sequenz weit von einander entfernt sind. Die Trennungslinie zwischen Sekundär- und Tertiärstruktur ist ein wenig willkürlich.

d. Die Quartärstruktur

Proteine treten mitunter zu noch größeren Einheiten zusammen. Derartige Eiweißkörper bilden eine Quartärstruktur, indem sich einzelne Protein-Ketten zu übergeordneten Strukturen zusammenlagern.

1.4 Proteolytische Spaltung von Proteinen

Unter proteolytischer Spaltung der Proteine, auch bezeichnet als Proteinverdau, versteht man die chemische oder enzymatische Spaltung der Proteine. Das bringt den Vorteil besonders bei der Analyse der Proteine, dass die sich anschließend erhaltenen Peptidmischungen gegenüber Proteinmischungen durch eine höhere Homogenität in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften auszeichnen. Den Maßstab für die verwendeten Proteinmengen gibt dabei die Detektionsgrenze der nachfolgenden analytischen Verfahren. Von der Art der Aufreinigung ist es abhängig, wie die proteolytische Spaltung durchgeführt wird. Eine der verwendeten Spaltungsmethoden ist der „In-Solution“ Verdau (4-6). Diese Methode besitzt den Vorteil, dass sie sehr einfach durchzuführen ist. Der Nachteil bei dieser Methode ist, dass es jedoch häufig schwer ist, das Protein zu lösen und dann auch in Lösung zu halten. Um diese Problematik zu vermeiden werden gewöhnlich Puffer mit Salzen und denaturierenden Detergenzien verwendet. Als zweite Spaltungsmethode gilt die Spaltung der Proteine in einer Polyacrylamidmatrix, wo sich Proteine direkt in der Matrix spalten lassen (7,8). In den letzten Jahren ist eine on-line Methode bekannt geworden, wobei Proteine auf einer chromatographischen Säule verdaut werden (9). Hierbei wird das Enzym auf der stationären Phase der Säule immobilisiert und die zur Analyse injizierten Proteine werden während ihres Aufenthaltes in der Säule durch das Enzym on-line verdaut (10). Bei dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit der „In-Solution“ Spaltungsmethode gearbeitet.

1.4.1 Strategie eines In-Lösung-Verdaus von Proteinen

Eine kompakte Sekundär- und Tertiärstruktur nativer Proteine ist sehr häufig die Ursache für schlechte Proteolyseausbeuten, da die Spaltstellen für Proteasen schlecht zugänglich sind. Dafür wurde eine Strategie zum Verdau der Proteine entwickelt, die auch klassischer Proteinverdau genannt wird. Bei dem klassischen Verdau verfolgt man folgende Schritte bis das Protein verdaut wird:

- 1- Denaturierung:** Unter dem Begriff Denaturierung versteht man die Zerstörung der geordneten Strukturen der Proteine mit Hilfe von Detergenzien wie Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid (Guanidin-HCl). Zur Denaturierung wird meist 8M Harnstoff / 0.5M Ammoniumbicarbonat verwendet. Zum Verdau soll die hochkonzentrierte Guanidin-HCl-Lösung auf 1M verdünnt werden, da dies durchaus mit der Aktivität vieler Proteasen kompatibel ist. Eine weitere Denaturierungsmöglichkeit ist auch die Inkubation der Proteine bei höheren Temperaturen ($>80^{\circ}\text{C}$), die selten verwendet wird.
- 2- Reduktion:** Der zweite Schritt der Strategie ist die Spaltung von Disulfidbrücken, die bei cystein und methioninhaltigen Proteinen vorkommen. Die meist verwendeten Reduktionssubstanzen sind Dithiotreithol (DTT), 2-Mercaptoethanol und Tributylphosphin, wobei DTT am häufigsten verwendet wird. In Abbildung 4 ist die Reduktion der Disulfidbrücken mit diesen drei Substanzen illustriert.

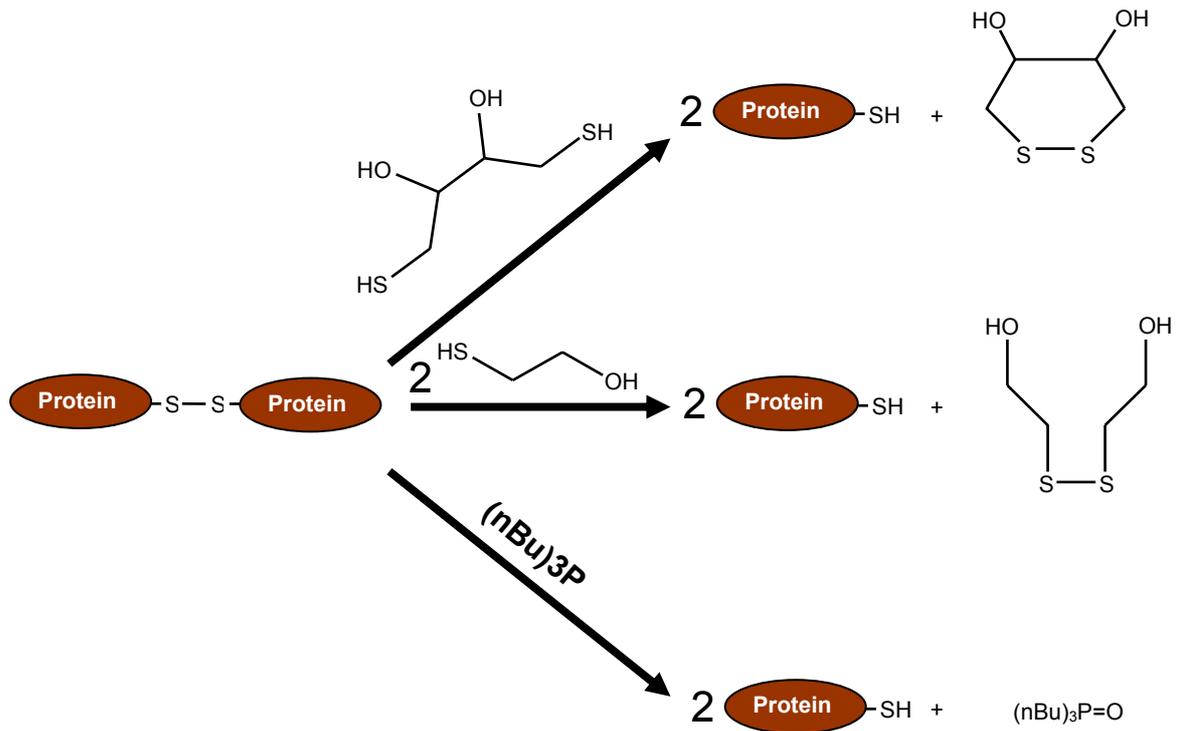


Abbildung 4. Reduktion von Disulfidbrücken: Umsetzung mit DTT, 2-Mercaptoethanol und Tributylphosphin.

Tabelle 3. Eigenschaften der drei Reduktionsreagenzien (11).

Reduktionsreagenz	Eigenschaft
DTT	DTT ist stärkeres Reduktionsreagenz als 2-Mercaptoethanol, wasserlöslich.
2-Mercaptoethanol	Schwaches Reduktionsmittel, erfordert großen molaren Überfluss, unangenehmer Geruch (muss unter dem Abzug benutzt werden), wasserlöslich.
Tributylphosphin	Starkes Reduktionsmittel (reduziert sogar oxidiertes DTT), reduziert die Disulfide stochiometrisch (1 mol TBP reduziert 1 mol Disulfid), giftig, reagiert bei niedrigem pH-Wert.

3- Alkylierung: Der nachfolgende Schritt ist die Alkylierung, um die Reduktion irreversibel durchzuführen und ungewünschte Reorganisationen von Cystein zu vermeiden. Dazu müssen die freien SH-Gruppen durch Alkylierung modifiziert bzw. stabilisiert werden. Die häufigsten Alkylierungsreagenzien sind 4-Vinylpyridin, Iodessigsäure und Iodacetamid. In Abbildung 5 ist die Alkylierung der SH-Gruppen mit diesen drei Reagenzien zu sehen.

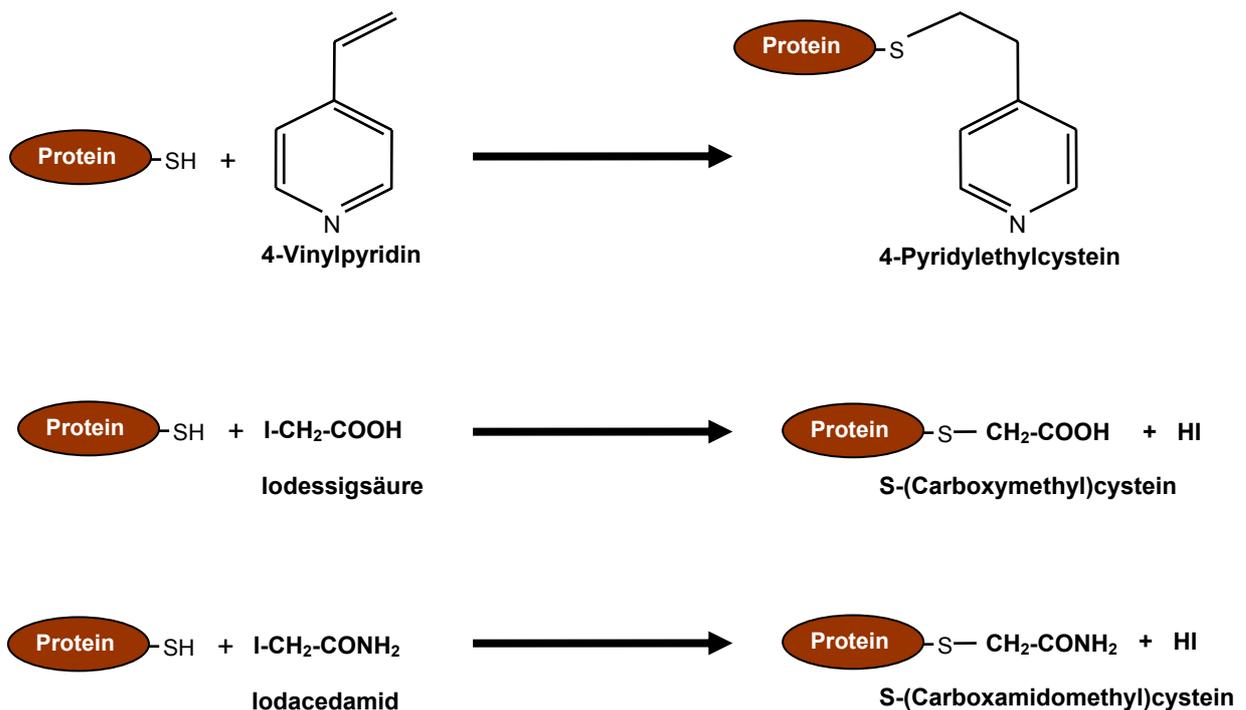


Abbildung 5. Alkylierung der SH-Gruppen mit 4-Vinylpyridin, Iodessigsäure und Iodacedamid.

In der Tabelle 4 sind die Eigenschaften dieser Reagenzien zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4. Eigenschaften der drei Alkylierungsreagenzien (11).

Alkylierungsreagenz	Eigenschaft
4-Vinylpyridin	4-Pyridylethylcystein ist in Säure beständig. Modifikation von Cysteinen mit 4-Vinylpyridin erhöht die Polarität der Seitenkette, wodurch die Löslichkeit des Proteins erhöht wird.
Iodessigsäure	Klassisches Reagenz für Alkylierung von SH-Gruppen. Modifizierte Cysteine sind in Säure stabil.
Iodacetamid	S-(Carboxamidomethyl)-cystein ist neutral; kann einfach im intakten Protein durch Aminosäureanalyse quantitativ bestimmt werden; stabil in Säure.

4- In-Lösung-Verdau von Proteinen: Proteine kann man chemisch oder enzymatisch (biologisch) spalten. Ein bekannter Vertreter bei den chemischen Spaltreagenzien ist das Bromcyan. Dies spaltet Proteine spezifisch auf der C-terminalen Seite der Methioninreste. Ein Beispiel zu den biologischen Enzymen ist das Verdauungsenzym Pepsin. Die kommerziell verfügbare Pepsin-Form ist meistens „Pepsin A“ aus dem Magen des Schweins. Pepsin vermag Peptidbindungen vorrangig C-terminal zu den Aminosäuren Phenylalanin und Leucin zu spalten, das Katalyseverhalten ist also sequenzspezifisch. Die höchste Aktivität hat Pepsin bei einem pH-Wert zwischen 1.3 und 4. Oberhalb von pH 6 wird das Enzym irreversibel inaktiviert. Temperaturen bis 60 °C können seine Funktion nicht beeinträchtigen, ebenso wenig höhere Konzentrationen von Harnstoff und Guanidin. Je nach der Wahl der verwendeten Spaltreagenzien kann man somit die durchschnittliche Peptidlängenverteilung beeinflussen. In Tabelle 5 sind verschiedene biologische und chemische Reagenzien zusammen mit ihren spezifischen Spaltstellen aufgelistet.

Tabelle 5. Biologische und chemische Spaltungsreagenzien für die spezifische Proteinspaltung (12).

Spaltungsreagenz	Spaltestelle
<u>Biologische Spaltung</u>	
Pepsin A, pH: 1.3	C-Terminalseite von Phenylalanin-, Leucinresten
Chymotrypsin, pH: 7.5-8.5	C-Terminalseite von Tyrosin-, Tryptophan-, Phenylalanin-, Leucin-, Histidin- und Methioninresten
Trypsin, pH: 8.0-9.0	C-Terminalseite von Lysin- und Argininresten
<u>Chemische Spaltung</u>	
Bromcyan	C-Terminalseite von Methioninresten
o-Iodosobenzoat	C-Terminalseite von Tryptophanresten
Hydroxylamin	Asparagin-Glycin Bindungen
2-Nitro-5-thiocyanobenzoat	N-Terminalseite von Cysteinresten

1.5 Chromatographie in der Bioanalytik

Die Auftrennung und Isolierung von Peptiden und Proteinen in der Bioanalytik ist eine wesentliche Voraussetzung für die anschließende Analyse der Struktur, Identität und Funktion. Flüssigchromatographie ist eine der wichtigsten und am häufigsten eingesetzten Methoden in der Bioanalytik neben den elektrophoretischen Trenntechniken.

1.5.1 Chromatographische Trennmethoden für Biopolymere

Es gibt eine große Zahl chromatographischer Techniken zur Trennung von Biopolymeren wie Peptiden und Proteinen. Da sich die Peptide und Proteine in ihrer Größe, Form, Ladung und Polarität oder biologischer Affinität unterscheiden können, nutzt man diese Eigenschaften zur flüssigchromatographischen Trennungen (13). Die wichtigsten chromatographischen Trenntechniken und ihre Mechanismen sind zusammen in Tabelle 6 aufgelistet (14-16).

Tabelle 6. Die wichtigsten chromatographischen Trennmechanismen für Peptide und Proteine.

Chromatographischer Modus	Abkürzung	Trennprinzip
<i>Nicht interaktive Modi:</i>		
Größenausschlusschromatographie	SEC	Unterschiede in der Molekülgröße
<i>Interaktive Modi:</i>		
Ionenaustauschchromatographie	IEC	elektrostatische Wechselwirkungen
Umkehrphasenchromatographie	RPC	solvophobe Wechselwirkungen
Ionenpaar- Umkehrphasenchromatographie	IP-RPC	elektrostatische und solvophobe Wechselwirkungen
Affinitätschromatographie	AC	biospezifische Wechselwirkungen
Metallinteraktionschromatographie	MIC	Komplexbildung

1.5.2 Umkehrphasen und Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie von Peptiden und Proteinen

Bei der sogenannten Umkehrphasenchromatographie oder Reversed Phase Chromatographie (RPC) findet eine hydrophobe Wechselwirkung (WW) des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel statt. Die Phasenmaterialien bestehen meist aus alkyliertem Kieselgel oder aus hydrophoben organischen Polymeren. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels, das mit dem adsorbierten Molekül um die Bindungsstelle konkurriert. Bei der RPC werden überwiegend Gradiententrennungen verwendet aufgrund der Verbesserung des Auflösungsvermögens und der Trennkapazität. Durch Zusammenmischen des organischen Lösungsmittels zur wässrigen Phase wird im Gradientenverlauf die Polarität verringert und somit die Elutionskraft erhöht. In Abbildung 6 sind in der elutropen Reihe verschiedene Lösungsmittel nach zunehmender Elutionskraft (abnehmender Polarität) angeordnet.

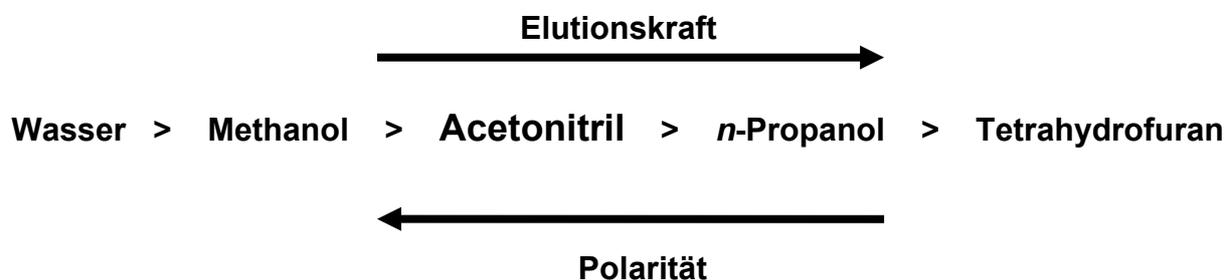


Abbildung 6. Elutrope Reihe: verschiedene Lösungsmittel nach zunehmender Elutionskraft (abnehmender Polarität).

Das am häufigsten verwendete Lösungsmittel für RPC ist Acetonitril. Seine Bevorzugung begründet sich durch physikalische Eigenschaften wie beispielsweise Viskosität und UV-Durchlässigkeit. Um die sekundären WW der Biomoleküle mit den Restsilanolgruppen bei Kieselgel-basierten stationären Phasen zu vermeiden, werden häufig in die mobile Phase polare Säuren (z.B. Phosphorsäure), Salzsäure oder Ameisensäure zugefügt (17). Die Retention der Analyten unter diesen Bedingungen basiert auf solvophoben WW (18). Durch Zugabe von relativ hydrophoben Säuren

und Basen (Ionenpaareagenz) in die Eluenten erfolgt anschließend die Trennung der Analyten neben ihrer Hydrophobie auch aufgrund ihrer Ladung. Bei Anwesenheit eines Ionenpaareagenzes spricht man von Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie (IP-RPC). Ein Modell für die IP-RPC ist das dynamische Ionenpaarmodell. Dabei geht man davon aus, dass die hydrophoben Gruppen der deprotonierten Säuren oder Basen (so genannte Amphiphile) an der unpolaren stationären Phase aufgrund von solvophoben WW adsorbiert werden. Anschließend erfolgt auch eine elektrostatische WW (19). In der analytischen Praxis ist die Konzentration der Ionenpaarreagenzien meistens nicht hoch genug, dass sie die ganze stationäre Phase vollkommen belegen. Aufgrund dessen werden Proteine und Peptide sowohl nach ihren solvophoben als auch elektrostatischen Wechselwirkungen adsorbiert (20-23). In Abbildung 7 ist das Prinzip der IP-RPC schematisch zu sehen.

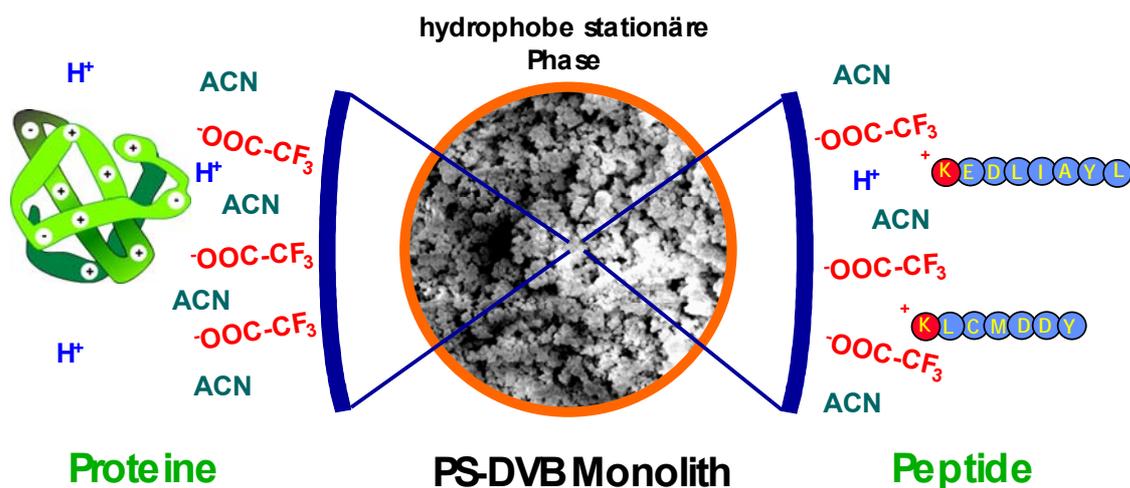


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Mechanismus der IP-RPC (24).

Routinemäßig wird meistens Trifluoressigsäure (TFA) als Ionenpaareagenz verwendet. Sie besitzt eine hohe UV-Durchlässigkeit bis 205 nm und kann wegen ihrer Flüchtigkeit leicht aus dem Eluat entfernt werden. Typischerweise werden zu den Lösungsmittelsystemen 0.05% bis 0.1% TFA beigegeben, was in der wässrigen Phase einen pH-Wert von ca. 2.2 ergibt (1). Für Peptide ist die IP-RPC die Methode der Wahl. Bei Proteinen dagegen kann es zu Problemen kommen, da der organische Lösungsanteil die Löslichkeit herabsetzt und eventuell die Denaturierung des Proteins bewirkt. Für rein analytische Zwecke kann das jedoch ein Vorteil sein, weil

die Peaks dadurch unter Umständen schärfer werden. Dies macht die Methode jedoch für präparative Isolierungen unbrauchbar, bei denen ein Maximum der Wiederfindung an biologischer Aktivität gefordert wird. Abbildung 8 stellt eine hochauflösende Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie von Proteinen dar.

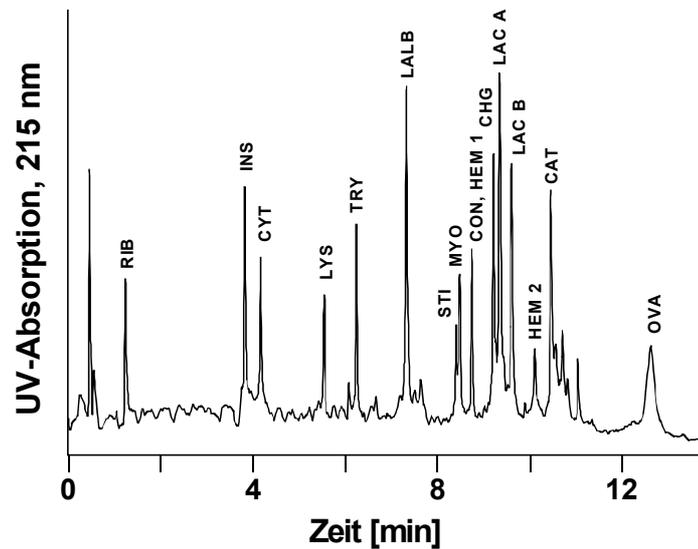


Abbildung 8. Hochauflösende Ionenpaar-Umkehrphasen Chromatographie von Proteinen (25).

Bedingungen: Säule, Octadecyl-poly-(Styrol/Divinylbenzol), 2.3 μm Teilchengröße, nicht porös, 53 \times 4 mm I.D.; Laufmittel, (A) 0.10% TFA, 15% Acetonitril in Wasser, (B) 0.10% TFA, 60% Acetonitril in Wasser; linearer Gradient, 20-85% B in 15.0 min; Flussrate, 0.56 ml/min; Temperatur, 80 $^{\circ}\text{C}$; Peakzuweisung, RIB, Ribonuklease A; INS, Insulin; CYT, Cytochrom C; LYS, Lysozym; TRY, Trypsin; LALB, α -Lactalbumin; STI, Trypsin Inhibitor; MYO, Myoglobin; CON, Conalbumin; HEM, Hämoglobin; CHG, Chymotrypsinogen A; LAC A, β -Lactoglobulin A; LAC B, β -Lactoglobulin B; CAT, Catalase; OVA, Ovalbumin.

1.5.3 Mikro-HPLC

Aufgrund der einfachen Handhabung und hohen Robustheit der eingesetzten HPLC-Systeme werden bei der routinemäßigen klassischen HPLC-Analytik überwiegend Säulen mit Durchmessern zwischen 2 und 4.6 mm I.D. eingesetzt, welche bei Flussraten von 0.2 – 1.0 ml/min betrieben werden können. Mikro HPLC-Systeme bringen einige Hardwarenachteile. Säulen der mikro-HPLC haben Innendurchmesser von 0.05 bis 1.0 mm. Die verwendeten Pumpen müssen Eluentenflüsse von 0.2 bis 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ im Gradienten erzeugen können. Das Volumen der eingesetzten Detektorzellen muss den kleinen Peakbreiten der miniaturisierten Trennmethode angepasst werden können (bspw. 3 oder 45 nL-Zellvolumen). Trotz dieser Nachteile wurde Anfang der 70er Jahren die Forschung auf dem Bereich der Miniaturisierung der HPLC-Systeme begonnen (26-28). Diese miniaturisierten HPLC-Systeme bieten nach derzeitigem Stand der Entwicklung zahlreiche Vorteile gegenüber den klassisch-konventionellen analytischen Anlagen:

- **geringer Verbrauch an stationären und mobilen Phasen, verringerte Probenmengen**

Beim Übergang von der klassisch-konventionellen HPLC in die Mikro-HPLC müssen alle im Laufe der Messung auftretenden Volumina durch den so genannten Miniaturisierungsfaktor (eng: Downscalingfaktor) f angepasst werden.

$$f = \frac{d_{konv.}^2}{d_{mikro}^2}$$

$d_{konv.}$ Säulendurchmesser der konventionellen Säule [m]

d_{mikro} Säulendurchmesser der miniaturisierten Säule [m]

Diesen Miniaturisierungsfaktor (f) nutzt man beim Übergang zum Mikro-System, um das Optimum der chromatographischen Bedingungen zu realisieren. Angenommen in der analytischen Praxis wird eine Säule mit einem Innendurchmesser von 4.6 mm und einem optimalen Fluss von 1 mL/min verwendet, so können aus Tabelle 7 die

erforderlichen Volumina und Flussraten für die entsprechende Semimikro-, Mikro-, und Kapillar-HPLC zur Anpassung der Methode entnommen werden, unter der Voraussetzung, dass das Säulenmaterial gleich bleibt. Abgesehen von den Parametern der HPLC-Instrumentierung müssen anhand des Downscaling-Faktors die auf die Säule aufgegebenen Probenmengen dementsprechend angepasst werden. Es besteht ansonsten die Gefahr einer Massenüberladung der Trennsäule, so dass es zu einer Verringerung der Trennleistung kommen kann.

Tabelle 7. Zellvolumina und Flussraten für konventionelle und Mikro-HPLC.

Säulendurchmesser	Flussrate	Detektorzellenvolumen
4.6 mm	1 ml/min	10 µl
1.0 mm	47 µl/min	470 nl
360 µm	6 µl/min	60 nl
180 µm	1.5 µl/min	15 nl
100 µm	470 nl/min	4.7 nl
50 µm	120 nl/min	1.2 nl
20 µm	30 nl/min	0.3 nl

- **erhöhte Massenempfindlichkeit mit konzentrationsempfindlichen Detektoren**

Unter der Voraussetzung, dass die minimal detektierbare Konzentration des Detektors konstant bleibt, verringert sich die detektierbare Masse bei Erniedrigung des Innendurchmessers der Säule. So konnte das Massendetektionslimit mit einem konzentrationsempfindlichen Detektor deutlich gesenkt werden.

- **Erhöhung der Trennleistung (29)**

Die verbesserte Trennleistung von Mikrosäulen wird auf eine verringerte Flussdispersion innerhalb der Säule und eine homogenere Säulenpackung, welche die stabilisierende Wirkung der Säulenwand über nahezu die komplette Packungsstruktur erfährt, zurückgeführt.

- **Möglichkeit zur direkten Kopplung auch mit anderen Detektionssystemen sowie Massenspektrometrie (30,31)**

Aufgrund der geringen Menge an verfügbarem Probenmaterial nimmt die Verwendung der Mikro-HPLC eine sehr wichtige Rolle innerhalb der biowissenschaftlichen Forschung ein. Wegen der hohen Empfindlichkeit der Massenspektrometrie wird sie in der Bioanalytik als populärste Detektionsmethode eingesetzt. Auch in dieser Arbeit wurde mit der mikro-HPLC-MS-Kopplung gearbeitet.

1.5.3.1 Instrumentelle Aufbauanforderungen der Mikro-HPLC

Der Aufbau eines typischen Mikro-HPLC-Systems ist in Abbildung 9 zu sehen. Vom System her besteht die Mikro-HPLC aus den gleichen Komponenten wie eine konventionelle HPLC-Anlage: a) Gradientenpumpe, b) Injektionseinheit, c) Säulenofen (Säule), d) Detektor und e) Auswerteeinheit.

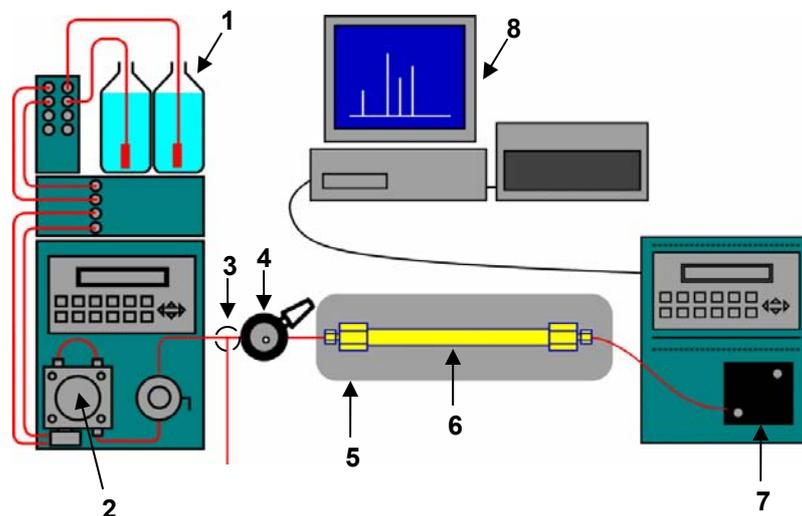


Abbildung 9. Instrumentelles Grundaufbausystem eines Mikro-HPLC-Systems.

Bauteile: 1- Elutionsmittel, 2- Pumpe, 3- T-Stück (Splitt), 4- Probenaufgabensystem, 5- Säulenofen, 6- Säule, 7- Detektor, 8- Auswerteeinheit.

Das Aufbaukonzept eines Mikro-HPLC-Systems muss so sein, dass jegliche Form von signifikanter säulenexterner Bandenverbreiterung, so weit es möglich ist, vermieden wird. Speziell Probenaufgabe-, Detektions- und diverse Zuleitungsvolumina (32,33) müssen berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass das bei der konventionellen HPLC verwendete Equipment wie Pumpen-, Probenaufgabe- und Detektionssysteme nicht als Bestandteil von Mikro-HPLC-Anlagen verwendet werden kann. Pumpenmodule für die Mikro-HPLC müssen einen konstanten Fluss im $\mu\text{l}/\text{min}$ - und nl/min -Bereich fördern können. Um eine optimale Fluss- und Gradientenerzeugung in der Mikro-HPLC zu gewährleisten, wurden zwei technische Ansätze entwickelt. Die erste Variante besteht in der Verwendung von Mikro-Spritzenpumpen mit miniaturisierten Pumpenköpfen, Ventilen und Mischkammern. Der Vorteil bei dieser Variante liegt in dem geringen Verbrauch an Eluent, da die Erzeugung einer konstanten Flussrate unabhängig vom Druckabfall und der direkten Einstellung der Flussrate über die Säule abläuft. Die zweite Möglichkeit der Erzeugung der niedrigen Flüsse ist der Einsatz von konventionellen Gradientenpumpen. Hier kann man den geeigneten Fluss über die Kapillarsäule einstellen durch das Splitten des von der Pumpe fließenden primären Flusses (34). Im Prinzip kann so jede beliebige konventionelle Gradientenpumpe mit Hilfe eines T-Stücks in ein Mikro bzw. Nano-Gradientensystem umgewandelt werden. Das Anpassen der Miniaturisierung der UV/Vis-Detektorzellen zu den Mikro-HPLC-Systemen ist auch von großer Bedeutung für eine effektive Detektion von sehr schmal eluierenden Peakbanden, wobei lange Zeit keine zufriedenstellenden Ergebnisse zu Reduzierung der Bandenverbreiterungen erzielt werden konnten (35). In der Praxis für eine minimale Bandenverbreiterung sollte das Detektionsvolumen ein Zehntel des kleinsten Peakvolumens im Chromatogramm nicht überschreiten. Es sind verschiedene UV/Vis-Detektorzellen für die Mikro-HPLC anzutreffen. Das Z-Zellendesign liefert einen langen Lichtweg von 3-10 mm und zeichnet sich durch eine hohe Detektionsempfindlichkeit aus.

1.6 Massenspektrometrie für die Bioanalytik

1.6.1 Einführung in die Technik der Massenspektrometrie

Unter Massenspektrometrie versteht man generell eine Analysetechnik zur Bestimmung der molekularen Massen freier Ionen im Vakuum. Ende der 80er Jahre wurde die Massenspektrometrie eine der wichtigsten Analysen- bzw. Detektionstechniken für die Bioanalytik aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit (bis zeptomol-Bereich (36)), Schnelligkeit und hohem strukturellem Informationsgehalt. Die Massenspektrometrie kann uns verschiedene Informationen liefern wie (37-41):

- die Identifizierung bekannter Substanzen in komplexen Gemischen aufgrund ihres Molekulargewichtes und des Fragmentierungsverhaltens.
- die quantitative Bestimmung bekannter Moleküle in komplexen Gemischen.
- die Strukturanalyse unbekannter Substanzen, was im Wesentlichen die Molekulargewichtbestimmung, den Nachweis von funktionellen Gruppen sowie die Bestimmung der linearen Sequenz der Biopolymeren einschließt.

All diese Beispiele zur Informationsfähigkeit der Massenspektrometrie kann man vermehren. Aus diesen Gründen spielt das massenspektromerische Verfahren als Detektionsmethode in der Bioanalytik eine sehr große Rolle.

1.6.2 Das generelle Aufbauprinzip eines Massenspektrometers

Ein Massenspektrometer besteht aus drei Haupteinheiten (s. Abbildung 10). Die erste Einheit ist die sogenannte *Ionenquelle*, in der aus einer Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird. Das zweite Modul eines Massenspektrometers ist der *Massenanalysator*, wo der Ionentrennungsprozess nach dem Masse/Ladungsverhältnis geschieht. Anschließend werden die Ionen in einer *Detektionseinheit* detektiert, die das Massenspektrum der gemessenen Ionen liefert.

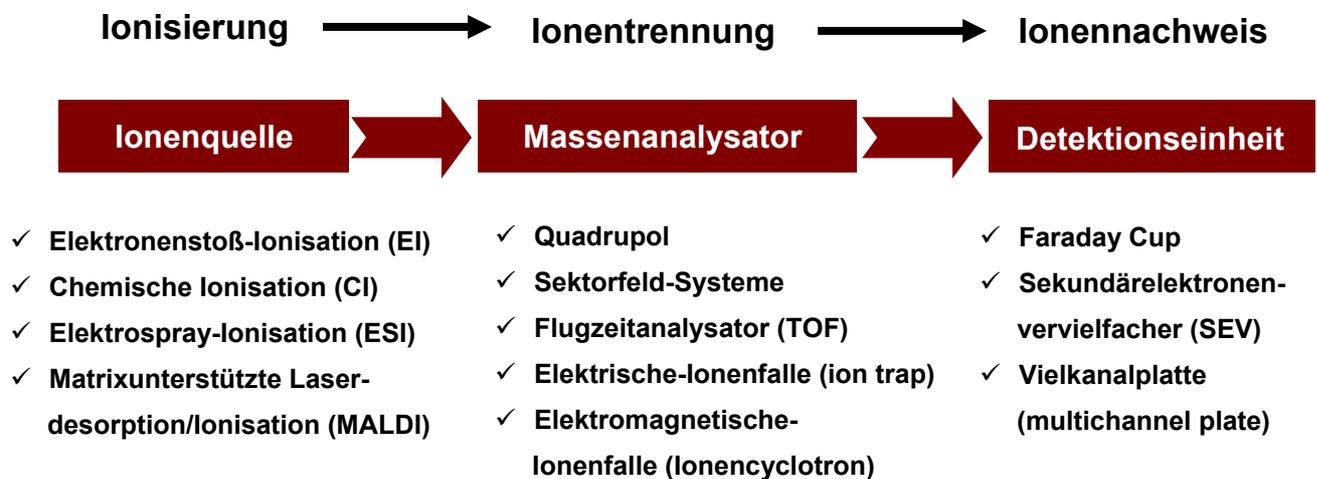


Abbildung 10. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers (1).

Die für diese Arbeit relevanten massenspektrometrischen Messungen wurden ausschließlich an Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometern (ESI-MS) durchgeführt. In Kapitel 1.6.2.1 wird auch speziell nur auf das Prinzip dieser Ionisationsmethode und Massenanalyse näher eingegangen. In den folgenden Kapiteln wird ein kurzer Überblick über Grundprinzipien anderer gängiger, in Abbildung 10 dargestellter Ionisationsmethoden und Massenanalysatoren gegeben.

1.6.2.1 Das Prinzip der Elektrospray Ionisation (ESI)

Unter ESI versteht man die Dispersion einer Flüssigkeit in kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Die ESI (42-45) hat sich zu einer sehr leistungsfähigen Ionisationsmethode für die Bioanalytik als massenspektrometrische Analyseverfahren von Biopolymeren und anderen Substanzen entwickelt. Dabei wird eine mit Probelösung gefüllte Stahlkapillare oder Quarzkapillare an eine Hochspannungsquelle (meist 1-5 kV) angeschlossen. Im starken elektrostatischen Feld verformt sich die Flüssigkeitsoberfläche an der Austrittsstelle der Kapillare zum sogenannten „Taylor-Kegel (46)“ (s. Abbildung 11).

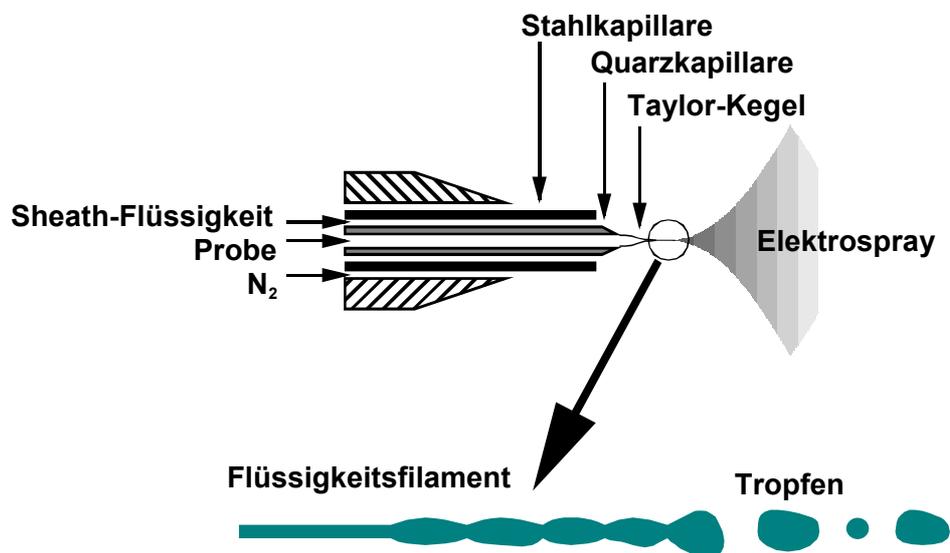


Abbildung 11. Schematische Darstellung des generellen ESI-Prozesses und Bildung der Tropfen.

Die in der praktischen Durchführung generellen ESI-Prozesse erfolgen in vier Schritten:

- **Bildung kleiner geladener Tröpfchen aus der zuströmenden Probenflüssigkeit.**

Bei der ESI wird die Probenlösung zuerst durch eine Kapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Durch die Spannung kommt es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Das elektrische Feld durchdringt die Probenlösung und in ihr befindliche Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Dabei bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und über die Bildung eines Taylor-Kegels als feines Aerosol aus der Kapillare austreten.

- **Verneblung des Lösungsmittels und dadurch Zunahme der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche.**

Ein neutrales, mäßig geheiztes, trockenes Trägergas wie Stickstoff wird häufig benutzt um die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels zu unterstützen. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tropfengröße, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfenoberfläche zunimmt (s. Abbildung 12).

- **Ständiger Zerfall der Tröpfchen in immer kleinere Tröpfchen (Coulomb-Explosion).**

Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das sog. Rayleigh-Limit wird, zerfallen die Tropfen wegen der Abstoßung von gleichartigen Ladungen (Coulomb-Explosionen (47)) in noch kleinere Tröpfchen (s. Abbildung 12).

Nach der Rayleigh-Gleichung ist die maximale Ladung eines sphärischen Flüssigkeitsteilchens durch die folgende Gleichung gegeben:

$$Q^2 = 8\pi^2 \varepsilon_0 \gamma d^3$$

Q maximale Ladung [C]

ε_0 Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit [$J^{-1} C^2 m^{-1}$]

γ Oberflächenspannung [$N m^{-1}$]

d Durchmesser des sphärischen Partikels [m]

- **Transfer der Ionen in die Gasphase (Desolvatisierung).**

Für die Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren mehrere Modellvorstellungen. Durch den wiederholten Prozess von Verdampfung und Tropfenexplosion wird der Durchmesser immer weiter verkleinert. Der Mechanismus der Ionenbildung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das erste Model ist das Charged Residue Model. Das Charged Residue Model (CRM, Modell des geladenen Rückstands) geht davon aus, dass letztlich winzige Tropfen übrigbleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten (48). Ein weiter entwickeltes Konzept zur Ionenverdampfung wurde von Iribarne und Thomson vorgelegt (Ion Evaporation Model (Ionenemissionsmodell, IEM) (49,50). Beim IEM wird angenommen, dass bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden. Aufgrund von Größe und Oberflächenladungsdichte ist das elektrostatische Feld an der Tropfenoberfläche ausreichend stark, um die Solvatationsenergie der Ionen an der Oberfläche zu überwinden, so dass dadurch der Übergang des „nackten Ions“ in die Gasphase ermöglicht wird (s. Abbildung 12).

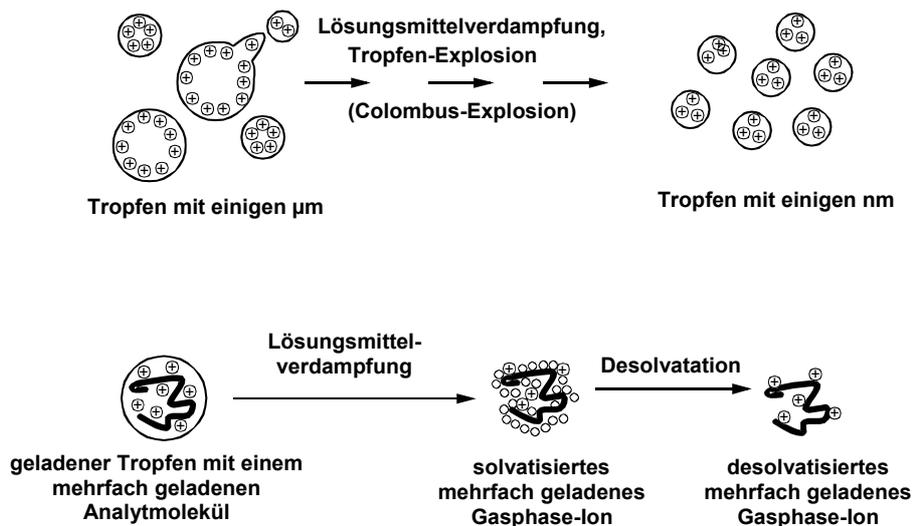


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Vernebelung und Ionenbildung nach dem Ion Evaporation Model (von Iribarne und Thomson).

Die durch Befreiung vom Lösungsmittel entstandenen Ionen werden unter dem Einfluss des elektrischen Feldes in das Vakuum beschleunigt. Eine Fokussierung des Ionenstrahls erfolgt durch Systeme von dynamischen und elektrostatischen Linsen, häufig werden im hochfrequenten Modus betriebene, auf Durchgang geschaltene Multipole (Hexa- oder Octapol) verwendet. Lösungsmitteldämpfe werden über eine oder mehrere Stufen von Vakuumpumpen zwischen Öffnung der Transferkapillare und dem Massenanalysator entfernt.

1.6.2.2 Detektionseinheit

Die *Sekundärelektronenvervielfacher-Detektoren* (SEV) sind sehr nachweisempfindlich und haben kurze Ansprechzeiten. Ein einzelnes, auf die erste Dynode (Konversionsdynode) des SEV auftreffendes Ion generiert 2 bis 3 Elektronen, die in der Dynodekaskade eine Elektronenlawine auslösen. Nachteilig sind die begrenzte Lebensdauer und der relativ hohe Preis. Die begrenzte Lebensdauer ergibt sich aus dem Effekt, dass die detektierten Ionen als Neutralteilchen auf der Oberfläche der Konversionsdynode bleiben und dort die Elektronenaustrittsarbeit beeinflussen.

1.6.3 Betriebsweise des Ionenfallen-Massenanalysators

Das Prinzip der Ionenfalle (51) wurde zu Beginn der 1950er Jahre vom deutschen Nobelpreisträger Wolfgang Paul entwickelt und entsprach in der zugrundeliegenden Theorie in etwa der eines Quadrupol-Massenfilters. Im Gegensatz zu einem konventionellen Massenspektrometer (z.B. Quadrupol-MS oder Sektorfeld-MS), in dem die Ionisierung und Massenanalyse kontinuierlich, aber örtlich getrennt, nämlich in der Ionenquelle und dem Quadrupolfeld bzw. Magnetfeld erfolgt, arbeitet die Ionenfalle diskontinuierlich. Eine Skizze des Aufbaus des verwendeten Ionenfallenmassenspektrometers (von Bruker Daltonik GmbH) ist in Abbildung 13 dargestellt.

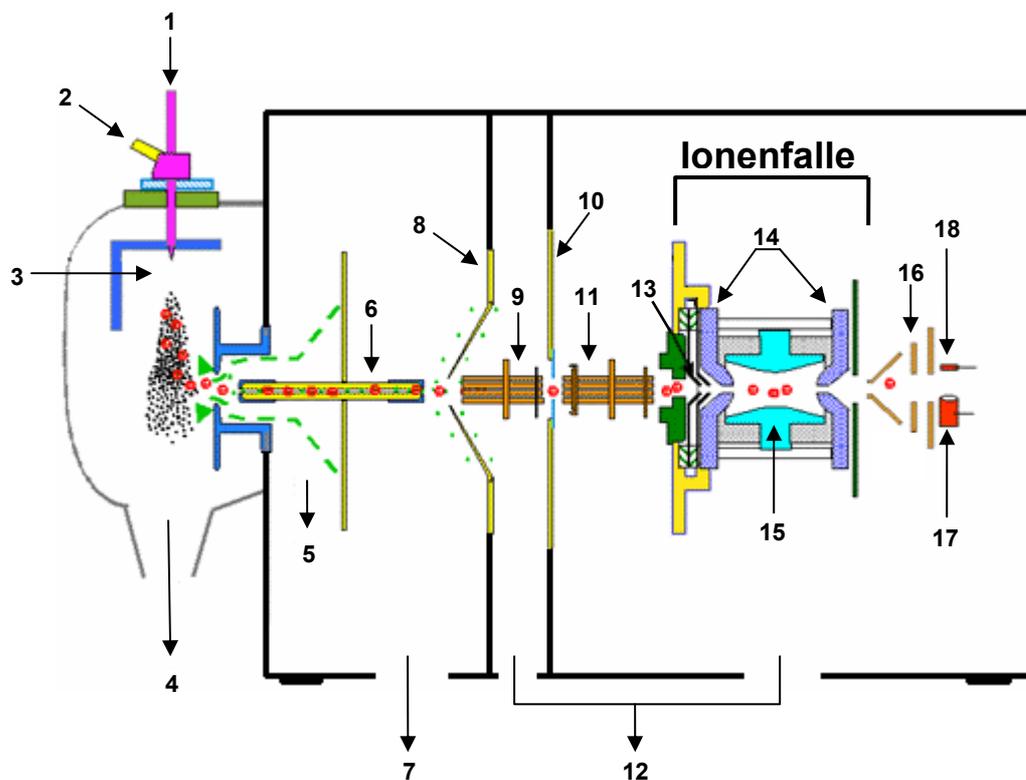


Abbildung 13. Schematische Darstellung des verwendeten Esquire-HCT (Bruker) Ionenfallenmassenspektrometers.

Bauteile: 1- Probeneinlaß, 2- Zerstäubergas (Nebulizer Gas, N_2), 3- Nebulizer, 4- Abfall, 5- N_2 -Strom (Trockengas), 6- Glasskapillare, 7- Vorvakuumpumpe, 8- Skimmer, 9- Octapol-1, 10- Partition, 11- Octapol-2, 12- Turbopumpe, 13- Splitlinse, 14- Endkappen, 15- Ringelektrode, 16- Fokussierungslinse, 17- Elektronvervielfacher, 18- Konversionsdynode.

Das Prinzip des Ionenfallenmassenspektrometers basiert auf dem Einfangen von Ionen mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Das Feld wird durch Endkappenelektroden und Ringelektrode erzeugt. Zwischen der Ringelektrode und den Endkappenelektroden liegt eine Überlagerung einer Gleich- und einer Wechselspannung an. Während einer Analyse wird die Amplitude des Wechselspannungsanteils erhöht. Je nach m/z -Verhältnis werden die Ionen bei Erreichen unterschiedlicher Amplituden aus der Ionenfalle geschleudert und gelangen zum Detektor. Die erreichbare Auflösung ist etwa so groß wie die von Quadrupol-Massenspektrometern. Ionenfallen-Massenspektrometer werden im Gegensatz zu den vorher genannten Spektrometertypen nicht kontinuierlich betrieben, das heißt Ionisation und Analyse laufen nacheinander und nicht parallel ab. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, werden die in der Quelle erzeugten Ionen mit Hilfe einer vorgeschalteten Ionenoptik (Skimmer, Ocktopol-Linsen) fokussiert und zur Ionenfalle aufgrund des Druckunterschiedes zwischen Glaskapillare und Ionenfalle transportiert. Um die Ionen nach dem Eintreten in die Falle einzufangen, wird diese mit Heliumgas bis zu einem Druck von etwa 1×10^{-5} mbar gefüllt. In Folge dessen wird ihre kinetische Energie bzw. ihre Geschwindigkeit verringert. Dadurch werden Ionen mit guter Effizienz in der Falle eingefangen. Während eines Messzyklus werden Ionen für eine begrenzte Zeit (einige Millisekunden) in der Falle akkumuliert. Danach wird das Eintreten weiterer Ionen in die Falle verhindert, d.h. die Transferstrecke zwischen Ionenquelle und Falle wird durch Änderung der anliegenden elektrischen Potentiale aus zwei Gründen blockiert. Der erste Grund ist, um eine zu hohe Raumladungsdichte von Ionen in der Falle zu vermeiden, die zu gegenseitiger Abstoßung der gespeicherten Moleküle und damit zu einer inkorrekten Bestimmung ihrer Masse führen würde. Der zweite Grund ist die Verhinderung einer Beeinflussung der Massenanalyse durch nachfolgende Ionen. Zur Detektion werden die Ionen schließlich nacheinander, mittels Resonanzanregung aus der Falle ejiziert. Eine Änderung der an der Ringelektrode angelegten Wechselspannung und der an den Endkappen angelegten Gleichspannung führt dazu, dass die Bahnen der Ionen mit ansteigendem m/z -Verhältnis instabil werden und somit aus der Falle ausgeworfen werden. Dort werden sie mit einem Detektor, welcher aus einer Konversionsdynode und einem SEV besteht, nachgewiesen. Vorteile der Ionenfalle im Vergleich zu Quadrupolmassenanalysatoren sind ihre hohe Nachweisempfindlichkeit und Scangeschwindigkeit. Ein weiterer Vorteil ist, dass man auch mehrere MS/MS-

Operationen nacheinander durchführen kann, was für die Strukturaufklärung und Identifizierung der Analytmoleküle von großem Vorteil ist.

1.6.3.1 Dekonvolution und Auswertung der ESI-Massenspektren

Die typischen ESI-Massenspektren hochmolekularer Substanzen weisen glockenförmige Verteilung von aufeinander folgenden Peaks auf. Sie entsprechen einer Serie von mehrfach positiv oder negativ geladenen Molekülionen. Abbildung 14 stellt als Beispiel ein typisches ESI-Massenspektrum von einem Protein (Myoglobin, vom Pferd) mit dem zugehörigen dekonvoluierten Spektrum, durch das das Molekulargewicht des analysierten Proteins berechnet wird.

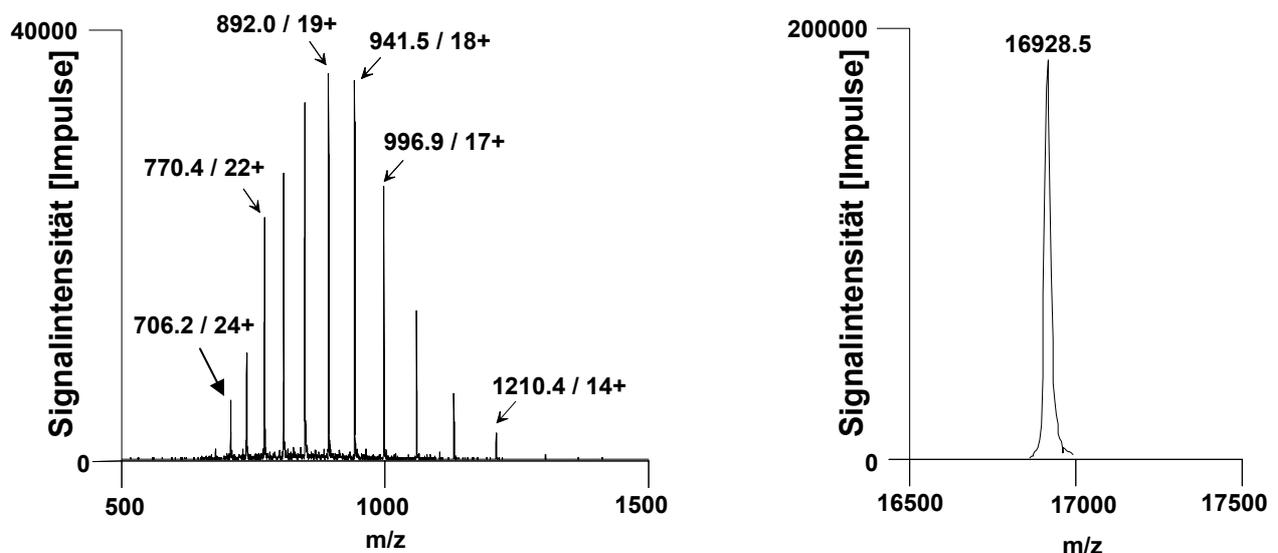


Abbildung 14. ESI-Massenspektrum von Myoglobin (Pferd) Ladungsverteilung (links) und das daraus ermittelte Dekonvolutionsspektrum (rechts).

Die m/z-Signale der mehrfach geladenen Analyten können über einen einfachen Algorithmus in das einfach geladene m/z-Verhältnis bzw. in das ungeladene Molekulargewicht umgerechnet werden (Dekonvolution). Je nach Höhe des Ladungszustandes und Auflösung des verwendeten Massenspektrometers kann die

Masse der untersuchten Substanz direkt aus dem erhaltenen M/z-Signal und dem dazugehörigen ¹³C-Isotopenmuster ermittelt werden. Die Anzahl der Ladungen (n) eines mehrfach geladenen Molekülions und damit die Molmasse (M) können aus den gemessenen m/z-Verhältnissen m_i zwei beliebig aufeinander folgender Molekülionen ($m_2 > m_1$) aus einer Ladungsverteilung berechnet werden.

$$m_1 = \frac{M + nX}{n} \quad \text{(Gleichung-1)}$$

$$m_2 = \frac{M + (n-1)X}{(n-1)} \quad \text{(Gleichung-2)}$$

wobei X die Masse der Ladungsträger ist, d.h. für die Addition eines Protons ist $X=+1$ im positiven Modus, für Subtraktion eines Protons ist $X= -1$ im negativen Modus.

Aus den Gleichungen -1 und -2 lässt sich n wie folgt berechnen:

$$n = \frac{m_2 - X}{m_2 - m_1} \quad \text{(Gleichung-3)}$$

$$M = n(m_1 - X) \quad \text{(Gleichung-4)}$$

1.6.4 Identifizierung von Proteinen und Peptiden durch ESI-MS/MS

1.6.4.1 Fragmentierung von Peptidionen

In der Bioanalytik ist die Peptidanalyse nach proteolytischem Verdau der Proteine die am häufigsten angewandte Strategie zur Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie. Die aus den verdauten Proteinen erhaltenen Peptide ermöglichen die Identifizierung der entsprechenden Proteine anhand deren gemessener molekularer Massen. Führt man nur MS-Analysen zur Identifizierung der Peptide anhand ihrer gemessenen Massen durch, nennt man diese Art der Identifizierung als Peptid-Massen-Fingerprinting (**PMF**). Für die in der Bioanalytik charakteristischen komplexen Proben stellt das PMF jedoch nicht die Methode der Wahl dar. Hier überlagern sich meist die Signale von mehreren verdauten Proteinen im Massenspektrum, wodurch eine eindeutige Zuordnung der Peptidmassen überhaupt nicht mehr oder nur noch sehr schwierig möglich ist. Des Weiteren muss für ein zufriedenstellendes PMF ein Massenspektrometer mit einer sehr hohen Massengenauigkeit zur Verfügung stehen.

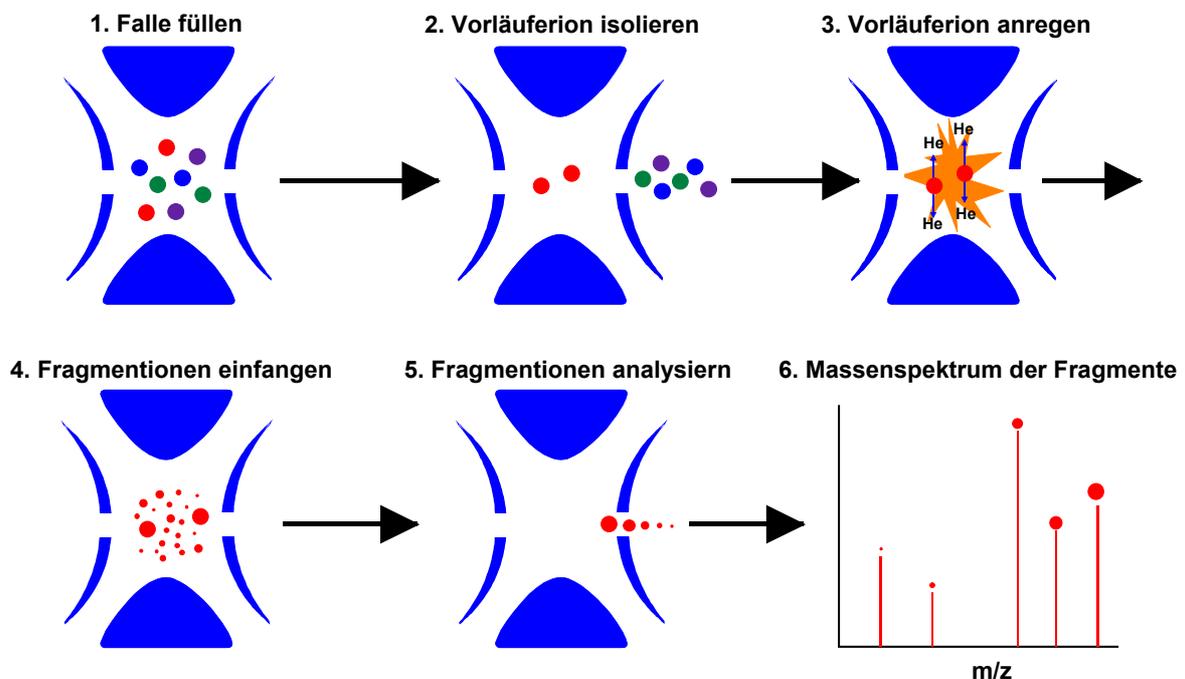


Abbildung 15. Schematische Darstellung zur Erzeugung von Fragmentationen mittels eines Ionenfallen-Massenanalysators.

Die Alternative zum PMF stellt das Peptid-Fragment-Fingerprinting (**PFF**) dar. Aufgrund einer unzureichenden Massengenauigkeit der verwendeten Massenspektrometer bei der genauen Zuordnung der Peptide, nutzt man neben den Massen der Peptide auch zusätzlich Peptidfragmente zur Charakterisierung (MS/MS-Analyse). Obwohl bei der ESI selbst üblicherweise keine Fragmente erzeugt werden, kann man durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) Fragmentationen erzeugen. Wie in Abbildung 15 illustriert ist, erfolgt die Erzeugung von Fragmentationen mittels eines Ionenfallen-Massenspektrometers (Tandem Massenspektrometrie-MS/MS) in sechs Schritten. Im *ersten Schritt* werden Ionen in der Falle eingefangen. Danach werden aus diesen in der Falle eingefangenen Ionen Vorläuferionen ausgewählt, indem alle anderen Ionen aus der Falle entfernt werden (*der zweite Schritt*). Das Entfernen der restlichen Ionen aus der Falle geschieht durch das Anlegen einer Resonanz-Hochfrequenz-Wechselspannung an den Endkappen, wodurch die Ionen in axialer Richtung beschleunigt werden. Nach dem dritten Schritt werden die verbliebenen Ionen mit in der Falle vorhandenem Heliumgas gestoßen. Dadurch erhält das Ion so viel innere Energie, dass die Dissoziation geschieht (*der dritte Schritt*). Die so erhaltenen Fragmentationen (*der vierte Schritt*) werden daraufhin sequenziell aus der Ionenfalle entfernt (*der fünfte Schritt*). Anschließend werden diese Fragmentationen analysiert (*der sechste Schritt*). Ein grundlegendes Wissen über die möglichen Peptid-Fragmentierungsreaktionen ist unablässig um die aufgenommenen MS/MS Spektren zu interpretieren. Abbildung 16 zeigt MS/MS-Fragmentationenserien eines Peptides und ein dazugehöriges MS/MS Fragmentationenspektrum. Wie bereits in Abbildung 16 zu sehen ist, treten drei verschiedene Arten von sequenzspezifischen Fragmentierungsreaktionen auf, die das Peptid entlang der Peptidkette spalten. Diese drei Fragmentierungsreaktionen können folgendermaßen eingeleitet werden:

- 1) die vom Carbonyl Kohlenstoff ausgehende C-C Bindung,
- 2) die vom Carbonyl Kohlenstoff ausgehende C-N Bindung (Peptidbindung),
- 3) die vom Carbonyl Stickstoff ausgehende N-C Bindung.

In dem Fall, dass die Ladung am N-terminalen Fragment verbleibt, entstehen die N-terminalen Sequenzionen, die als A-, B- und C-Typ klassifiziert werden. Auf der anderen Seite bilden sich die C-terminalen Sequenzionen vom X-, Y- und Z-Typ, wenn das C-terminale Fragment die Ladung trägt (52).

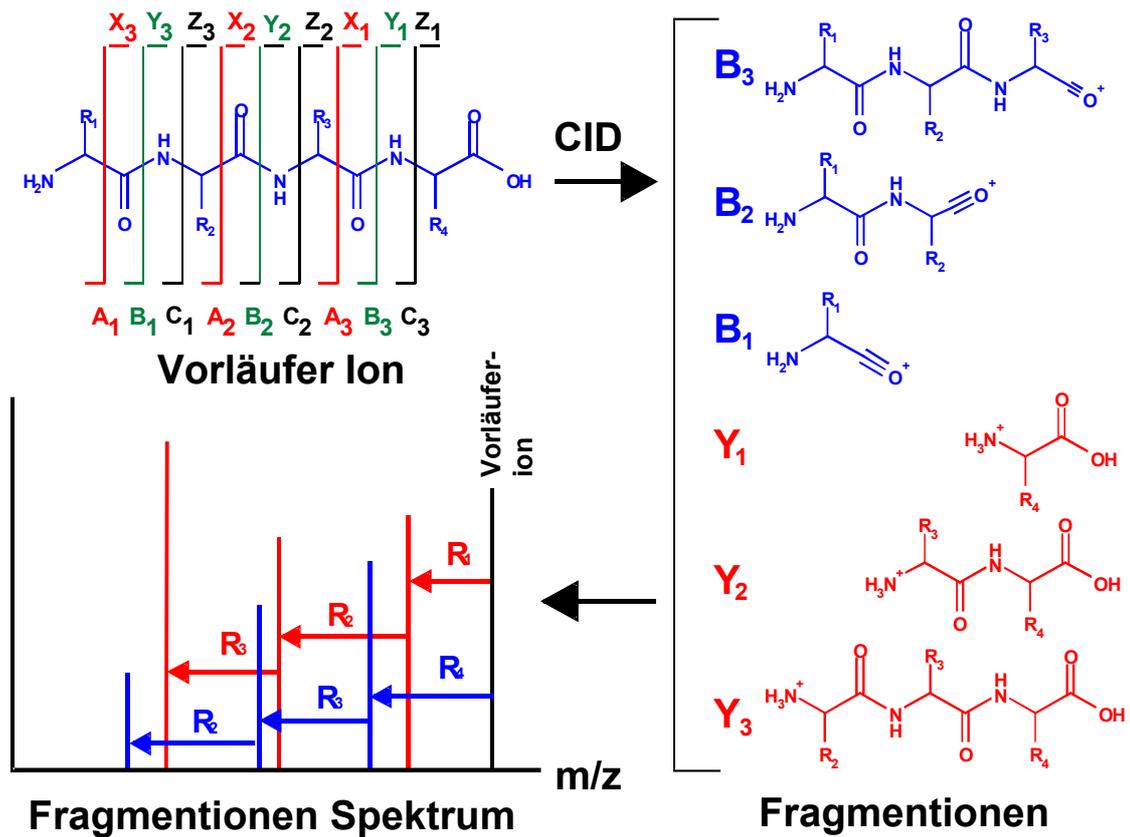


Abbildung 16. MS/MS-Fragmentationsserien und dazugehöriges MS/MS Fragmentationenspektrum.

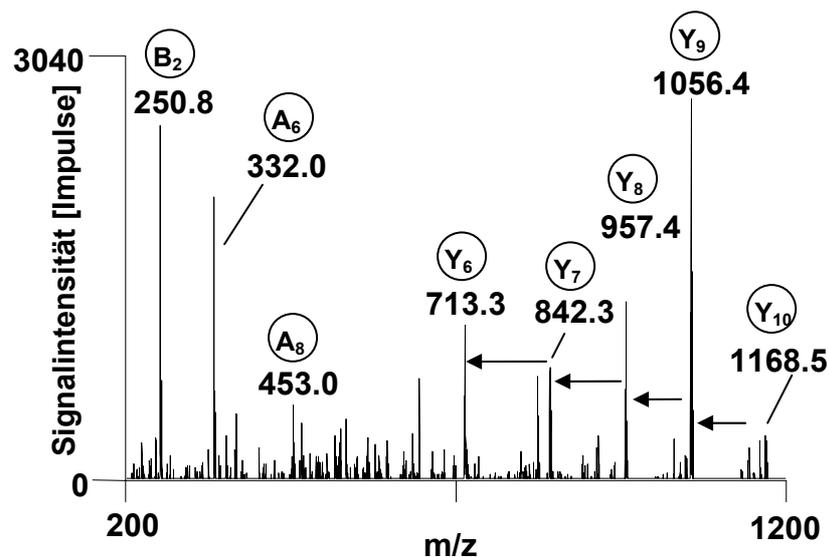


Abbildung 17. MS/MS-Fragmentationenspektrum des Peptides HLVDEPQNLIK ($M_w = 1304.6$ Da) vom Rinder Serumalbumin.

In Abbildung 17 ist ein MS/MS-Fragmentationenspektrum des Peptides **HLVDEPQNLIK** vom Rinder Serumalbumin als Beispiel dargestellt. Besonders kommen Ionen der B- und der Y- Serien häufig vor. Beide Serien entstehen durch Spaltung der bevorzugt fragmentierenden Bindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem Amid-Stickstoff der Peptidkette. Eine Peptidsequenzanalyse von mit FAB erzeugten Peptid-Molekülionen wurde von Hunt gezeigt (53). In den ersten Untersuchungen zur Peptidsequenzierung wurde erkannt, dass eine komplette Sequenzierung über die Peptid-Fragmentationen schwierig ist, dass aber eine Teilsequenz praktisch immer erhalten wird (54), eine Beurteilung, die nach wie vor gültig ist.

1.7 Einführung in die Glutenchemie

Die Forschung auf dem Gebiet der Gluten Proteine hat in den letzten Jahren sehr große Bedeutung in der Nahrungsmittelindustrie gewonnen. Glutenproteine präsentieren den größten Bestandteil (bis etwa 80%) der gesamten Weizenproteine (55) und sind die wichtigsten bestimmenden Faktoren der viskoelastischen Eigenschaften des Teigs (56,57). Ein weiterer wichtiger Faktor hat das Interesse der Bio- und Medizinwissenschaften, die qualitative Bestimmung bzw. Charakterisierung dieser Glutenproteine betreffend, geweckt: durch die Aufnahme kleinster Mengen dieser Proteine in den Körper kann eine Krankheit, die sogenannte „ZÖLIAKIE“ (eng, Celiac Disease (58-60)) ausgelöst werden. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Peptide der α -Gliadine toxisch sind (61). In Abbildung 18 ist die Nomenklatur und Klassifizierung der Gluten Proteine schematisch dargestellt:

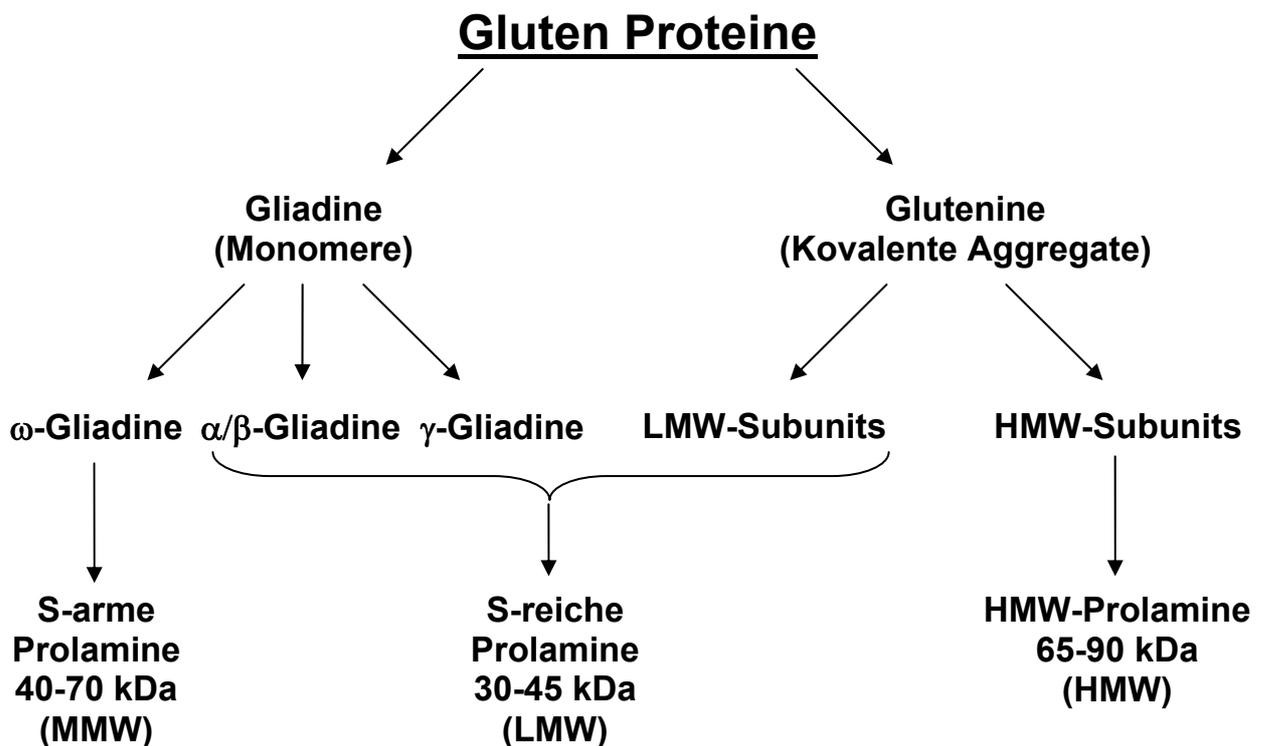


Abbildung 18. Nomenklatur und Klassifizierung der Gluten Proteine (62).

1.7.1 Eigenschaften von Gluten

Gluten Proteine, die auch als Prolamine bezeichnet werden, sind die gummiartigen Proteinmassen, die übrig bleiben, nachdem der Weizenteig gewaschen wurde, um Stärke zu entfernen (63,64). Außerdem sind diese Proteine auch in Gersten- (Hordeine), Roggen- (Secaline) und Haferarten (Avenine) zu finden (65,66). Gluten enthält Hunderte von Proteinbestandteilen, welche entweder als Monomere oder verknüpft durch intermolekulare Disulfidbindungen als Oligo- oder Polymere vorliegen (64). Sie zeigen Aminosäurezusammensetzungen, die einen hohen Anteil an Glutamin (ca. 35 mol%), Prolin (ca. 15 mol%) und hydrophoben Aminosäuren (ca. 19 mol%) enthalten. Gluten Proteine werden herkömmlich nach ihren Löslichkeitseigenschaften (Alkohol-Wasser) in monomere Gliadin- und polymere Glutenin-Fractionen unterteilt (67,68). (s. Abbildung 18.)

1.7.1.1 Eigenschaften von Gliadinen

Gliadine (69-71) sind die monomeren Proteine, die entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in der sauren Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch die 2D-Koordinaten in α , β , γ und ω Fraktionen unterteilt werden (72). Abgesehen von ihrer Löslichkeit in wässrigem Alkohol (60-70% Ethanol) repräsentieren sie etwa die Hälfte der Gluten Proteine (55,73-75).

Wie aus der Abbildung 18 zu erkennen ist, gehören ω -Gliadine zu der **Medium-Molecular-Weight** Gruppe (**MMW**) der Gluten Proteine. Nach weiteren Studien von Kasarda et al. über ω -Gliadine aus verschiedenen Weizenarten hat sich gezeigt, dass sie in zwei sogenannte ω 5- und ω 1,2-Typ Untergruppen unterteilt werden (76), deren Nomenklatur auch auf ihrer Mobilität in der sauren PAGE basiert. Typisch für die ω -Gliadine ist, dass sie wiederholende Sequenzeinheiten wie **PQQQF** und **PQQPFPQQ** besitzen. Die ω 5-Typ Gliadine haben höheren Anteil an Glutamin (Q, \approx 56%) und Phenylalanin (F, \approx 9%) im Vergleich zu den ω 1,2-Typ Gliadinen, wohingegen Prolin (P) weniger als \approx 20% ausmacht (77). Im Gegenteil zu den anderen Gluten Proteintypen konnte eine vollständige Sequenzierung von ω -Gliadinen bis heute nicht realisiert werden. Vom Aufbau her fehlen bei ω -Gliadinen die Cysteinreste und sie

haben nur einen geringen Methioninanteil. Deshalb werden diese Gliadintypen als schwefelarme (S-poor) Prolamine klassifiziert (78). Die Länge dieser Proteine liegt bei 400-500 Aminosäuren.

Die andere Gruppe von Gliadinen ist die sogenannte **Low-Molecular-Weight** Gruppe (**LMW**), die auch als schwefelreiche (S-rich) Prolamine klassifiziert werden (79). Die Länge dieser Proteintypen variiert zwischen etwa 250 und 300 Aminosäuren. Zu dieser Gruppe gehören α/β -Gliadine und LMW-Untereinheit Glutenine, die etwa 80% der Glutenproteine repräsentieren. Sie unterscheiden sich erheblich im Gehalt einiger Aminosäuren, z.B. Tyrosin. Jeder von den beiden Typen hat zwei unterschiedliche N- und C-terminale Regionen (80). Die N-terminale Domäne (\approx 40-50% des Gesamtproteins) besteht meistens aus den sich wiederholenden Reihenfolgen von Glutamin, Prolin, Phenylalanin und Tyrosin. Die sich wiederholenden Einheiten von α/β -Gliadinen sind die Peptide wie **QPQPFPQQPYP**, die sich üblicherweise 5-mal wiederholen und Änderungen in der Sequenzabfolge aufweisen. Die typische Einheit der γ -Gliadine ist **QPQQPFP**, die bis zu 16-mal wiederholt wird. Sie kann auch mit zusätzlichen Aminosäuren wie **Q**, **QQ**, **TQQ**, **LQQ** oder **PQQ** vermischt werden. Innerhalb der C-terminalen Regionen sind α/β - und γ -Gliadine homolog. Sie stellen Reihenfolgen dar, die nicht wiederholt werden. Sie haben weniger Glutamin und Prolin als die N-terminale Region. Mit einigen Ausnahmen enthalten α/β -Gliadine sechs und γ -Gliadine acht Cysteine, die in der C-terminalen Region angelegt sind; sie bilden drei und vier homologe intramolekulare Querverbindungen (81). Untersuchungen über die Sekundärstruktur haben gezeigt, dass die N-terminalen Regionen von α/β - und γ -Gliadinen ähnlich wie bei ω -Gliadinen durch die β -Konformation charakterisiert werden (82). Die sich nichtwiederholende C-terminale Region enthält beträchtliche Anteile von α -Helix und β -Faltblatt Strukturen. Zwar ist die Verteilung der gesamten Gliadine in unterschiedlichen Arten von der Weizenvarietät (Genotyp) sowie von den Wachstumsbedingungen (Boden, Klima, Düngung) stark abhängig, es kann allerdings generalisiert werden, dass α/β - und γ -Gliadine Hauptbestandteile sind, während die ω -Gliadine geringere Anteile aufweisen, wie in Tabelle 8 erkennbar ist (83).

Tabelle 8. Charakterisierung der Gluten Proteintypen (64).

Partielle Aminosäure Zusammensetzung [%]						
Typ	Anteil ^a [%]	Gln [Q]	Pro [P]	Phe [F]	Tyr [Y]	Gly [G]
ω5-Gliadine	3-6	56	20	9	1	1
ω1,2-Gliadine	4-7	44	26	8	1	1
α/β-Gliadine	28-33	37	16	4	3	2
γ-Gliadine	31-35	35	17	5	1	3
x-HMW-GS	4-9	37	13	0	6	19
y-HMW-GS	3-4	36	11	0	5	18
LMW-GS	19-25	38	13	4	1	3

^a Entsprechend der gesamten Glutenproteine.

1.7.1.2 Eigenschaften von Gluteninen

Glutenine bilden den größten Beitrag an den Teigeigenschaften. Ihre Menge im Weizenmehl beträgt 20-40 mg/g. Im Allgemeinen haben Glutenine Längen von 600-800 Aminosäuren. Die Gesamtheit der Glutenine wird überwiegend durch die (**Low Molecular Weight-Glutenin Subunit, LMW-GS** (84-86)) gebildet. Der Anteil dieser LMW-GS entspricht bis zu 20% der Gesamtglutenproteine (83). Wie in **Tabelle X1** zu sehen ist, ähneln die LMW-GS in ihren molekularen Massen und der Aminosäurestruktur den α/β- und γ-Gliadinen. Eine weitere Art der Glutenine sind die HMW Gluteninuntereinheiten (**High Molecular Weight-Glutenin Subunit, HMW-GS** (87-89)). Die Gruppe der HMW-GS enthält zwei unterschiedlichen Proteinarten, das x-HMW und das y-HMW, wobei diese Nomenklatur auf ihren SDS-PAGE Mobilitäten basiert. Sie werden durch verhältnismäßig hohe Anteile an Glycin (**G**) und Tyrosin (**Y**) charakterisiert. Glutamin (**Q**), Glycin (**G**) und Prolin (**P**) betragen 65-70% der Gesamtaminosäuresequenz. Die Gluteninuntereinheiten sind durch intermolekulare Disulfidbindungen miteinander verknüpft. Nach der Reduktion der Disulfidbindungen zeigen die resultierenden Monomere eine Löslichkeit im wässrigen Alkohol vergleichbar mit den Gliadinen.

1.8 Einführung in die Glutentoxizität

Der Zusammenhang zwischen Glutenproteinen und der Zöliakiekrankheit (90) hat das Interesse der Medizin (91,92) und Lebensmittelindustrie (93-95) in den letzten Jahren stark geweckt. Sowohl zu der qualitativen als auch der quantitativen Bestimmung auf Intakt- und Peptidebene dieser Proteine wurden verschiedene Analysetechniken eingesetzt, wobei Massenspektrometrie wegen ihrer Eleganz und Schnelligkeit häufig benutzt wird (55,69,96).

1.8.1 Zöliakie

Zöliakie (eng. celiac disease, CD) wurde zuerst durch den griechischen Mediziner Aretaeus (100 Jahre n. Chr.) als ein Syndrom bei Erwachsenen beschrieben. Die erste komplette Beschreibung der Zöliakie konnte jedoch erst Ende des 19. Jahrhunderts in der klassischen Monographie von Samuel Gees veröffentlicht werden (92). Später, im Jahre 1954 beschrieb L. W. Paulley genau die pathologischen Effekte der Zöliakie (97). Im allgemeinen wird Zöliakie als eine dauerhafte Intoleranz gegen Glutenproteine definiert, die eine komplizierte Mischung der Speicherproteine (Glutenine und Gliadine) im Weizen und in anderen Getreiden wie Gerste, Roggen und Hafern vorkommen (98-101). Die Zöliakie beschränkt sich auf Menschen europäischer Abstammung und kommt durch die koloniale Expansion europäischer Völker auf allen Kontinenten vor. Neue epidemiologische Studien belegen eine Inzidenz von bis zu 1% in den westlichen Gesellschaften (102). Die Mehrheit der Fälle bleibt jedoch aufgrund den minimalen Symptomen der Krankheit undiagnostiziert, was als so genannte stille Zöliakie bezeichnet wird (103). Das beweist auch, dass Zöliakie mit den genetischen Einflussfaktoren zusammenhängt (104-106), wobei die Gene HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 bei bis 97% der Zöliakiekranken eine große genetische Rolle spielen (107,108). Auf der anderen Seite erklärt das den Grund warum Zöliakie nicht bei allen Menschen ausgelöst wird, trotz des Konsums von aus Weizen hergestellten Produkten. In Abbildung 19 wird der Mechanismus der Zöliakie schematisch dargestellt.

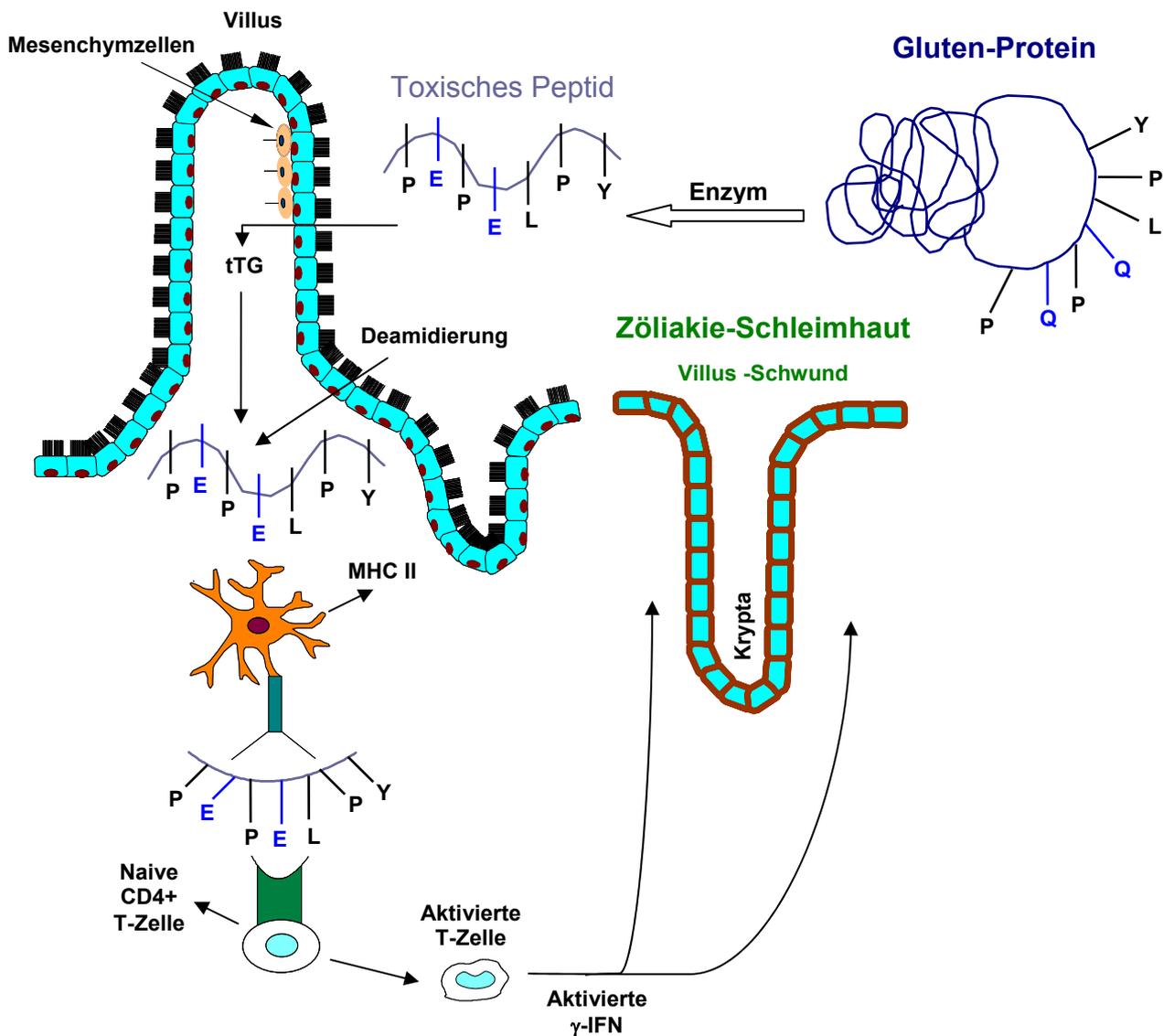


Abbildung 19. Schematischer Entwurf des Mechanismus der Zöliakie für Interaktion zwischen dem Darm und dem Immunsystem während der Proteinverarbeitung (109).

Die Krankheit wird ausgelöst durch die Einnahme kleinster Mengen von Gluten-Proteinen mit der Nahrung. Diese Gluten-Proteine, die als Auslöser der Zöliakiekrankheit gelten, werden auch als toxisch bezeichnet, wobei Gliadine den größten toxischen Effekt aufweisen (105,110,111). Im Gegensatz zu den Gliadinen wurden Glutenine entweder als wenig toxisch oder toxisch beschrieben (61). Studien haben gezeigt, dass die Glutenine generell durch Gliadine kontaminiert sind

(112,113). Die durch enzymatischen Verdau der Gluten-Proteine entstandene Peptide werden als toxische Peptide benannt. Diese toxischen Peptide entstehen vor allem durch den Verdau durch Magenenzyme und/oder Pankreasenzyme (61,114-117). In der Tabelle 9 sind einige Aminosäuresequenzen von bekannten toxischen Gliadinpeptiden aufgelistet, die in der Fachliteratur angegeben sind.

Tabelle 9. Bezüglich Zöliakietoxizität getestete Aminosäuresequenzen der Glutenpeptide (61).

	Peptidsequenz	Gemittelte Masse	Gliadin-Typ	Referenz
#1	LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF	3911.05	α -GLIADIN	(118)
#2	VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL	2479.78	α -GLIADIN	(119)
#3	VQQQQFPGQQQPFPPQQPYPQPQPFPSQQPY	3666.03	α -GLIADIN	
#4	VRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQF	3493.93	α -GLIADIN	(120)
#5	LGQQQPFPPQQPYPQPQPFPSQQPY	2923.24	α -Synthetic-GLIADIN	(120,121)
#6	PQPQPFPSQQPY	1413.55	α -Synthetic-GLIADIN	(121,122)
#7	LGQQQPFPPQQPY	1527.70	α -Synthetic-GLIADIN	
#8	LGQGSFPSQQN	1162.22	α -Synthetic GLIADIN	(123)
#9	LGQQQPFPPQQPYPQPQPF	2222.49	α -Synthetic GLIADIN	(124-126)

Die Präsentation von toxischen Gluten-Peptiden auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) löst in Zöliakie-Patienten die Proliferation von T-Zellen aus. Die T-Zell-Antwort führt einerseits zu einer Interferon vermittelten Entzündungsreaktion gefolgt von einer Veränderung der charakteristischen Darmzottenatrophie der Mucosa und andererseits zur Produktion von Antikörpern. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt das Enzym Gewebe (Tissue)-Transglutaminase (tTG), die von der Kalziumkonzentration abhängt (127). Sie wird aus Subepithelzellen des Darms bei mechanischem Stress oder Entzündungsprozessen freigesetzt und durch hohe extrazelluläre Calcium-Konzentrationen aktiviert. Durch das Enzym tTG wird eine selektive Deamidierung bewirkt, wobei Glutaminreste in Glutaminsäuren umgewandelt werden (128). Die spezifische Deamidierung von Gluten-Peptiden und die Bildung von Aggregaten durch Crosslinking erhöhen die Aufnahme und Präsentation durch APCs und verstärken die Bindung an HLA-DQ2/HLA-DQ8, welche wiederum zur Steigerung der T-Zellantwort führen.

Die klassische Zöliakie manifestiert sich in Symptomen sowie Durchfall (med., diarrhea) (129), Müdigkeit (med., fatigue) (130) oder Erbrechen (med., anacatharsis) (131). Wegen der Malabsorption über einen längeren Zeitraum kann es zu sekundären Symptomen kommen (132). Zu diesen gehören zum Beispiel autoimmune hämolytische Anämie, Epilepsie, psychische Veränderungen wie Depression (132,133). Die bis jetzt einzige verfügbare Therapie basiert auf einer streng glutenfreien Diät (134-136).

1.9 Literaturverzeichnis

1. Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum, Heidelberg.
2. Yaghoubian, S., Filosa, M.F., and Youson, J.H. (2001) Proteins immunoreactive with antibody against a human leptin fragment are found in serum and tissues of the sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **129**, 777-85.
3. Alderete, J.F. (1983) Identification of immunogenic and antibody-binding membrane proteins of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.*, **40**, 284-91.
4. Bruce, J.E., Anderson, G.A., Wen, J., Harkewicz, R., and Smith, R.D. (1999) High-mass-measurement accuracy and 100% sequence coverage of enzymatically digested bovine serum albumin from an ESI-FTICR mass spectrum. *Anal. Chem.*, **71**, 2595-9.
5. Chen, C.T., Chen, W.Y., Tsai, P.J., Chien, K.Y., Yu, J.S., and Chen, Y.C. (2007) Rapid enrichment of phosphopeptides and phosphoproteins from complex samples using magnetic particles coated with alumina as the concentrating probes for MALDI MS analysis. *J. Proteome Res.*, **6**, 316-25.
6. Yu, Y.Q., Gilar, M., Lee, P.J., Bouvier, E.S., and Gebler, J.C. (2003) Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal. Chem.*, **75**, 6023-8.
7. Finehout, E.J. and Lee, K.H. (2003) Comparison of automated in-gel digest methods for femtomole level samples. *Electrophoresis*, **24**, 3508-16.
8. Zhu, W., Venable, J., Giometti, C.S., Khare, T., Tollaksen, S., Ahrendt, A.J., and Yates, J.R. (2005) Large-scale muLC-MS/MS for silver- and Coomassie blue-stained polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **26**, 4495-507.
9. Hedstrom, M., Grey, C.E., Gaspar, S., and Mattiasson, B. (2007) Miniaturized on-line digestion system for the sequential identification and characterization of protein analytes. *J. Chromatogr. A*, **1146**, 17-22.

10. Slys, G.W. and Schriemer, D.C. (2003) On-column digestion of proteins in aqueous-organic solvents. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1044-50.
11. Richard J. Simpson Buch: Proteins and Proteomics a Laboratory Manuals.
12. Barrett, A., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F. Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press, 1998.
13. Kastner, M. (2000) *Protein liquid chromatography*. Elsevier, Amsterdam.
14. Hearn, M.T.W. (1991) *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*. VCH Publishers, New York.
15. Mant, C.T. and Hodges, R.S. (1991) *High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Ranton.
16. Katz, E.D. (1996) *High-Performance Liquid Chromatography: Principles and Methods in Biotechnology*. John Wiley and Sons, Chichester.
17. Thevenon, G. and Regnier, F.E. (1989) Reversed-phase liquid chromatography of proteins with strong acids. *J. Chromatogr.*, **476**, 499-511.
18. Horvath, C., Melander, W., and Molnar, I. (1976) Solvophobic Interactions in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases. *J. Chromatogr.*, **125**, 129-156.
19. Patthy, M. (1994) Explanation of the selectivity differences between reversed-phase ion-pair chromatographic system containing trifluoroacetate or heptafluorobutyrate as pairing ion. *J. Chromatogr. A*, **660**, 17-23.
20. Melander, W.R., El Rassi, Z., and Horváth, C. (1989) Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography: Effect of salts on the retention of proteins. *J. Chromatogr.*, **469**, 3.
21. Bartha, A. and Stahlberg, J. (1990) Retention Prediction Based on the Electrostatic Model of Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography: Effect of Pairing Ion Concentration. *J. Chromatogr.*, **535**, 181-187.

22. Bartha, A. and Stahlberg, J. (1994) Electrostatic Retention Model of Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **668**, 255-284.
23. Chen J.-G., Weber, S.G., Glavina, L.L., and Cantwell, F.F. (1993) Electrical Double-Layer Models of Ion-Modified (Ion-Pair) Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **656**, 549-576.
24. Toll, H. Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit der Elektrospray-Massenspektrometrie als Methode für die Analytik von Peptiden und Proteinen. 2005. Saarbrücken, Germany, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
25. Huber, C.G., Kleindienst, G., and Bonn, G.K. (1997) Application of Micropellicular Poly-styrene/divinylbenzene Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. *Chromatographia*, **44**, 438-448.
26. Tsuda, T. and Novotny, M. (1978) Band-broadening phenomena in microcapillary tubes under the conditions of liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **50**, 632-4.
27. Ishii, D., Asai, K., Hibi, K., Jonokuchi, T., and Nagaya, M. (1977) A study of micro-high-performance liquid chromatography. I. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **144(2)**, 157-68.
28. Scott, R.P.W. and Kucera, P. (1976) The exclusion properties of some commercially available silica gels. *J. Chromatogr.*, **125**, 251-63.
29. Karlsson, K.-E. and Novotny, M. (1988) Separation Efficiency of Slurry Packed Liquid Chromatography Microcolumns with Very Small Inner Diameters. *Anal. Chem.*, **60**, 1662-1665.
30. Krejci, M., Tesarik, K., and Pajured, J. (1981) Flow characteristics and technology of capillary columns with inner diameters less than 15 μ m in liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **218**, 167.

31. Gluckman, J. , Hirose, A., McGuffin, V.L., and Novotny, M. (1983) Performance Evaluation of Slurry-Packed Capillary Columns for Liquid Chromatography. *Chromatographia*, **17**, 303.
32. Scott, R.P.W. and Simpson, C.F. (1982) Determination of the Extracolumn Dispersion Occurring in the Different Components of a Chromatographic System. *J. Chromatogr. Sci.*, **20**, 62-66.
33. Novotny, M. (1988) Recent Advances in Microcolumn Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **60**, 500A-510A.
34. Chervet, J.P., Meijvogel, C.J., Ursem, M., and Salzmann, J.P. (1992) Recent advances in capillary liquid chromatography-delivery of highly reproducible microflows. *LC GC*, **10**, 140-148.
35. Tsuda, T., Hibi, K., Takeuchi, T., and Ishii, D. (1978) *J. Chromatogr. J. Chromatogr.*, **158**, 227.
36. Andren, P.E., Emmett, M.R., and Caprioli, R.M. (1994) Micro-Electrospray- Zeptomole-Attomole per Microliter Sensitivity for Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 867-869.
37. Kurono, S., Kurono, T., Komori, N., Niwayama, S., and Matsumoto, H. (2006) Quantitative proteome analysis using D-labeled N-ethylmaleimide and ¹³C-labeled iodoacetanilide by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 8197-209.
38. Hardouin, J. (2007) Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry. *Mass Spectrom.*
39. Frare, E., Mossuto, M.F., Polverino de Laureto, P., Dumoulin, M., Dobson, C.M., and Fontana, A. (2006) Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis. *J. Mol. Biol.*, **361**, 551-61.

40. Jia, Y., Wang, G., Xie, H., Dai, X., Wang, Y., Wang, W., Xu, M., Wang, R., and Yao, C. (2007) Quantitative determination of helicid in rat plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and its application to preliminary pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **847**, 72-7.
41. Dal Piaz, F. , De Leo, M., Braca, A., De Simone, F., Morelli, I., and De Tommasi, N. (2005) Electrospray ionization mass spectrometry for identification and structural characterization of pregnane glycosides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1041-52.
42. Yamashita, M. and Fenn, J.B. (1988) *Phys. Chem. Phys. Chem.*, **88**, 4671.
43. Edmonds, C.G., Loo, J.A., Barinaga, C.J., Udseth, H.R., and Smith, R.D. (1989) Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.*, **474**, 21-37.
44. Banks, J.F. and Whitehouse, C.M. (1996) Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Methods Enzymol.*, **270**, 486-519.
45. Kebarle, P. (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 804-817.
46. Wilm, M.S. and Mann, M. (1994) Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, **136**, 167-180.
47. Tang, K. and Gomez, A. (1994) On the Structure of an Electrostatic Spray of Monodisperse Droplets. *Phys. Fluids*, **6**, 2317-2332. Notes: English Article.
48. Mack, L.L., Kralic P., Rheude A., and Dole M. (1970) *J. Chem. Phys. J. Chem. Phys.*, **52**, 4977.
49. Iribarne, J.V. and Thomson, A. (1976) On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *J. Chem. Phys.*, **64(6)**, 2287-94.

50. Kebarle, P. and Tang, L. (1993) From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase. The Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **65**, 972A-986A.
51. Paul W. and Steinwedel, H. S. US Patent. 60.
52. Roepstorff, P. and Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601.
53. Hunt, D.F., Bone, W.M., Shabanowitz, J., Rhodes, J., and Ballard, J.M. (1981) *Anal. Chem.*, **53**, 1704-1706.
54. Roepstorff, P., Hojrup, P., and Moller, J. (1985) *Biomed. Mass. Spectrom.*, **12**, 181-189.
55. Mamone, G., Ferranti, P., Chianese, L., Scafuri, L., and Addeo, F. (2000) Qualitative and quantitative analysis of wheat gluten proteins by liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 897-904.
56. Muccilli, V., Cunsolo, V., Saletti, R., Foti, S., Masci, S., and Lafiandra, D. (2005) Characterization of B- and C-type low molecular weight glutenin subunits by electrospray ionization mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics*, **5**, 719-28.
57. Shewry, P.R. , Halford, N.G., and Lafiandra, D. (2003) Genetics of wheat gluten proteins. *Adv. Genet.*, **49**, 111-84.
58. Guandalini, S. (2003) Celiac disease. *School Nurse News*, **20**, 24-7.
59. Leffler, D., Saha, S., and Farrell, R.J. (2003) Celiac disease. *Am. J. Manag. Care*, **9**, 825-31; quiz 832-3.
60. Rossi, T. (2004) Celiac disease. *Adolesc. Med .Clin.*, **15**, 91-103, ix.
61. Stern, M., Ciclitira, P.J., van Eckert, R., Feighery, C., Janssen, F.W., Mendez, E., Mothes, T., Troncone, R., and Wieser, H. (2001) Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **13**, 741-7.

62. Howdle, P.D. (2006) Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 703-6.
63. Stern, M., Ciclitira, P.J., van Eckert, R., Feighery, C., Janssen, F.W., Mendez, E., Mothes, T., Troncone, R., and Wieser, H. (2001) Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **13**, 741-7.
64. Wieser, H. (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food. Microbiol.*, **24**, 115-9.
65. Camafeita, E., Alfonso, P., Mothes, T., and Mendez, E. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: the first non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples. *J. Mass. Spectrom.*, **32**, 940-7.
66. Mazzeo, M.F., De Giulio, B., Senger, S., Rossi, M., Malorni, A., and Siciliano, R.A. (2003) Identification of transglutaminase-mediated deamidation sites in a recombinant alpha-gliadin by advanced mass-spectrometric methodologies. *Protein Sci.*, **12**, 2434-42.
67. Abonyi, T., Kiraly, I., Tomoskozi, S., Baticz, O., Guoth, A., Gergely, S., Scholz, E., Lasztity, D., and Lasztity, R. (2007) Synthesis of gluten-forming polypeptides. 1. Biosynthesis of gliadins and glutenin subunits. *J. Agric. Food. Chem.*, **55**, 3655-60.
68. Alberghina, G., Cozzolino, R., Fisichella, S., Garozzo, D., and Savarino, A. (2005) Proteomics of gluten: mapping of the 1Bx7 glutenin subunit in Chinese Spring cultivar by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 2069-74.
69. Mamone, G., Addeo, F., Chianese, L., Di Luccia, A., De Martino, A., Nappo, A., Formisano, A., De Vivo, P., and Ferranti, P. (2005) Characterization of wheat gliadin proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteomics*, **5**, 2859-65.
70. Patey, A.L. and Waldron, N.M. (1976) Gliadin proteins from Maris Widgeon wheat. *J. Sci. Food Agric.*, **27**, 838-42.

71. Shearer, G., Patey, A.L., and MacWeeny, D.J. (1975) Wheat flour proteins: the selectivity of solvents and the stability of gliadin and glutenin fractions of stored flours. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 337-44.
72. Sexson, K.R. , Wu, Y.V., Huebner, F.R., and Wall, J.S. (1978) Molecular weights of wheat gamma2-, beta6-, alpha7-, alpha8- and alpha9-gliadins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **532**, 279-85.
73. Garcia, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H., and Mendez, E. (2005) Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**, 529-39.
74. Bloch, H.A., Kesmir, C., Petersen, M., Jacobsen, S., and Sondergaard, I. (1999) Identification of wheat varieties using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry and an artificial neural network. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* , **13**, 1535-9.
75. Wieser, H. and Seilmeier, W. (1998) The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *J. Sci. Food Agric.*, **76**, 49-55.
76. Kasarda, D.D., Autran, J.-C., Lew, E.J.-L., Nimmo, C.C., and Shewry, P.R. (1983) N-terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins. Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **747**, 138-150.
77. Seilmeier, W., Valdez, I., Mendez, E., and Wieser, H. (2001) Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. II. Characterization of ω -gliadins. *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 355-363.
78. Shewry, P.R. , Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M., and Mifflin, B.J. (1986) The classification and nomenclature of wheat gluten proteins-a reassessment. *J. Cereal Sci.*, **4**, 97-106.
79. Altschuler, Y., Rosenberg, N., Harel, R., and Galili, G. (1993) The N- and C-terminal regions regulate the transport of wheat gamma-gliadin through the endoplasmic reticulum in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell*, **5**, 443-50.

80. Shewry, P.R. and Tatham, A.S. (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.*, **267**, 1-12.
81. Grosch, W. and Wieser, H. (1999) Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *J. Cereal Sci.*, **29**, 1-16.
82. Tatham, A.S. and Shewry, P.R. (1985) The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of a-, b-, g- and w-gliadins. *J. Cereal Sci.*, **3**, 104-113.
83. Wieser, H. and Kieffer, R. (2001) Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *J. Cereal Sci.*, **34**, 19-27.
84. Long, H., Wei, Y.M., Yan, Z.H., Baum, B., Nevo, E., and Zheng, Y.L. (2005) Classification of wheat low-molecular-weight glutenin subunit genes and its chromosome assignment by developing LMW-GS group-specific primers. *Theor. Appl. Genet.*, **111**, 1251-9.
85. Tosi, P., D'Ovidio, R., Napier, J.A., Bekes, F., and Shewry, P.R. (2004) Expression of epitope-tagged LMW glutenin subunits in the starchy endosperm of transgenic wheat and their incorporation into glutenin polymers. *Theor. Appl. Genet.*, **108**, 468-76.
86. Kohler, P., Belitz, H.D., and Wieser, H. (1993) Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from gamma-gliadins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **196**, 239-47.
87. Cunsolo, V., Foti, S., Saletti, R., Gilbert, S., Tatham, A.S., and Shewry, P.R. (2004) Structural studies of the allelic wheat glutenin subunits 1Bx7 and 1Bx20 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **39**, 66-78.

88. Cunsolo, V., Foti, S., Saletti, R., Gilbert, S., Tatham, A.S., and Shewry, P.R. (2003) Structural studies of glutenin subunits 1Dy10 and 1Dy12 by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 442-54.
89. Garozzo, D., Cozzolino, R., Giorgi, S.D., Fisichella, S., and Lafiandra, D. (1999) Use of hydroxyacetophenones as matrices for the analysis of high molecular weight glutenin mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2084-9.
90. Fasano, A. and Catassi, C. (2001) Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, **120**, 636-51.
91. Branski, D., Fasano, A., and Troncone, R. (2006) Latest developments in the pathogenesis and treatment of celiac disease. *J. Pediatr.*, **149**, 295-300.
92. Chand, N. and Mihas, A.A. (2006) Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J. Clin. Gastroenterol.*, **40**, 3-14.
93. Hekkens, W.T. (1991) The determination of prolamins in gluten-free food. Introductory remarks. *Panminerva Med.*, **33**, 61-4.
94. Dairman, T. (2005) Gluten-free food companies. *Diabetes Self Manag.*, **22**, 101, 103.
95. Sanchez, D., Tuckova, L., Burkhard, M., Plicka, J., Mothes, T., Hoffmanova, I., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2007) Specificity analysis of anti-gliadin mouse monoclonal antibodies used for detection of gliadin in food for gluten-free diet. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2627-32.
96. Wieser, H., Antes, S., and Seilmeier, W. (1998) Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem.*, **75**, 644-650.
97. PAULLEY, J.W. (1954) Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br. Med. J.*, **2**, 1318-21.

98. Dieterich, W., Esslinger, B., and Schuppan, D. (2003) Pathomechanisms in celiac disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **132**, 98-108.
99. Mazzeo, M.F. , De Giulio, B., Senger, S., Rossi, M., Malorni, A., and Siciliano, R.A. (2003) Identification of transglutaminase-mediated deamidation sites in a recombinant alpha-gliadin by advanced mass-spectrometric methodologies. *Protein Sci.*, **12**, 2434-42.
100. de Rosa, A. , Troncone, A., Vacca, M., and Ciacci, C. (2004) Characteristics and quality of illness behavior in celiac disease. *Psychosomatics*, **45**, 336-42.
101. Helms, S. (2005) Celiac disease and gluten-associated diseases. *Altern. Med. Rev.*, **10**, 172-92.
102. Mowat, A.M. (2003) Coeliac disease--a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *The Lancet*, **361**, 1290-2.
103. Cerf-Bensussan, N., Cellier, C., Heyman, M., Brousse, N., and Schmitz, J. (2003) Coeliac disease: an update on facts and questions based on the 10th International Symposium on Coeliac Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **37**, 412-21.
104. Costantini, S., Rossi, M., Colonna, G., and Facchiano, A.M. (2005) Modelling of HLA-DQ2 and its interaction with gluten peptides to explain molecular recognition in celiac disease. *J. Mol. Graph. Model.*, **23**, 419-31.
105. Martucci, S., Fraser, J.S., Biagi, F., Corazza, G.R., Ciclitira, P.J., and Ellis, H.J. (2003) Characterizing one of the DQ2 candidate epitopes in coeliac disease: A-gliadin 51-70 toxicity assessed using an organ culture system. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **15**, 1293-8.
106. Mazzeo, M.F., De Giulio, B., Senger, S., Rossi, M., Malorni, A., and Siciliano, R.A. (2003) Identification of transglutaminase-mediated deamidation sites in a recombinant alpha-gliadin by advanced mass-spectrometric methodologies. *Protein Sci.*, **12**, 2434-42.
107. Sollid, L.M. (2002) Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 647-55.

108. Sollid, L.M., Markussen, G., Ek, J., Gjerde, H., Vartdal, F., and Thorsby, E. (1989) Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J. Exp. Med.*, **169**, 345-50.
109. Mowat, A.M. (2003) Coeliac disease--a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet*, **361**, 1290-2.
110. Biagi, F., Ellis, H.J., Parnell, N.D., Shidrawi, R.G., Thomas, P.D., O'Reilly, N., Corazza, G.R., and Ciclitira, P.J. (1999) A non-toxic analogue of a coeliac-activating gliadin peptide: a basis for immunomodulation? *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **13**, 945-50.
111. Ensari, A., Marsh, M.N., Moriarty, K.J., Moore, C.M., Fido, R.J., and Tatham, A.S. (1998) Studies in vivo of omega-gliadins in gluten sensitivity (coeliac sprue disease). *Clin. Sci. (Lond)*, **95**, 419-24.
112. Kohler, P., Belitz, H.D., and Wieser, H. (1993) Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from gamma-gliadins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **196**, 239-47.
113. Keck, B., Kohler, P., and Wieser, H. (1995) Disulphide bonds in wheat gluten: cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **200**, 432-9.
114. Piper, J.L., Gray, G.M., and Khosla, C. (2004) Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 213-9.
115. Cornell, H.J. (1990) Mucosal digestion studies of whole gliadin fractions in coeliac disease. *Ann. Clin. Biochem.*, **27 (Pt 1)**, 44-9.
116. Caldwell, K.A. (1980) In vitro digestion of gliadin by gastrointestinal enzymes and by pyrrolidonecarboxylate peptidase. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 293-302.
117. Bronstein, H.D., Haeffner, L.J., and Kowlessar, O.D. (1966) Enzymatic digestion of gliadin: the effect of the resultant peptides in adult celiac disease. *Clin. Chim. Acta.*, **14**, 141-55.

118. Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M., and Khosla, C. (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, **297**, 2275-9.
119. Wieser, H., Belitz, H.D., Idar, D., and Ashkenazi, A. (1986) Coeliac activity of the gliadin peptides CT-1 and CT-2. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **182**, 115-7.
120. de Ritis, G., Auricchio, S., Jones, H.W., Lew, E.J., Bernardin, J.E., and Kasarda, D.D. (1988) In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*, **94**, 41-9.
121. Maiuri, L., Troncone, R., Mayer, M., Coletta, S., Picarelli, A., De Vincenzi, M., Pavone, V., and Auricchio, S. (1996) In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol*, **31**, 247-53.
122. Marsh, M.N., Morgan, S., Ensari, A., Wardle, T., Lobley, R., Mills, C., and Aurichio, S. (1995) In-vivo activity of peptides 31- 43, 44- 55, 56- 68 of alpha-gliadin in gluten sensitive enteropathy. *Gastroenterology*, **108**, A871.
123. Mantzaris, G. and Jewell, D.P. (1991) In vivo toxicity of a synthetic dodecapeptide from A gliadin in patients with coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, **26**, 392-398.
124. Sturgess, R., Day, P., Ellis, H.J., Lundin, K.E., Gjertsen, H.A., Kontakou, M., and Ciclitira, P.J. (1994) Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet*, **343**, 758-61.
125. Shidrawi, R.G., Day, P., Przemioslo, R., Ellis, H.J., Nelufer, J.M., and Ciclitira, P.J. (1995) In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. *Scand. J. Gastroenterol.*, **30**, 758-63.
126. Biagi, F., Ellis, H.J., Parnell, N.D., Shidrawi, R.G., Thomas, P.D., O'Reilly, N., Corazza, G.R., and Ciclitira, P.J. (1999) A non-toxic analogue of a coeliac-activating gliadin peptide: a basis for immunomodulation? *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **13**, 945-50.

127. Esposito, C., Paparo, F., Caputo, I., Porta, R., Salvati, V.M., Mazzarella, G., Auricchio, S., and Troncone, R. (2003) Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **98**, 1813-20.
128. Dewar, D.H. , Amato, M., Ellis, H.J., Pollock, E.L., Gonzalez-Cinca, N., Wieser, H., and Ciclitira, P.J. (2006) The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 483-91.
129. Wolf, I., Mouallem, M., and Farfel, Z. (2000) Adult celiac disease presented with celiac crisis: severe diarrhea, hypokalemia, and acidosis.. *J. Clin. Gastroenterol.*, **30**, 324-6.
130. Hin, H., Bird, G., Fisher, P., Mahy, N., and Jewell, D. (1999) Coeliac disease in primary care: case finding study. *B.M.J.*, **318**, 164-7.
131. Schuppan, D. and Esslinger, B. (2003) Endemic sprue (celiac disease) diagnosis, associated diseases and therapy. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **128 Suppl 2**, S69-71.
132. Ciclitira, P.J., King, A.L., and Fraser, J.S. (2001) AGA technical review on Celiac Sprue. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*, **120**, 1526-40.
133. Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O., and Schuppan, D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.*, **3**, 797-801.
134. Rumbo, M., Chirido, F.G., Fossati, C.A., and Anon, M.C. (2001) Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamin antibodies. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5719-26.
135. Case, S. (2005) The gluten-free diet: how to provide effective education and resources. *Gastroenterology*, **128**, S128-34.

136. Brar, P., Kwon, G.Y., Holleran, S., Bai, D., Tall, A.R., Ramakrishnan, R., and Green, P.H. (2006) Change in lipid profile in celiac disease: beneficial effect of gluten-free diet. *Am. J. Med.*, **119**, 786-90.

Kapitel II

Qualitative Bestimmung und Identifizierung von Gliadinen in Weizenextrakt

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die massenspektrometrische Analytik von Glutenproteinen sowohl auf intakter als auch auf Peptidebene wurde von verschiedenen Arbeitskreisen durch verschiedene massenspektrometrischen Verfahren etabliert (1-4). Zur Fertigung der vorgelegten Arbeit wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik GmbH der Generation von 2003 (Bruker Esquire HCT) verwendet. Um eine leistungsfähige und empfindliche Ionenquelle zu haben, wurde eine Tuningmethode mit Hilfe der Direktinfusion von Cytochrom C entwickelt. Unter guter Detektion versteht man vor allem maximales Signal zu Rauschen (S/N) und möglichst hohe Massengenauigkeit. Einige wichtige Voraussetzungen zur Optimierung der Detektion müssen beachtet werden, wie bspw. Elektrospray bei entsprechenden Flussraten oder Spitzenpositionierung der Quarzkapillare für robuste Signale.

Mit Hilfe der entwickelten Tuningmethode sollte in erster Linie versucht werden, die Gliadine anhand ihrer molekularen Massen zu identifizieren. Da jedoch eine Identifizierung allein anhand der intakten molaren Massen der Proteine kaum ausreichend ist, sollten die Identifizierungen mittels Peptidsequenzanalyse einzelner Proteine bestätigt werden. Deswegen wurden die Gliadine viermal enzymatisch verdaut, wobei die ersten Verdaue mit Pepsin (ohne und mit Reduktion) und die zweiten Verdaue mit Chymotrypsin (ohne und mit Reduktion) durchgeführt wurden. Das Ziel dieser Zahl der Verdauvariationen war, diese Proteine über möglichst viele besonders spezifische Peptidsequenzen zu identifizieren. Des Weiteren verfügen diese Glutenproteine über teilweise sehr ähnliche Peptidsequenzen, die eine weitere Identifizierung anderer Proteinfamilien erlauben. Um das Problem der Sequenzähnlichkeit bei diesen Proteinen zu lösen, sollten spezifische Peptidsequenzen mit Hilfe der drei Suchmaschinen Mascot, OMMSA und InsPect und einer erstellten Datenbank identifiziert werden.

2.1 Optimierung des ESI-MS Systems für die Analyse von Gliadinen

2.1.1 Chemikalien und Materialien

Acetonitril (HPLC gradient-grade) wurde bei Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) erworben. Das entionisierte Wasser wurde durch das Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Deutschland) hergestellt. Trifluoressigsäure (TFA), Harnstoff ($\geq 99.5\%$) und Pepsin (vom Schweinemagen) wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz) erworben. Cytochrom C (vom Pferdeherz) und α -Chymotrypsin (von Rinderpankreas) wurden von Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen. Ethanol mit 99.8% Reinheit wurde von Riedel de Haën erworben. Acetonitril (ACN, 99.9%), 4-Vinylpyridin mit einer Reinheit von 95%, Dithiothreitol (DTT, 99%) und Dialyseschlauch (benzoyliert, 9 mm Dicke) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Der Gliadinextrakt (lyophilisiert) wurde vom Institut für Referenzmaterialien und -messungen der Europäischen Union (Belgien) bereitgestellt.

2.1.2 Geräte

Die benutzte Waage (AE163) war von Mettler (Giessen, Deutschland). Für Direktinfusionsmessungen wurden Spritzenpumpen der Firma Cole-Parmer Instrument Company (Serie 74900, Vernon Hills, IL, USA) verwendet. Die dazu verwendeten Glasspritzen wurden bei Hamilton (Bonaduz, Schweiz) erworben. Die Kopplung der Spritzen an die Massenspektrometer erfolgte mit Quarzkapillaren (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) mittels eines Microtight-Unions (Fritz Gyger AG Swiss, Gwatt-Thun, Schweiz) aus Stahl. Für RP-HPLC Analysen wurde ein Ultimate Capillary LC System ausgestattet mit Mikropumpe, Beladungspumpe, Säulenschaltssystem, Autosampler und Säulenofen (LCPackings, Amsterdam, Niederlande) benutzt. Das benutzte Massenspektrometer war eine Ionenfalle Esquire HCT (Bruker, Bremen, Deutschland) ausgestattet mit einer modifizierten ESI-Ionenquelle. Die chromatographische Säule für die RP-HPLC war eine monolithische Kapillarsäule (60 x 0.20 mm ID), die im Labor des Institutes synthetisiert wurde. Diese Säulen sind auch bei LC-Packings kommerziell erhältlich. Als Trapsäule wurde eine monolithische PS/DVB-Kapillarsäule mit den Dimensionen 10 x 0.20 mm ID benutzt.

2.1.3 Aufbau des Sprayer-Systems

Nanospray-Ionenquellen mit Electrospray-Ionisation aus sehr dünnen Kapillaren mit fein ausgezogenen Spitzen von 5-30 μm Innendurchmesser sind für die Analyse von sehr geringen Volumina gut geeignet (5-7). Der Nachteil bei den Nanospray Quellen liegt in der geringeren Robustheit, dass man häufig die Justierung der geometrischen Anordnung aufgrund des möglichen Brechens der Spitze einstellen muss. Besonders im Dauerbetrieb bei der Kopplung mit den chromatographischen Trennsystemen kommen häufig Verstopfungen der Spitze vor, so dass man sie durch Wechseln wiederum justieren muss. Bei der Verwendung von mikro-HPLC-Systemen und den damit verbundenen geringen Flussraten sollte auch der Radius der Kapillarspitze angepasst werden. Deshalb wurde im Arbeitskreis die originale Elektrosprayquelle von Bruker (Stahlnadel) mit 50 μm ID modifiziert und durch eine Quarzkapillare mit den Maßen 90 μm Außendurchmesser und 20 μm Innendurchmesser ersetzt. Zusätzlich wurde die Polyimidschicht an der Spitze dieser Kapillare mittels heißer Schwefelsäure abgeätzt. Danach wurde sie vor dem Einbau in den Sprayer glatt abgeschnitten, was mittels eines Lichtmikroskops überprüft wurde. Diese Kapillare wurde in den Sprayer der klassischen Quelle eingezogen, wie es in Abbildung 20 dargestellt ist. Die Quarzkapillare wurde von der Sprayer-Spitze beginnend durch das Union am Einlass des Sprayers geführt und dort mit Hilfe eines 1/16" Peekschlauches mit 130 μm Innendurchmesser fixiert. Die Kapillarspitze ragte etwa einen halben Durchmesser der Quarzkapillare (durch Lupe kontrolliert) aus der Sprayer-Spitze hervor (8). Eine außerhalb des Sprayers liegende Kapillare führt zu sehr starken und intensiven Spikes im Massenspektrum. Ragt die Kapillare nicht aus dem Sprayer heraus, führt dies zu geringeren Signalen bei den Analysen. Für den elektrischen Kontakt wurde das Ende der 90/20 μm Kapillare durch eine Microtight-Union in Edelstahlversion mit einer 375/20 μm Kapillare verbunden, wo die monolithische Säule zum Anschluss kommt. Ein Vorteil dieser Anordnung gegenüber der klassischen Quelle mit Stahlnadel (mit ca. 50 μm Innendurchmesser) lag an einem geringeren Volumen, aufgrund der Verringerung im Sprayer-Abschnitt, so dass die Bandenverbreiterung nach der chromatographischen Säule sehr gering gehalten werden konnte. Zu den weiteren Vorteilen zählt man die einfache Handhabbarkeit, da die Position des Sprayers fixiert ist. Deshalb ist die Reproduzierbarkeit des MS-Systems gegeben, auch wenn die Spitze ausgetauscht werden muss. Erstellt man eine Tuningmethode für eine

bestimmte Substanz, kann man diese auch noch verwenden, wenn eine andere Kapillare in den Sprayer eingebaut wurde, so dass die Vorbereitungszeit für MS-Analysen deutlich sinkt.

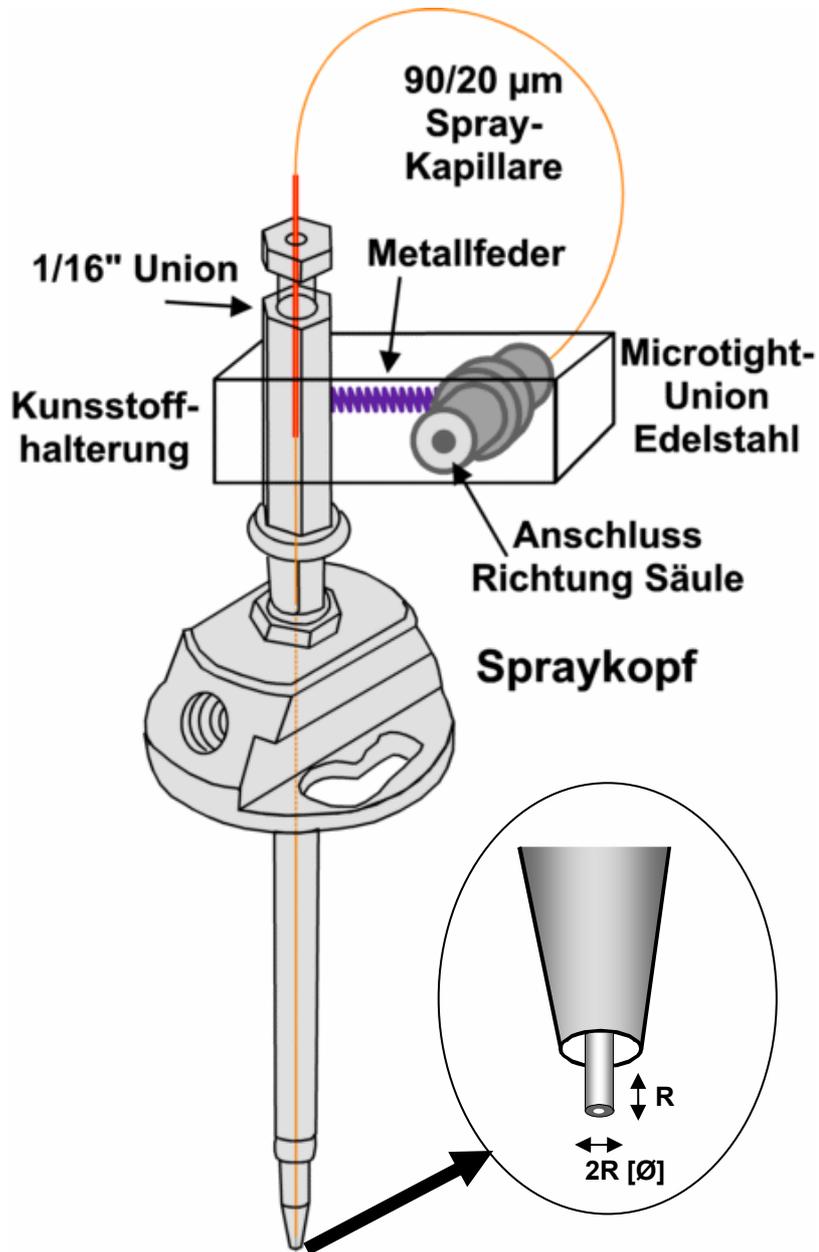


Abbildung 20. Modifizierte Standard-ESI-Quelle mit Halterung und elektrischem Kontakt für das Microtight-Union.

2.1.4 Durchführung der Methodenoptimierung durch Direkteinfusion

Die verwendete Tuningsubstanz sowie der für das Tuning gewählte m/z-Bereich hat einen großen Einfluss auf die Detektierbarkeit von Biopolymeren (9). Besonders für die Detektion von größeren Proteinen hat es sich als günstig erwiesen, ebenfalls hochmolekulare Verbindungen mit höheren Ladungszuständen für ein Tuning zu verwenden. Für die Erstellung der Tuningmethoden wurde als Tuningsubstanz das Standardprotein Cytochrom C (Mr: 12360.1 Da) verwendet. Alle bei dieser Arbeit durchgeführten Tunings wurde mit Hilfe der Expert-Tuningmethode der MS-Software durchgeführt. (s. Abbildung 21)

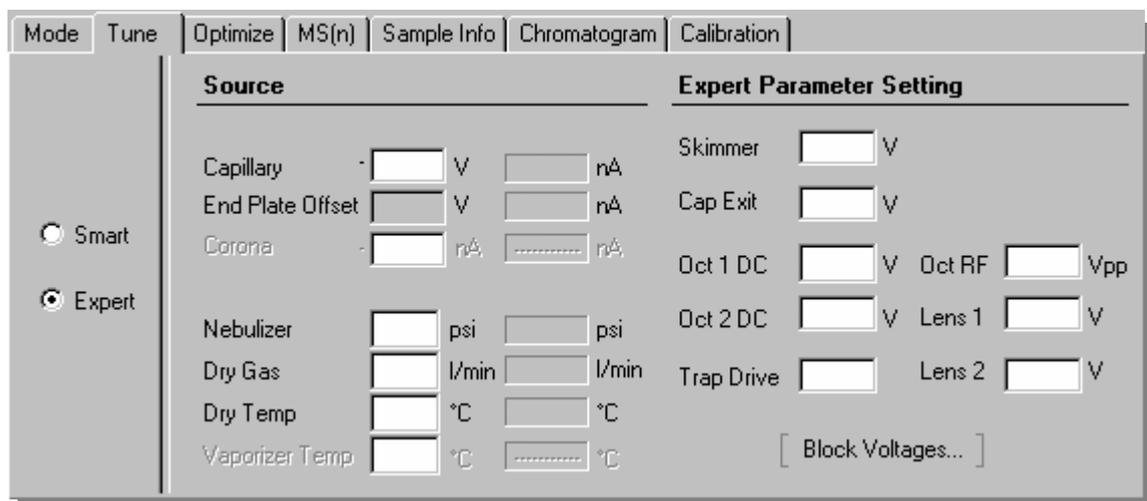


Abbildung 21. Das Esquire-Control Panel für Expert-Tuning.

Weil alle Direktinfusionen bei einer Flussrate von 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt wurden, wurden die Parameter von **Nebulizer** bei 20 psi, **Dry Gas** bei 4.0 l/min und **Dry Temp.** bei 300 °C fixiert, wie es im User Manual Script von Bruker vorgeschlagen war.

Während der Direktinfusion einer Tuningsubstanz stellt das Massenspektrometer alle Parameter in Abbildung 21 für einen frei wählbaren Ladungszustand dieser Substanz automatisch so ein, dass das massenspektrometrische Signal maximiert wird (Optimize Tuning)(s. Abbildung 22).

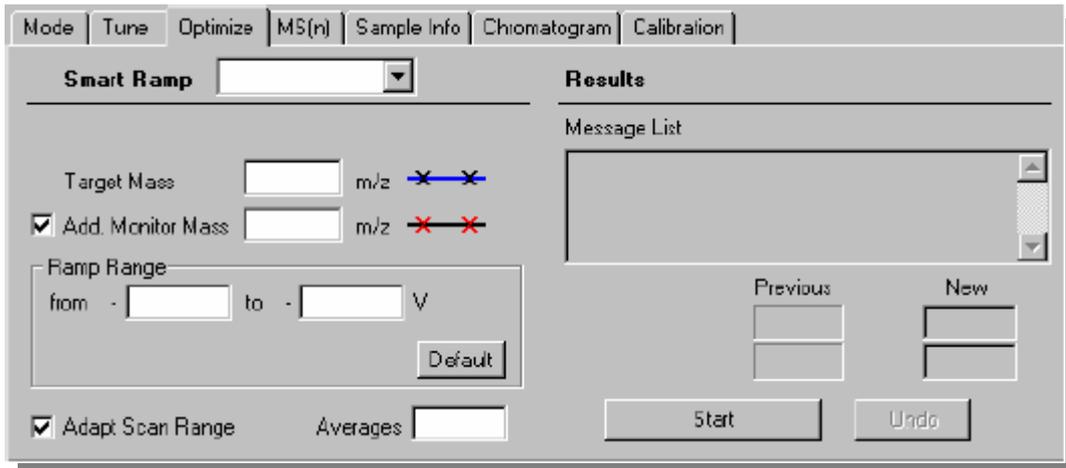


Abbildung 22. Das Esquire-Control Panel für die Expert-Tuning Optimierung.

Für das Cytochrom C wurde als Target Mass 884 (m/z) $+14$, Add. Monitor Mass als 1766 (m/z) $+7$ eingestellt. Das Hauptziel bei dem Tunen war, dass die entwickelte Methode einen möglichst großen m/z-Bereich abdeckte und das Signal zu Rauschen Verhältnis maximal war. Das Gerät bot neben den automatischen Einstellungsmöglichkeiten auch, dass man manuell alle Parameter justieren konnte. Als Strategie zur Parameter Optimierung wurde die Optimierungsrichtung von der Quelle über die Ionenoptik zur Falle verfolgt. Die Optimierungsprozesse für Capillary Exit, Skimmer, Octopole & RF und Linsen benötigen meistens ein oder zwei Wiederholungen. Cytochrom C (gelöst in Wasser/Acetonitril; 80/20 mit 0.05% TFA) mit einer Konzentration von 10 ng/ μ L wurde vorbereitet. Wie in Abbildung 23 dargestellt ist, wurde die Probe mit Hilfe einer Pumpe in das ESI-MS System bei einem Fluss von 2 μ L/min (120 μ L/h) direkt injiziert.

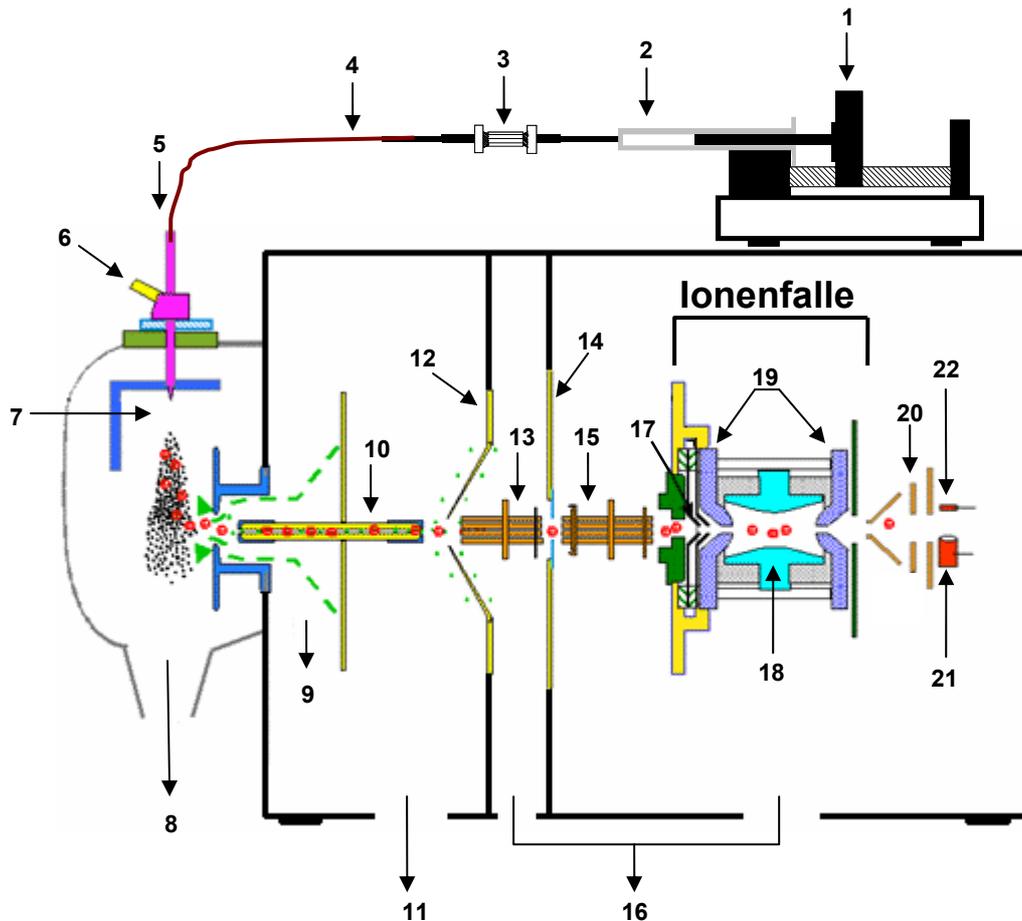


Abbildung 23. Schematische Darstellung des verwendeten Esquire-HCT (Bruker) Ionenfallenmassenspektrometers für direkte Infusion.

Bauteile: 1- Spritzenpumpe, 2- Glasspritze, 3- Union, 4- Quarzkapillare, 5- Probeneinlaß, 6- Zerstäubergas (Nebulizer Gas, N_2), 7- Nebulizer, 8- Abfall, 9- Stickstoff-Trockengas, 10- Glasskapillare, 11- Vorvakuumpumpe, 12- Skimmer, 13- Oktapol-1, 14- Partition, 15- Oktapol-2, 16- Turbopumpe, 17- Splitlinse, 18- Ringelektrode, 19- Endkappen, 20- Fokussierungslinse, 21- Elektronvervielfacher, 22- Konversionsdynode.

2.1.5 Ergebnisse

2.1.5.1 Die resultierende Tuningmethode mit Cytochrom C zum Zweck der Detektion von intakten Gliadinen

Wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben ist, wurde die Tuningsubstanz Cytochrom C in das ESI-MS System direkt injiziert. Das Tuning wurde in einem Massenbereich zwischen 500-2500 m/z mit einem ICC (Ion Charge Control) Target Mass von 70000 durchgeführt. In Abbildung 24 sind die Signalstabilität des Totalionenstromchromatogramms und das Massenspektrum bei der Direktinfusion nach Aufnahme von einer Minute gezeigt.

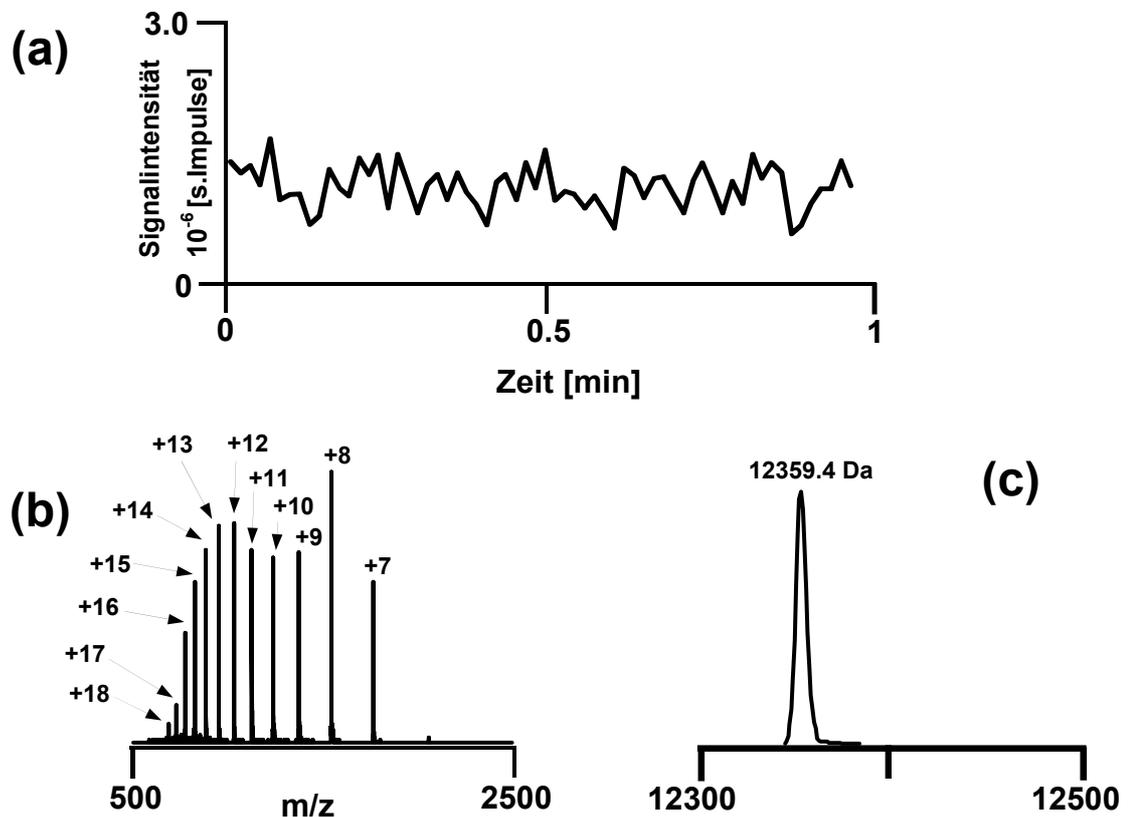


Abbildung 24. Die Direktinfusion von Cytochrom C

(a) Totalionenstromchromatogramm, (b) extrahiertes Massenspektrum, (c) dekonvolviertes Massenspektrum; Fluss, 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (120 $\mu\text{L}/\text{h}$); Aufnahmezeit, 1 min; Vorbereitung der Tuningsubstanz, gelöst in Wasser/Acetonitril (80/20) mit 0.05% TFA;

Konzentration der Lösung, 10 ng/μL. Theoretische Masse von Cytochrom C, 12360.14 Da.

Die S/N-Verhältnisse aus dem extrahierten Massenspektrum sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10. S/N-Verhältnisse aus dem extrahierten Massenspektrum in Abbildung 24-(b).

#	m/z	S/N	#	m/z	S/N
1	687.6 / +18	46.2	7	1031.0 / +12	520.0
2	728.0 / +17	87.5	8	1124.6 / +11	460.1
3	773.5 / +16	262.2	9	1237.0 / +10	441.2
4	825.0 / +15	379.3	10	1374.3 / +9	449.7
5	883.8 / +14	457.1	11	1545.9 / +8	640.7
6	951.7 / +13	516.0	12	1766.6 / +7	380.9

In Tabelle 11 sind alle Parameter dieser Tuningmethode dargestellt.

Tabelle 11. Einstellungsparameter der Tuningmethode von Cytochrom C.

Capillary	- 3500 V	Skimmer	34.4 V	Oct RF	88.5 Vpp
End Plate Offset	- 500 V	Cap Exit	253.8 V	Lens 1	-1.9 V
Nebulizer	20 psi	Oct 1 DC	10.0 V	Lens 2	-36.1 V
Dry Gas	4.0 l/min	Oct 2 DC	1.66 V	ICC	70000
Dry Temp.	300 °C	Tap Drive	108.2	Scan-Bereich	500-2500 m/z

2.2 Die Vorbereitungsprozedur vom Institut für Referenzmaterialien und -messungen der Europäischen Union zur Extraktion der Gliadine

Das Institut für Referenzmaterialien und -messungen der Europäischen Union hat uns über die Prozedur der Gliadinextraktion berichtet. Sie haben Gliadine aus Weizen nach folgenden zwei Prozeduren extrahiert (10,11).

I. Entfettung

- i. Etwa 1 kg von verschiedener Weizensorte, die die Referenzmaterialien beinhalteten, wurde eingewogen.
- ii. Alle Weizensorten wurden gemischt. Das Mehl wurde nach Soxhlet mit n-Hexan entfettet.
- iii. Der Rest des Lösungsmittels wurde im Vakuumtrockner bei 20°C verdampft.

II. Extraktion der Glutenproteine

- i. **Extraktion der Albumine und Globuline:** 18 kg von entfettetem Mehl wurden in 72 L einer 0.4 M NaCl Lösung bei Raumtemperatur für 20 min gerührt. Anschließend wurde die entstandene Suspension für 10 min bei 15°C und 10000 rpm zentrifugiert und Überstände verworfen. (*drei mal wiederholt*)
- ii. **Extraktion der Gliadine:** Der Rest des ersten Schrittes wurde in 72 L 60% Ethanol Lösung bei Raumtemperatur für 20 min gerührt. Anschließend wurde die entstandene Suspension für 10 min bei 15°C und 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand entnommen. (*zweimal wiederholt*)
 - Die Überstände aus den zweimal wiederholten Extraktionen wurden vereint. (Gliadinlösung)
 - Die Gliadinlösung wurde durch Ultrafiltration (mit Ausschlusslimit von 5000 Da) bei 20°C vorkonzentriert.
 - Die Gliadinlösung wurde durch Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen (mit Ausschlusslimit von 5000 Da) bei 20°C diafiltriert gegen 0.01 M Essigsäure, bis sie salzfrei war (geprüft mit AgNO₃) und anschließend lyophilisiert.
 - Mit einem Küchenmixer wurde der lyophilisierte Gliadinextrakt homogenisiert.

2.2.1 IP-RP-HPLC-ESI-MS Analyse von intakten Glutenproteinen mit der optimierten Cytochrom C Tuningmethode

Um diese Tuningmethode zu testen, wurden 100 ng Gliadinextrakt (gelöst in 60% EtOH) in ein μ -HPLC-ESI-MS System injiziert. Als Trennsäule wurde ein PS/DVB-Monolith mit 200 μ m i.d. verwendet. Der Gradient verlief in 30 min von 20 bis 50% ACN in 0.05% TFA. Die Messung wurde mit einem Fluss von 2 μ L/min bei 50°C Säulentemperatur durchgeführt. In Abbildung 25 ist das Totalionenstromchromatogramm dieser Analyse dargestellt. Unter siebzehn Peaks konnten Massen von Proteinen detektiert werden.

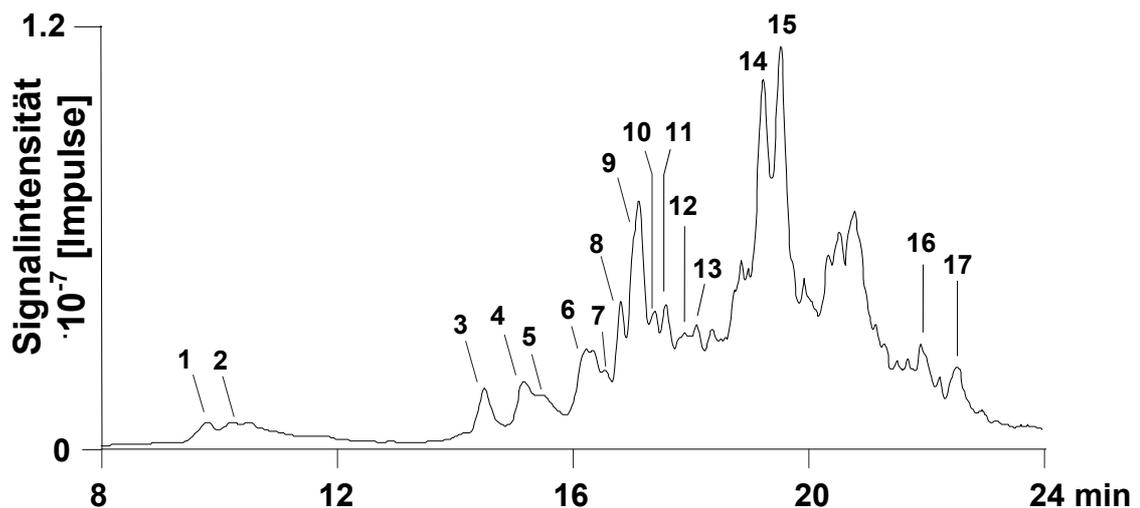


Abbildung 25. IP-RP-HPLC-MS Analysen von intakten Gliadinen.

Bedingungen: Säule, PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Fluss, 2 μ L/min; Säulentemperatur, 50°C; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Gradient, 20-50% B in 30 min; Injektionsvolumen, 1 μ L (fullloop); Detektion, Cytochrom C Tuningmethode: Massenbereich, 500-2500 m/z, ICC, 150000; Injizierte Menge von Gliadinextrakt, 100 ng.

In Tabelle 12 sind die gemessenen bzw. dekonvolvierten Massen der Proteine zusammengefasst. Die Massendekonvolutionen wurden mit Hilfe der Software „Data Analysis“ von Bruker durchgeführt (s. Anhang-1).

Tabelle 12. Gemessene Massen der Glutenproteine mit dem Cytochrom C Tuning. Pk [#], Peak-Nummer; t_R , Retentionszeit des Peaks; +MS Integr. [min], summierter Bereich der Peaks aus dem Totalionenstromchromatogram; Exp. Masse [Dalton, Da], experimentell gemessene Massen.

Pk. [#]	Cytochrom C Tuning						Pk. [#]
	t_R [min]	+MS Integr. [min]	Exp. Masse [Da]	t_R [min]	+MS Integr. [min]	Exp. Masse [Da]	
1	9.7	9.2-10.0	48775.1 48874.9	17.4	17.3-17.5	30501.6 30616.1 31013.5 31114.4 31299.5 31632.7 31758.9 32025.7 33279.5	10
2	10.1	10.1-10.5	54842.4 54952.0	17.6	17.5-17.8	30487.0	11
3	14.4	14.2-14.7	30751.0	17.9	17.8-18.0	30901.5 30996.6 31165.1 31303.2	12
4	15.0	14.8-15.1	30171.4 31435.8	18.1	18.0-18.2	32070.1 33405.2	13
5	15.5	15.2-15.6	34645.0	19.2	19.0-19.4	35191.4	14
6	16.1	15.8-16.2	33971.1 34092.5	19.5	19.4-19.7	38640.5	15
7	16.4	16.2-16.5	30805.5	21.9	21.8-22.0	31044.7 31131.7	16
8	16.7	16.7-16.8	31458.0 31586.5 31843.2	22.5	22.4-22.7	31270.4 31795.8	17
9	17.1	16.9-17.3	31032.4 31538.1 33278.9 33407.7 33535.7				

Anschließend wurden die experimentell gemessenen Massen mit den theoretischen Massen der Glutenproteine in der Protein Datenbank von <http://www.expasy.org> verglichen. Die gefundene Glutenproteine (Gliadine und Glutenine) und die Datenbank-Indices sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13. Gefundene Glutenproteine (Gliadine und Glutenine) Datenbank-Indices (Akzessionsnummern) aus der Proteindatenbank <http://www.expasy.org>, sowie die Massenabweichungen.

Pk. [#]	Experimentelle av. Masse [Da]	Theoretische av. Masse [Da]	Protein Typ	Akzessionsnummer	±Δ Da
3	30751.0	30747.8	γ-Gliadin	Q9FEG9	-3,2
6	33971.1	33969.3	α/β-Gliadin	Q41632	-1,8
9	33278.9	33284.2	α/β-Gliadin	P18573	+5,3
12	31165.1	31157.1	α-Gliadin	Q9ZP09	-8,0
14	35191.4	35197.9	γ-Gliadin	Q9M6P7	+6,5
15	38640.5	38634.0	γ-Gliadin	Q94G96	-6,5

Wie aus der Tabelle auch zu sehen ist, wurden zuerst nach der Strategie der Massenübereinstimmung mit Hilfe der Cytochrom C Tuningmethode zwei α/β-Gliadine, ein α-Gliadin und drei γ-Gliadine identifiziert. Die restlichen aufgelisteten Massen der Tabelle 12 können zu anderen Proteinen in Weizen wie Albuminen oder Globulinen gehören (12-14), die beim Extrahieren der Gliadine als Spur zugegen sein können. Wie in Kapitel 2.2 bei der Durchführung der Gliadinextraktion beschrieben ist, werden Gliadine im zweiten Schritt der Extraktionsprozedur aus dem entfetteten Weizenmehl isoliert. In verschiedenen Fachliteraturen werden Glutenproteine nach der Extraktionsprozedur von Wieser et. al. in einer Reihenfolge aus dem Weizenmehl isoliert, wobei zuerst Albumine und Globuline mit einer Salzlösung, danach Gliadine mit einer 60-70% wässrigen Ethanollösung und anschließend Glutenine mit Hilfe von Harnstoff extrahiert werden (1,2,15). Obwohl Extraktionsschritte mehrmals wiederholt werden, können trotzdem kleine Spuren an Proteinen von dem vorherigen Schritt zurückbleiben, die durch sehr empfindliche Massenspektrometrie auch detektiert werden können. Weiterhin können diese restlichen in Tabelle 12 aufgelisteten Massen ebenso zu anderen Weizenproteinen gehören, die noch nicht in der Proteindatenbank enthalten sind.

Aus der Tabelle 13 sind auch die Abweichungen [$\pm\Delta$, Da] der gemessenen Massen von den theoretischen Massen der entsprechenden Proteine zu sehen. Sie variieren zwischen 1.8 und 8.0 Da. Der Kalibrierungsstand des Detektors in dem Zeitraum, wo die Messungen durchgeführt wurden, könnte natürlich ein Grund für diese Massenabweichungen sein, so dass er auf die m/z-Werte im gesamten Massenspektrum einen Einfluss hat und dadurch zu einer Verschiebung der Massen führen kann. Eine kleine Verschiebung der m/z-Werte am Massenspektrum besonders bei hochmolekularen Molekülen kann eindeutig zu signifikanten Massenabweichungen führen. Einen weiteren Grund für die Massenunterschiede hat Mamone et. al. in seiner Studie mittels Elektrospraymassenspektrometrie zur qualitativen und quantitativen Analysen der Glutenproteinen aus sieben verschiedenen Weizensorten erläutert (1). Er hat seine Studie auf die Analyse von γ 3-Gliadin und γ 2-Gliadin konzentriert, wobei die Masse von γ 3-Gliadin innerhalb von sieben Weizensorten bis zu 8 Da abwichen. Bei γ 2-Gliadin wichen die Massen innerhalb der sieben Weizensorten sogar bis etwa 1000 Da ab, aufgrund der Veränderungen der Primärstrukturen durch Aminosäuresubstitutionen, durch Zufügen von Peptiden und/oder Peptidzerstörung. In der vorliegenden Arbeit wurde sich nur auf die Bestätigung der in Tabelle 13 dargestellten Molekularmassen der Gliadine konzentriert, die versuchsweise anhand ihrer intakten molekularen Massen identifiziert wurden. Um zu bestätigen, dass diese in Tabelle 13 aufgelisteten Massen wirklich zu den entsprechenden Glutenproteinen gehören, wurde versucht, für die oben erwähnten Fragen eine Antwort durch die Analyse der Aminosäuresequenzen der Proteine zu finden, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

2.2.2 Studien zur qualitativen Bestätigung der Glutenproteine durch ihre Aminosäuresequenzen

Im **Anhang-2** sind die Aminosäuresequenzen der Glutenproteine (Gliadine und Glutenine) dargestellt, die aufgrund ihrer intakten molekularen Massen zugeordnet wurden. Um die Sequenz-Informationen für ihre unmissverständliche Identifizierung zu erhalten, war es notwendig die Proteine zu verdauen und die resultierenden Peptide durch Peptidfragmentfingerprinting zu identifizieren. Wegen des geringen Vorkommens von Arginin und Lysin in den Gliadinsequenzen wurden hier Pepsin und Chymotrypsin anstelle vom Trypsin als Verdauungsenzym benutzt.

2.2.2.1 Klassischer Verdau von Gliadinextrakten (mit Reduktion)

Bei dem klassischen Verdau wird die Probe vor dem eigentlichen Verdau dialysiert und reduziert. Für diese Studie wurden 1.079 mg des Gliadinextraktes in 1 ml 0.5M Ammoniumhydrogencarbonat und 8M Harnstoff aufgelöst und anschließend denaturiert. Dann wurde die Lösung mit Argon entgast. Dadurch entfernte man den Luftsauerstoff, um Oxidationsreaktionen zu verhindern. Nach diesem Schritt wurde die Probemischung bei 37°C für 30 Minuten und 900 U/min inkubiert. Dann wurden die Disulfidbrücken nach Addition von 33.3 µL DTT (300 mM) bei 37°C für 4 h unter Schütteln bei 900 U/min reduziert. Nach der Reduktion wurden für die Alkylierung 10 µL 4-Vinylpyridin (95%; Sigma-Aldrich) zugegeben und die Lösung bei 37°C für 40 Minuten inkubiert (900 U/min). Das reduzierte und alkylierte Reaktionsgemisch wurde in einem Dialyseschlauch gegen entionisiertes Wasser bei Raumtemperatur für 12 h dialysiert.

2.2.2.2 Denaturierung und Dialyse des Gliadinextraktes (ohne Reduktion)

Hierbei wurden 1.053 mg des Gliadinextraktes in 1 ml 0.5 M Ammoniumhydrogencarbonat und 8M Harnstoff aufgelöst und anschließend denaturiert. Dann wurde die Lösung mit Argon entgast. Bei dieser Durchführung wurden die Schritte sowohl zur Reduktion als auch zur Alkylierung übersprungen. Anschließend wurde der denaturierte Gliadinextrakt in einem Dialyseschlauch gegen entionisiertes Wasser bei Raumtemperatur für 12 h dialysiert.

2.2.2.3 Durchführung des peptischen Verdaus

Bei den reduzierten und nicht reduzierten peptischen Verdauen wurden durch Addition von 250 µL 1M Guanidin-HCl Puffer (pH 1.3) zu jeweils 100 µL der dialysierten Proben addiert, gefolgt von einer Inkubation mit 5 µg (aus Schweinmagen, Fluka) Pepsin bei 37°C (Enzyme/Substrat: 1/20, [w:w]) für 3 h, 900 U/min. Nach 3 h wurde die Reaktion und durch Addition von 1 µL 1M NaOH (pH 8-8,5) gestoppt.

2.2.2.4 Durchführung des chymotryptischen Verdaus

Bei den reduzierten und nicht reduzierten chymotryptischen Verdauen wurden durch Addition von 200 µL Trypsin Puffer auf jeweils 100 µL der dialysierten Proben durchgeführt, gefolgt von Inkubation mit 5 µg Chymotrypsin (aus Rind Pankreas, Sigma) bei 37°C für 16 h, 900 U/min (Enzyme/Substrat: 1/20, [w:w]). Nach 16 h wurde die Reaktion mit Addition von 1 Vol% TFA gestoppt.

2.2.3 IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS Analyse vom verdauten Gliadinextrakt mit Pepsin und Chymotrypsin (ohne und mit Reduktion)

Nach dem Stoppen der peptischen und chymotryptischen Verdauung vom Gliadinextrakt wurden Peptide mittels IP-RP-HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Die Totalionstromchromatogramme der beiden Analysen ((a) ohne Reduktion und (b) mit Reduktion) sind in Abbildung 26 und Abbildung 27 dargestellt.

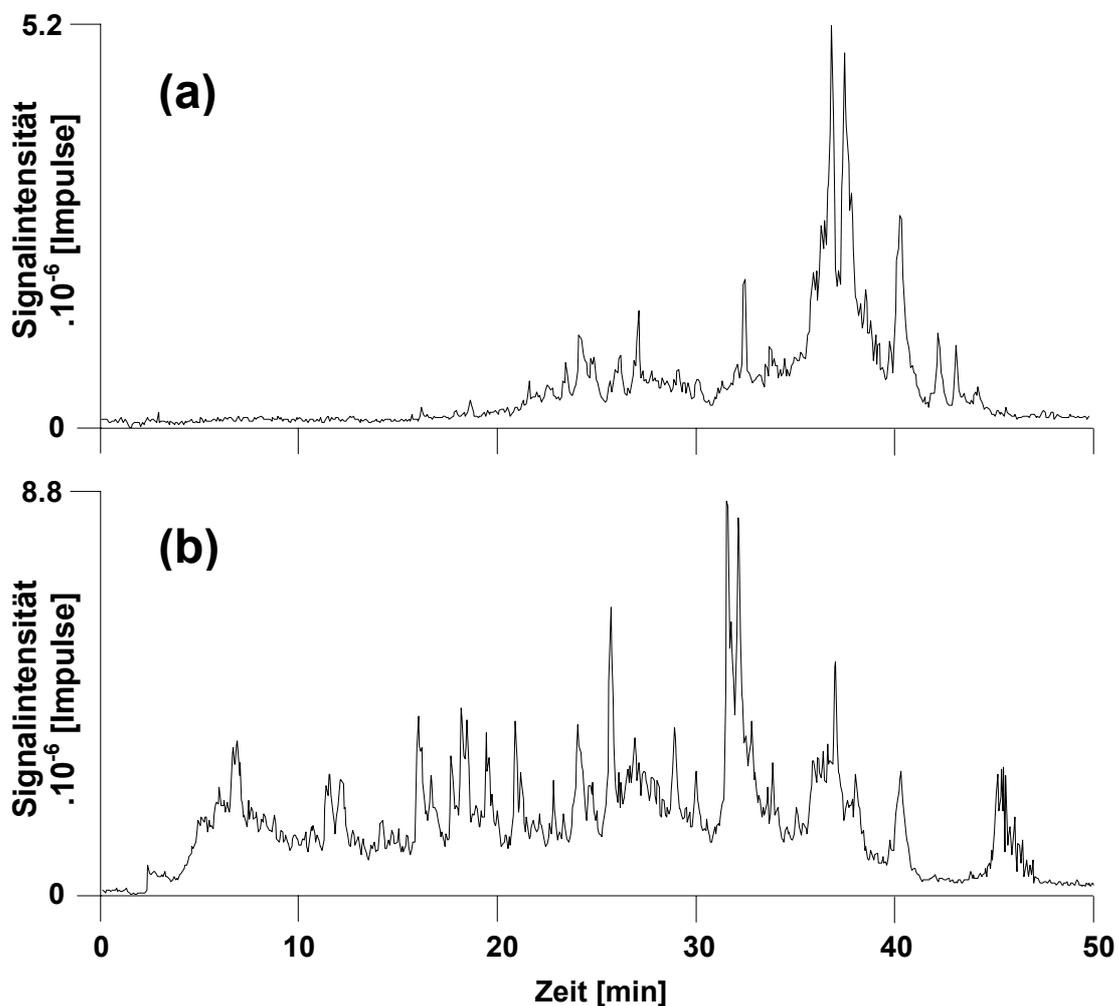


Abbildung 26. IP-RP-HPLC-MS/MS Analysen von verdautem Gliadinextrakt mit Pepsin ohne und mit Reduktion. TIC, **(a)** Ohne Reduktion, **(b)** Mit Reduktion.

Bedingungen: Säule, PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Fluss, 2 μ L/min; Säulentemperatur, 50 °C; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Gradient, 0-35% B in 50 min; Injektionsvolumen, 10 μ L (fullloop); Scanbereich, 500-1500 m/z, ICC, 70000

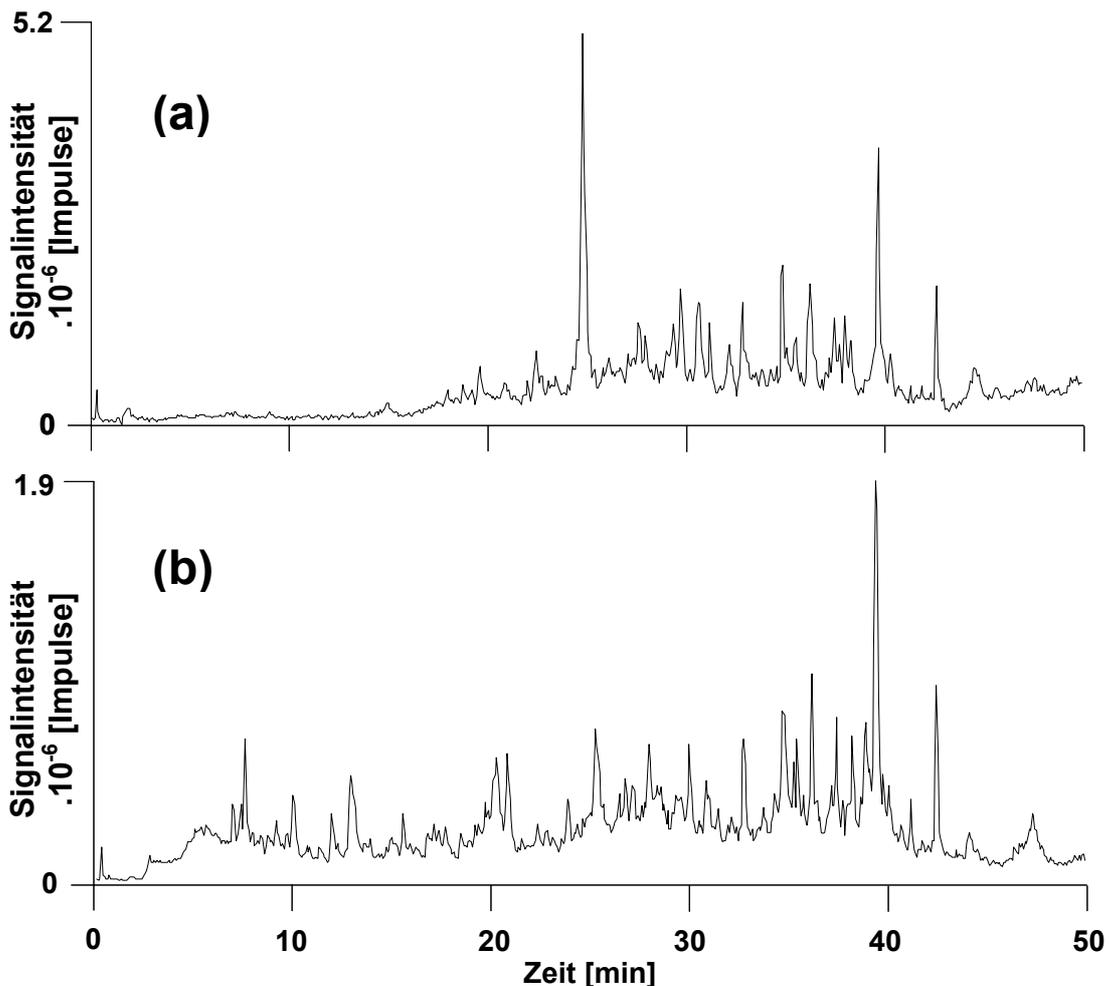


Abbildung 27. IP-RP-HPLC-MS/MS Analysen vom verdauten Gliadinextrakt mit Chymotrypsin ohne und mit Reduktion. TIC, **(a)** Ohne Reduktion, **(b)** Mit Reduktion. Bedingungen: Säule, PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Fluss, 2 $\mu\text{L}/\text{min}$; Säulentemperatur, 50 $^{\circ}\text{C}$; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Gradient, 0-35% B in 50 min; Loopvolumen, 10 μL (fullloop); Injektionsvolumen, 10 μL ; Scanbereich, 500-1500 m/z, ICC, 70000

Für die Peptidtrennung wurde eine monolithische Säule (PS-DVB 50x0.2 mm i.d.) verwendet. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ justiert. Die Säulentemperatur war 50 $^{\circ}\text{C}$. Lösungsmittel A war 0.05% TFA im Wasser und Lösungsmittel B war 0.05% TFA im Acetonitril. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0-35% B in 50 Minuten durchgeführt. Die Detektion der Massen wurde

mit einem an die Kapillar-HPLC gekoppelten Ionenfallen-Massenspektrometer durchgeführt, an dem die Daten im MS/MS-Modus bearbeitet wurden. Die Massenspektren wurden in einem Scanbereich zwischen 500-1500 m/z und einem ICC Target von 70000 gescant (Methode für Peptide). Die Quelltemperatur war 300°C, die Kapillarausgangsspannung 253.8 V, Zerstäubergas (N₂) 20 psi, Trockengas (N₂) 4 L/min.

Wie generell aus den Abbildungen 26 und 27 zu sehen ist, wurde durch Reduktion von Cysteinresten eine größere Ausbeute an Peptiden erhalten. Es zeigt uns, dass die Verwendung von DTT einen merkbaren Unterschied an Peptidausbeute ergibt. DTT dient als Reduktionsmittel (16) und spaltet die Disulfidbrücken von Proteinen auf. Danach können verschiedene Denaturierungssubstanzen wie Harnstoff (17) oder SDS (18) die knäuelartigen Proteine in gerade strangförmige Ketten überführen. Im Falle nichtreduzierter Disulfidbrücken könnten Enzyme wegen der sterischen Hinderung die entsprechenden Spaltstellen nicht erreichen. In Abbildung 27 sind die Totalionenstromchromatogramme der Verdauung mit Chymotrypsin dargestellt, die ohne (a) und mit (b) Reduktion durchgeführt wurden. Die Trennung der Peptide wurde mit den gleichen massenspektrometrischen Parametern analysiert und unter gleichen Bedingungen wie bei den peptischen Verdauen in Abbildung 26 getrennt, wobei hier auch derselbe Effekt bei der Verwendung von DTT auf die Peptidausbeute zu sehen ist.

2.3 Diskussion der Identifizierungsergebnisse

In diesem Kapitel wurden durch eine ausführliche Diskussion Proteine und Peptide verschiedener Glutenproteine charakterisiert und aus einer erstellten Datenbank identifiziert, die alle Gliadine, Hordeine, Glutenine und Prolamine umfaßte. Um eine zuverlässigere und empfindliche Identifizierung zu erhalten, wurden drei Suchmaschinen bzw. Algorithmen benutzt:

i. Suchmaschine von Mascot (19):

Die Software von Matrix Science benutzt eine wahrscheinlichkeitsbasierte Integration des MOWSE (Molecular weight search)-Scoring-Algorithmus. Der Grad der Übereinstimmung der simulierten und gemessenen Spektren wird durch einen spezifischen Wert (Score) angegeben, welcher die Wahrscheinlichkeit für einen Zufallstreffer bei der Protein/Peptid-Identifizierung ausdrückt. Je höher dieser Wert ist, desto niedriger ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem identifizierten Peptid/Protein um einen Zufallstreffer handelt. Die Höhe des angegebenen Wertes hängt hierbei von der Zahl an Fragmentationen ab, die im MS/MS-Spektrum dem entsprechenden Peptid zugeordnet werden können.

ii. Suchmaschine von InsPect (20):

Die Suchmaschine InsPect konstruiert Datenbankfilter, die besonders erfolgreich in den Genomics Suchen sind. Bei einem vorhandenen MS/MS Spektrum (S) und einer Datenbank (D) wählt ein Datenbankfilter einen kleinen Bruch von (D), der uns ein Peptid garantiert, das mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem (S) zu enthalten ist. Zusätzlich zur Filterung verwendet InsPect auch die neuartigen Algorithmen für das Scoring und die Validierung in Anwesenheit der Modifikationen, ohne explizite Aufzählung aller Varianten. Als Vorteile zählt man bei InsPect, dass es modifizierte Peptide mit besserer oder gleichwertiger Genauigkeit als andere Datenbanksuchmaschinen identifiziert. Zum anderen ist es schneller als SEQUEST im Wesentlichen bei komplizierten Mischungen.

iii. Suchmaschine von OMSSA (21):

Der OMSSA-Algorithmus (**O**pen **M**ass **S**pectrometry **S**earch **A**lgorithm) ist von seiner Verwendung her einzigartig und basiert auf demselben Modell, welches auch von den BLAST-Programmen benutzt wird (22). Die BLAST-Programme sind die am meisten benutzten Werkzeuge für das Suchen von Protein- und DNA-Datenbanken bei Sequenzähnlichkeiten. OMSSA wurde entworfen, um schneller als andere Algorithmen zu sein, wenn man große MS/MS Datensätze sucht. OMSSA nimmt experimentelle MS/MS Spektren, filtert die Rauschpeaks, extrahiert die m/z-Werte und vergleicht dann diese m/z-Werte mit den errechneten m/z-Werten, die von den Peptiden abgeleitet werden, da die Proteinsequenzen durch einen insilico-Verdau in der Bibliothek produziert werden.

Zur Auswertung der MS/MS-Spektren wurden die Identifikationsresultate dieser drei Suchmaschinen dann kombiniert, um eine Übereinstimmung der Identifizierung zu erbringen. Die komplette Auswertung zur Peptididentifizierungen wurde in Zusammenarbeit der Arbeitskreise für Bioinformatik von *Prof. O. Kohlbacher (Universität Tübingen)* und *Prof. K. Reinert (Freie Universität Berlin)* durchgeführt.

2.3.1 Gruppierung der GHG (Gliadin-Hordein-Glutenin) Datenbank

Die Sequenzhomologie in der GHG Datenbank ist sehr hoch, weil übereinstimmende Proteine der nah bezogenen Sorten enthalten sind. Ein anderer Grund für Sequenzhomologie ist, dass es Regionen mit hoher Veränderlichkeit innerhalb der Speicherproteine gibt, die zu mehreren Datenbankeinträgen für das gleiche Protein führen. Diese hohe Sequenzhomologie führt zu vielen Proteinidentifikationen, die durch die gleichen Peptide identifiziert werden. Um die Zahl der übereinstimmenden Proteinidentifikationen zu verringern, wurden Sequenzen in der Datenbank durch Sequenzhomologie gesammelt.

Das Blastclust-Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Version 20061015) der NCBI wurde mit einem Homologiegrenzwert von 95% benutzt. Anhang 3 enthält einen Überblick über die Blöcke.

2.3.2 Einstellung der verwendeten Tools und Suchparameter

OMSSA, InsPect und Mascot wurden verwendet, um Gliadintypen in vier Proben zu identifizieren (*1-peptischer Verdau mit Reduktion, 2-peptischer Verdau ohne Reduktion, 3-chymotryptischer Verdau mit Reduktion, 4-chymotryptischer Verdau ohne Reduktion*). Jede Suchmaschine erforderte eine Einstellung der Suchparameter sowie Massentoleranzen und Zahl der ungespaltenen Schnittstellen (missed cleavages) zur Identifizierung. In Tabelle 14 sind alle Einstellungsparameter aufgelistet, die bei der Identifizierung verwendet wurden. Angepasst an die Instrumentauflösung wurde die Vorläufermassentoleranz auf **1.3 Da** und die Massentoleranz in den Tandemmassenspektren auf **0.3 Da** eingestellt. Peptide mit Ladungszuständen von **+1** bis **+3** wurden betrachtet. Zur Identifizierung der nicht vollständig verdauten Proteine (besonders Chymotrypsin spaltet Proteine an vielen Orten) wurde die Zahl der „Missed Cleavages“ auf einen hohen Wert eingestellt. Die Zahl der „Missed Cleavages“ für Identifizierungen mit Mascot und InsPect wurde auf fünf eingestellt. Leider erlaubte OMSSA für die Zahl von „Missed Cleavages“ keine größeren Werte als **3** einzustellen. Bei der Identifizierung der mit DTT reduzierten

Proben wurde als Einstellungsoption zur festen Modifikation die „Pyridylethylierung“ gewählt. Zusätzlich wurde Desamidierung von N und Q als eine variable Modifikation in einem unterschiedlichen Durchlauf von jedem der Datensätze eingestellt. Ein besonderes Merkmal bei InsPect war, dass das Enzym Pepsin nicht eingestellt werden konnte, sondern unspezifische Spaltung als Ersatz verwendet wurde.

Tabelle 14. Die verwendete Einstellungsparameter bei der Identifizierung.

	OMSSA	InsPect	Mascot
version	2.0.0	20061212	2.1.03
Gemeinsame Optionen für alle Proben.	-to 0.3 -te 1.3 -he 10e8 -zl 1 -zh 3 -v 3 ¹ [-mv 4]	-precursor_mass_tolerance: 1.3 -peak_mass_tolerance: 0.3 -multicharge: [+0.984016,NQ,opt,Deamidation]	-precursor_mass_tolerance: 1.3 -peak_mass_tolerance: 0.3 -charges: 1+,2+,3+ -missed_cleavages: 5 [-variable_modifications: "Deamidation (NQ)"]
pep_red	-e 7 -mf 112	-cleavage: None ² -modifications: 105.057849,C,fix,Pyridylethyl	-cleavage: PepsinA -missed_cleavages 5 -modifications "S-pyridylethyl (C)"
chym_red	-e 3 -mf 112	-cleavage: Chymotrypsin -modifications: 105.057849,C,fix,Pyridylethyl	-cleavage: Chymotrypsin -missed_cleavages: 5 -modifications "S-pyridylethyl (C)"
chym_nonred	-e 3	-cleavage: Chymotrypsin	-cleavage: Chymotrypsin
pep_nonred	-e 7	-cleavage: -----	-cleavage: PepsinA

¹ Werte>3 führen zum Absturz von Omssacl.

² Das Enzyme Pepsin ist nicht einstellbar mit InsPect.

2.3.3 Konsensidentifikation der MS/MS-Analysen

Für jeden der vier Datensätze wurden Konsensidentifizierungen der Peptide und Proteine durchgeführt, die auf den Resultaten der Mascot, InsPect und OMSSA Suchen basierten. Wie in Abbildung 28 wurden alle Identifizierungen in zwei Schritten durchgeführt. In dem ersten Schritt wurden die Identifizierungsergebnisse mit und ohne Desamidierung für jeden Suchprozess miteinander kombiniert, das auf dem Rank des Peptidtreffers basierte. Für jeden Treffer (Hit) wurden neue Scores zugewiesen, die auf dem Rank der Peptidhits und Bereich von 0 bis 100 basierten. Im zweiten Schritt erfolgte eine Identifizierung aller drei Suchen, indem Scores durch ihre Mittelwerte berechnet wurden, die in den Identifizierungen des vorhergehenden Schrittes erzielt wurden.

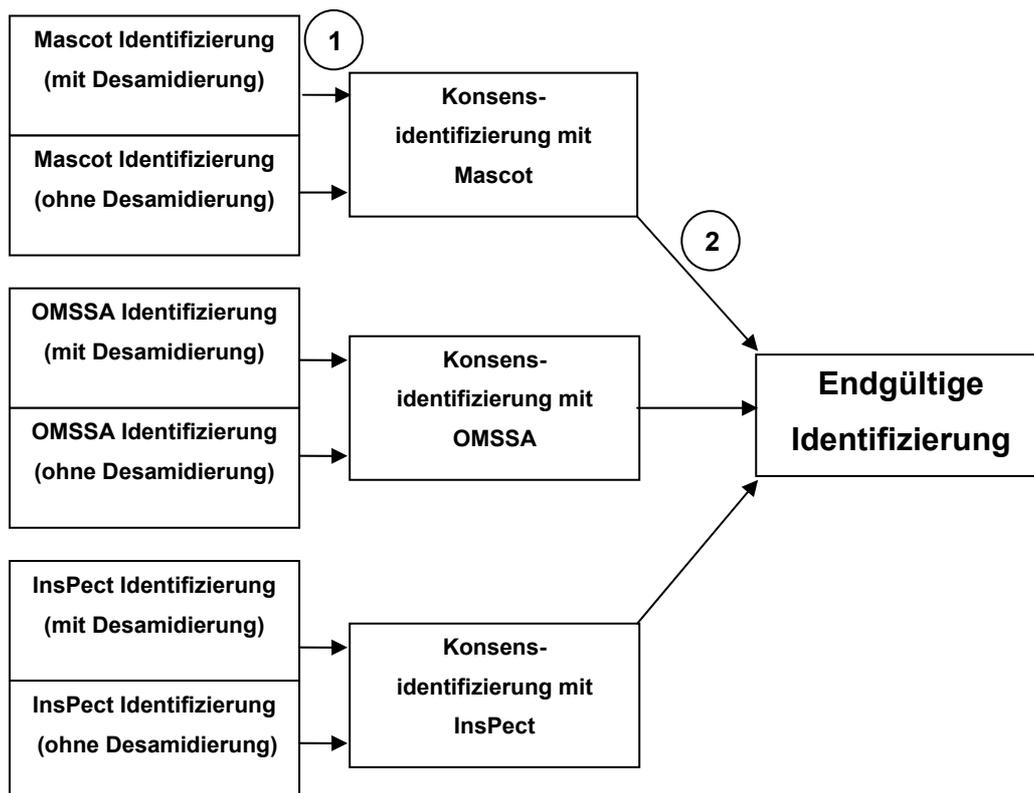


Abbildung 28. Strategie zur Identifizierung der Peptide und Proteine.

Nach dem zweiten Schritt lagen die Scores der Peptide im Bereich von 0 bis 100. Der bestmögliche Score betrug 100. Im zweiten Schritt wurden die Durchschnittswerte der Scores der drei Suchen berechnet. Wurde ein Peptidhit nur in einzigem Identifizierungslauf gefunden, kann sein Score nicht größer als 33.33 sein. Wenn nicht anders angegeben, haben alle Peptidhits in den folgenden Auswertungen Scores mindestens von 33.4, d.h. sie wurden durch mindestens zwei der Suchläufe identifiziert. Eine vollständige Liste aller identifizierten Proteine und der entsprechenden Peptidsequenzen kann in den Anhängen -4 und - 5 gefunden werden.

2.3.4 Resultate der Konsensidentifikation

Die vier Tabellen im Anhang-3 zeigen die Proteine, die mindestens zwei Peptide enthalten und die der Reihe nach durch mindestens zwei Datenbanksuchen identifiziert wurden. Um die Tabellen besser zusammenzufassen, wurden die Daten in der folgenden Weise sortiert:

1. Zuerst wurden jene Proteine gruppiert, die durch die gleichen Peptide identifiziert wurden.
2. Dann wurden alle Proteineinträge in einer Gruppe durch einen Repräsentanten ersetzt (der erste Eintrag der Gruppierung).
3. Schließlich wurden jene Gruppen miteinander verbunden, die genau die gleichen Proteine enthielten.

2.3.5 Protein- und Peptididentifizierung verschiedener Glutenproteine

In diesem Kapitel wurden die aufgrund ihrer intakten molekularen Massen identifizierten Gliadine auf eine korrekte Identifizierung überprüft (s. Tabelle 13).

Die Identifizierung der Proteine, die in den Datensätzen enthalten werden, wird erschwert, da die Peptidsequenzen der Proteine teilweise sehr ähnlich sind. Ein Problem war hierbei vor allem der hohe Gehalt an Glutaminen und Prolinen. Dies verringerte die Zahl an spezifischen Peptiden, welche eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Protein stark erschwerte und oft nur eine Zuordnung zu einer bestimmten Proteinfamilie zu. Im Folgenden wurde versucht, die aufgrund ihrer intakten molekularen Masse identifizierten Proteine einzeln zu bestätigen.

- Identifizierung von γ -Gliadin ([Q9FEG9](#))

Peptide	OMSSA	Mascot	InsPecT	Clusters
VQGQGIIQPQPAQL	6.0e-11/6.1e-09	30.28/28.84	8.399/4.707	7, 26, 36, 39, 76
VQGQGIIQ	9.4/-	1.07/-	-/-	7, 26, 36, 39, 50, 76
EAIRSLVL	22/-	6.44/-	-/-	7, 36, 76

Alle Peptide gehören zu der Proteinfamilie der γ -Gliadine. Eine Spezifikation des genauen Proteins war nicht möglich, da keine wirklichen Sequenzen spezifischer Peptide gefunden wurden. Jedoch ist die Identifizierung als γ -Gliadine aufgrund des ersten Peptides zuverlässig. Folglich wird die PMF-Identifizierung für dieses Protein durch diese Identifizierung unterstützt (theoretische Masse: 30747.8 Da / gemessene Masse: 30751.0 Da, $\pm\Delta$: 3.2 Da).

- Identifizierung von α/β -Gliadin ([Q41632](#))

Peptide	OMSSA	Mascot	InsPecT	Clusters
GIFGTN	-/0.09	-/18.52	-/0.163	2, 6, 37, 40, 46, 48, 78
LQLQPF	-/0.05	-/34.78	-/2.841	2, 6, 37, 46, 48, 78
VQPQQLPQFEEIRNL	3.5/4.2e-05	-/9.51	-/-	2, 6, 78
QPQQLPQFEEIRNL	3.5/37	-/0.07	-/-	2, 6, 48, 78
EEIRNLAL	1.1e-3/-	20.11/-	-/-	2, 6, 48, 78
QQQLIPCRDVVL	0.75/-	4.69/-	-4.553/-	6, 37, 40, 48, 78, 79

Die große Anzahl an Peptiden identifiziert dieses Protein sicher. Einige der Peptide kommen auch in anderen Proteinen der α/β -Gliadin Familie vor. Die drei durch Mascot signifikant identifizierten Peptide sind für dieses Protein nicht sehr spezifisch. Die große Zahl der Peptide kompensiert jedoch die weniger signifikanten Scores. Folglich wurde die Identifizierung von Q41632 durch die PMF-Identifizierung mit der MS/MS Analyse der Peptide bestätigt (theoretische Masse: 33969.3 Da / gemessene Masse: 33971.1 Da, $\pm\Delta$:1.8 Da).

- Identifizierung von α/β -Gliadin ([P18573](#))

Peptide	OMSSA	Mascot	InsPecT	Clusters
GIFGTN	-/0.089	-/18.52	-/0.163	2, 6, 37, 40, 46, 48, 78
LQLQPF	-/0.048	-/34.78	-/2.841	2, 6, 37, 46, 48, 78
VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL	1.9e-18	-/21.57	-/-	2, 6, 37, 40, 48
VQPQQLPQFEEIRNL	3.5/4.2e-05	-/9.51	-/-	2, 6, 78
LQLQPFQPLPY	-/1.3e-12	-/37.63	-/8.594	2, 6, 48
QPQQLPQFEEIRNL	3.5/37	-/0.07	-/-	2, 6, 48, 78

Alle Peptidsequenzen von P18573 erscheinen in den α - und α/β -Gliadinen. Die letzten vier Peptide treten ausschließlich als Subsequenzen des α - und α/β -Gliadins auf. Drei dieser Peptide haben hohe Scores, die eine zuverlässige Identifizierung der α/β -Gliadinfamilie anzeigen. Das Protein P18573 gehört zu dieser Familie (theoretische Masse: 33284.2 Da / gemessene Masse: 33278.9 Da, $\pm\Delta$: 5.3 Da).

- Identifizierung von α -Gliadin ([Q9ZP09](#))

Peptide	OMSSA	Mascot	InsPecT	Clusters
GIFGTN	-/0.09	-/18.52	-/0.163	2, 6, 37, 40, 46, 48, 78
LQLQPF	-/0.05	-/34.78	-/2.841	2, 6, 37, 46, 48, 78
VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL	-/4.4e-17	-/21.57	-/-	2, 6, 37, 40, 48
VQPQQLPQFEEIRNL	3.5/4.2e-05	-/9.51	-/-	2, 6, 78
LQLQFPQPQLPY	-/1.3e-12	-/37.63	-/8.594	2, 6, 48
LGQQQPFPPQQPYPQPQPFPSQQPY	-/7.8e-11	-/7.38	-/-	2
QPQQLPQFEEIRNL	3.5/37	-/0.07	-/-	2, 6, 48, 78
EEIRNLAL	0.0011/-	20.11/-	-/-	2, 6, 48, 78

Durch die Peptidsequenz LGQQQPFPPQQPYPQPQPFPSQQPY wurde eindeutig die α -Proteinfamilie identifiziert. Einige der Peptide kommen in P18573 und Q41632 vor, welche auch α -Gliadine sind. Schließlich konnte keine klare Identifizierung dieses Proteins erhalten werden (theoretische Masse: 31157.1 Da / gemessene Masse: 31165.1 Da, $\pm\Delta$: 8.0 Da).

- Identifizierung von γ -Gliadin ([Q9M6P7](#))

Peptide	OMSSA	Mascot	InsPect	Clusters
VQGQGIIQPQQPAQL	6.0e-11/6.1e-09	30.28/28.84	8.399/4.707	7, 26, 36 , 39, 76
VQGQGIIQ	9.4/-	1.07/-	-/-	7, 26, 36 , 39, 50, 76
EAIRSLVL	22/-	6.44/-	-/-	7, 36 , 76
SQQQQVGGSLVQGQGIIQPQQPAQL	0.38e-3/53	6.35/-	-/-	36
EAIRSL	-/1.1	-/17.84	-/-	7, 36 , 76
ASIVAGIGGQ	-/0.01	-/20.3	-/0.278	26, 36 , 39
NIQVDPGQVQW	-/2.5e-10	-/40.81	-/10.353	36 , 39
LQQQLVPQLQQPL	-/9.2e-09	-/33.39	-/0.002	36

Die meisten dieser Peptide kommen in unterschiedlichen Proteinen vor. Die zwei Peptide SQQQQVGGSLVQGQGIIQPQQPAQL und LQQQLVPQLQQPL gehören der Familie der γ -Gliadine an, die durch Q9M6P7 vertreten wird (theoretische Masse: 35197.9 Da / gemessene Masse: 35191.4 Da, $\pm\Delta$: 6.5 Da).

- Identifizierung von γ -Gliadin ([Q94G96](#))

Peptide	OMSSA	Mascot	InsPect	Clusters
VQGQGIIQPQQPAQL	6.0e-11/6.1e-09	30.28/28.84	8.399/4.707	7, 26, 36, 39, 76
PQQQQPL	0.016/-	14.39/-	-2.881/-	1, 10, 32, 34, 47, 52, 87
QLVQGQGIIQPQQPAQL	1.1e-09/ 0.031	36.94/11.28	-/1.587	-
VQGQGIIQ	9.4/-	1.07/-	-/-	7, 26, 36, 39, 50, 76

Die Peptide, die Q94G96 zusammenbringen konnten, erscheinen in den γ -Gliadinen. Die Peptidsequenz QLVQGQGIIQPQQPAQL ist in drei Proteinen enthalten, die alle γ -Gliadine sind. Aufgrund der unterschiedlichen signifikanten Sequenzen wurden diese γ -Gliadine in verschiedenen Clusters zugewiesen.

Obwohl diese Sequenzen sehr ähnlich sind, ist die Identifizierung von Q94G96 sehr zuverlässig, auch gestützt durch die bedeutenden Scores der Peptide, die eindeutig für γ -Gliadine sprechen (theoretische Masse: 38634.0 Da / gemessene Masse: 38640.5 Da, $\pm\Delta$: 6.5 Da).

Die zwei im Folgenden besprochenen Proteine sind Repräsentanten der ω -Gliadine und der Hordeine.

Das ω -Gliadin mit der Zugangsnummer *Q571R2* (Theoretische Masse: 43980.80) wurde durch seine eindeutigen Peptide LLQSQQPF, HQQPEQIISQQPQQPF und LSPSDQQL identifiziert, obwohl es nicht aufgrund seiner intakten molekularen Masse identifiziert werden konnte (s. Tabelle 13). HQQPEQIISQQPQQPF hat hohe Scores von OMSSA (beste Score $7.5e-09$) und von Mascot (bester Score 20.26). Die anderen Peptide haben weniger hohe Scores, die jedoch die Identifizierung stützen. Zwei zusätzliche Peptide SLQPQQPF und IIPQQPQQPF wurden gefunden, die zu diesem Protein passen. Das SLQPQQPF findet man nur in den ω -Gliadinen und ist ein starker Hinweis auf ω -Gliadine. Das Peptid IIPQQPQQPF erscheint sowohl in den ω -Gliadinen als auch in den Hordeinen.

Das Hordein mit der Zugangsnummer *Q40021* (Theoretische Masse: 28896.05) konnte durch drei Peptide identifiziert werden, obwohl es nicht aufgrund seiner intakten molekularen Masse identifiziert werden konnte (s. Tabelle 13). Keines der Peptide enthielt hohe Scores, obwohl zwei einzigartig zusammenpassende Peptide gefunden wurden, LQLQIPYVQPSIL und ALLAIAATSTIAQQPF. Zusätzlich wurde das unspezifische Peptid LQPHQIAQL identifiziert, das in den Hordeinen und in anderen Glutenin-Sequenzen erscheint.

2.4 Zusammenfassung

In diesem Teil der vorgelegten Arbeit wurde durch zwei Wege versucht sechs Gliadine in einem komplexen Extrakt mittels spezifischer Peptidsequenzen zu identifizieren.

Die erste Art der Identifizierung wurde mit Hilfe der intakten molekularen Massen der Gliadine durchgeführt. Dazu wurde eine Tuningmethode mit Hilfe von Cytochrom C zur Optimierung der Massengenauigkeit und des S/N-Verhältnisses entwickelt. Hierzu wurden die Parameter der Ionenquelle und der Transferoptik (Capillary Exit, Skimmer, Octopole & RF und Linsen) nach Herstellerangaben optimiert. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Tuningmethode war die Optimierung des ICC-Target-Wertes.

Anschließend wurden Massen von Glutenproteinen mit dieser optimierten Methode an einem IP-RP-HPLC-ESI-MS System ermittelt. Anhand dieser Tuningmethode wurden unter siebzehn verschiedenen Peaks insgesamt einundvierzig Proteinmassen ermittelt (s. Tabelle 12). Daraus wurden zwei α/β -Gliadine, ein α -Gliadin und drei γ -Gliadine identifiziert (s. Tabelle 13). Diese Gliadine wurden mit Massenunterschieden von ihren theoretischen Massen von 1.8 bis 8.0 Da identifiziert. Diese sechs passenden Gliadinmassen waren allein keine ausreichenden Informationslieferanten zur Bestätigung der Identifizierung. Um die Sequenz-Informationen für ihre unmissverständliche Identifizierung zu erhalten, wurden nun als zweiter Weg die Proteine verdaut und anschließend mittels Tandem-MS die resultierenden Peptide durch Peptidfragmentfingerprinting identifiziert. Wegen des niedrigen Vorkommens von Arginin und Lysin in den Gliadinsequenzen wurden Pepsin und Chymotrypsin anstelle von Trypsin als Verdauungsenzyme benutzt. Hierzu wurden vier separate Verdauungen durchgeführt, wobei diese jeweils einmal mit und einmal ohne Reduktion der Cysteine durchgeführt wurden. Wie generell aus den Abbildungen 26(b)-27(b) zu sehen ist, führt die Verwendung von DTT zur Reduktion von Cysteinresten zu mehr Peptididentifizierungen.

Anschließend wurden aus den vier Datensätzen mit Hilfe einer Kombination von Suchmaschinen Peptide identifiziert. Die komplette Auswertung zur Peptididentifizierung wurde von den Arbeitskreisen der Bioinformatik von *Prof. O. Kohlbacher (Universität Tübingen)* und *Prof. K. Reinert (Frei Universität Berlin)* durchgeführt. Zur Identifizierung wurde eine spezielle Datenbank hergestellt, die alle

Gliadine, Hordeine, Glutenine und Prolamine enthält (GHG-Datenbank). Um eine zuverlässigere und empfindliche Identifizierung zu erhalten, wurden als Suchmaschinen *Mascot*, *InsPect* und *OMSSA* und deren Algorithmen benutzt. Zur Auswertung der MS/MS-Spektren wurden die Identifikationsresultate dieser drei Suchmaschinen anschließend kombiniert, um eine Übereinstimmung der Identifizierung zu erbringen. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, wurden alle Identifizierungen in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Identifizierungsergebnisse mit und ohne Desamidierung für jeden Suchprozess einzeln miteinander kombiniert. Für jeden Treffer (Hit) wurden hier neue Scores im Bereich von 0 bis 100 zugewiesen, welche auf dem Rank der Peptidhits basierten. Im zweiten Schritt wurde nun eine Konsensidentifizierung aller drei Suchen durchgeführt, indem einfach die Mittelwerte der Scores berechnet wurden. Wenn es nicht anders angegeben wurde, haben alle Peptidhits Scores von mindestens 33.4, d.h. sie wurden durch mindestens zwei der drei Suchläufe identifiziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sechs Gliadine eindeutig ihrer Gliadinfamilie zugeordnet werden konnten. Wobei sich hier die eindeutige Identifizierung, aufgrund von Homologie entsprechend schwierig gestaltete.

2.5 Literaturverzeichnis

1. Mamone, G., Ferranti, P., Chianese, L., Scafuri, L., and Addeo, F. (2000) Qualitative and quantitative analysis of wheat gluten proteins by liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 897-904.
2. Mamone, G., Addeo, F., Chianese, L., Di Luccia, A., De Martino, A., Nappo, A., Formisano, A., De Vivo, P., and Ferranti, P. (2005) Characterization of wheat gliadin proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteomics*, **5**, 2859-65.
3. Fanciulli, G. , Azara, E., Wood, T.D., Delitala, G., and Marchetti, M. (2007) Liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantification of Gluten Exorphin B5 in cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*
4. Fanciulli, G. , Azara, E., Wood, T.D., Dettori, A., Delitala, G., and Marchetti, M. (2006) Quantification of Gluten Exorphin A5 in cerebrospinal fluid by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **833**, 204-9.
5. Geromanos, S., Freckleton, G., and Tempst, P. (2000) Tuning of an electrospray ionization source for maximum peptide-ion transmission into a mass spectrometer. *Anal. Chem.*, **72**, 777-790.
6. Abian, J., Oosterkamp, A.J., and Gelpi, E. (1999) Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry: practical considerations. *J. Mass spectrom.*, **34**, 244-254.
7. Alexander, J.N., Poli, J.B., and Markides, K.E. (1999) Evaluation of Automated Isocratic and Gradient Nano-Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography. *Anal. Chem.*, **71**, 2398-2409.
8. Toll, H. Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit der Elektrospray-Massenspektrometrie als Methode für die Analytik von Peptiden und Proteinen. 2005. Saarbrücken, Germany, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

9. Oberacher, H., Walcher, W., and Huber, C.G. (2003) Effect of Instrument Tuning on Detectability of Biopolymers in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **38**, 108-116.
10. Van Eckert, R., Novalin, S., Berghofer, E., Wieser, P., Goodwin, A., Whim, S., Denery-Papini, P.J., Ellis, H.J., Paraskevaidou, E., Weigerber, C. *et al.* (2000) "Preparation and characterisation of a European reference Gliadin", Proceedings of the 15TH Meeting "Working group on Prolamin analysis and toxicity". 43-50.
11. Wieser, H. "Quantitative determination of gluten proteins from flour and bread by RP-HPLC", 10TH Meeting of the Working Group on Prolamine Analysis and Toxicity. 1995, 11-21.
12. Ewart, J.A. (1969) Isolation and characterisation of a wheat albumin. *J. Sci: Food Agric.*, **20**, 730-3.
13. Patey, A.L., Shearer, G., and McWeeney, D.J. (1976) Wheat albumin and globulin proteins: purothionin levels of stored flour. *J. Sci. Food Agric.*, **27**, 688-90.
14. Weiss, W., Huber, G., Engel, K.H., Pethran, A., Dunn, M.J., Gooley, A.A., and Gorg, A. (1997) Identification and characterization of wheat grain albumin/globulin allergens. *Electrophoresis*, **18**, 826-33.
15. Wieser, H., Antes, S., and Seilmeier, W. (1998) Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem.*, **75**, 644-650.
16. Carai, M.A., Vacca, G., Serra, S., Colombo, G., Froestl, W., and Gessa, G.L. (2004) Suppression of GABA(B) receptor function in vivo by disulfide reducing agent, DL-dithiothreitol (DTT). *Psychopharmacology*, **174**, 283-90.
17. ISEMURA, T. and FUJITA-IKEDA, S. (1961) Urea denaturation of Takaamylase A. III. Size and shape of denatured protein molecule. *J. Biochem.*, **49**, 278-83.

18. Choi, N.S., Hahm, J.H., Maeng, P.J., and Kim, S.H. (2005) Comparative study of enzyme activity and stability of bovine and human plasmins in electrophoretic reagents, beta-mercaptoethanol, DTT, SDS, Triton X-100, and urea. *J Biochem Mol Biol*, **38**, 177-81.
19. David, N., Pappin, J.C., Creasy, M., and Cottrell, S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequenced databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.
20. Tanner, S., Shu, H., Frank, A., Wang, L.C., Zandi, E., Mumby, M., Pevzner, P.A., and Bafna, V. (2005) InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra. *Anal. Chem.*, **77**, 4626-39.
21. Geer, L.Y., Markey, S.P., Kowalak, J.A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D.M., Yang, X., Shi, W., and Bryant, S.H. (2004) Open mass spectrometry search algorithm. *J. Proteome Res.*, **3**, 958-64.
22. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J. , Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-402.

Kapitel III

**Absolute Quantifizierung von
toxischen Gliadin-Peptiden in
einem Weizenextrakt mittels
Massenspektrometrie**

3 Problemstellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine absolute Quantifizierungsmethode für Gliadin Peptide zu entwickeln. Diese Methode zur absoluten Quantifizierung der Peptide hatte den Hintergrund, im Auftrag des Institutes für Referenzmaterialien und -messungen der Europäischen Union (IRMM) eine Referenzmethode basierend auf Massenspektrometrie bereitzustellen.

Zur Entwicklung dieser Quantifizierungsmethode wurde ein 30-mer toxisches Gliadinpeptid ausgewählt. Die Methode sollte auch auf die Quantifizierung anderer Peptide der Glutenproteine übertragbar sein. Das heißt diese auf Massenspektrometrie basierende Quantifizierungsmethode sollte durch ihre Robustheit, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit als eine Referenzmethode für die Lebensmittelindustrie bei der Qualitätskontrolle zur Herstellung glutenfreie Produkte gelten.

Die qualitativen und quantitativen Auswertungen der Rohdaten wurden mit den Arbeitskreisen der Bioinformatik von *Prof. O. Kohlbacher (Universität Tübingen)* und *Prof. K. Reinert (Freie Universität Berlin)* durchgeführt. Das Hauptziel der Anwendung der Bioinformatik war die Automatisierung der Auswertungsprozesse. Diese Automatisierung sollte zu einer schnellen Auswertung der Daten führen. Die durch automatische Integration der Peakflächen berechneten Ergebnisse wurden mit den durch manuelle Integration erhaltenen Ergebnissen verglichen. Dadurch wurde versucht, den Einfluss der Auswertungsmethoden auf die Endergebnisse zu bestimmen.

3.1 Experimenteller Teil

3.1.1 Chemikalien und Materialien

Acetonitril (HPLC gradient-grade) wurde bei Riedel-deHaën (Seelze, Deutschland) erworben. Natriumchlorid (p. a.) war von Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland). Trifluoressigsäure (TFA, für Proteinsequenzanalyse), Natronlaugeplättchen (p. a.), Iodessigsäure (p. a.), Guanidin-HCl (p.a.), Ammoniumhydrogencarbonat (p.a.) und Pepsin vom Schweinemagen wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft. Serumalbumin vom Rind (BSA), 2-Mercaptoethanol (p. a.) und Dithiothreitol (DTT) (p. a.) wurden bei Sigma (St. Louis, MO, USA) erworben. Der lyophilisierte Gliadinextrakt wurde vom Institut für Referenzmaterialien und –messungen der Europäischen Union bereitgestellt. Das Denaturierungsreagenz RapiGestTM-SF war von Waters (Milford, MA, USA). Entionisiertes Wasser wurde von dem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Deutschland) entnommen. Der verwendete 30-mer interne Standard für die absoluten Quantifizierungsstudien wurde bei Thermo-Elektron GmbH (Ulm, Deutschland) bestellt.

3.1.2 Geräte

Die benutzte Waage (AE163) war von Mettler (Giessen, Deutschland). Zum Verdauen von Proteinproben wurden ein Eppendorf Thermomixer comfort und eine Ultrazentrifuge Biofuge 13 (Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland) benutzt. Für IP-RP-HPLC Analysen wurde ein Ultimate Capillary/Nano LC System, ausgestattet mit Mikropumpe, Beladungspumpe, Säulenschaltssystem, Autosampler und Säulenofen verwendet (LC-Packings, Amsterdam, Niederlande) benutzt. Das benutzte Massenspektrometer war eine Ionenfalle Esquire HCT (Bruker, Bremen, Deutschland), ausgestattet mit einer modifizierten ESI-Ionenquelle. Die chromatographische Säule für die IP-RP-HPLC war eine monolithische Kapillarsäule (60 x 0.20 mm ID), die im Labor selbst synthetisiert wurde und bei LC-Packings kommerziell erhältlich ist. Als Trapsäule für die zweidimensionale Chromatographie wurde eine monolithische PS/DVB-Kapillarsäule

mit den Dimensionen 10 x 0.20 mm ID benutzt. Die Trennsäule wurde mit der ESI-Spraykapillare (Quarz, 90 µm OD, 20 µm ID, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) mittels eines Microtight Unions aus Stahl (Fritz Gyger AG Swiss, Gwatt-Thun, Schweiz) verbunden.

3.1.3 Identifizierung der toxischen Peptide in einem Gliadinextrakt

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Glutenproteine durch vier verschiedene klassische Verdaumöglichkeiten identifiziert. Gleichzeitig wurde versucht, durch das Zuordnen der Aminosäuresequenzen diese toxischen Peptide auch zu identifizieren. Entsprechend der Ergebnisse wurden folgende Peptide identifiziert:

LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSQQPY

Die OMSSA Identifizierungsscores dieses Peptids waren signifikant. Die Mascot-Identifizierung unterstützte auch die Identifizierung dieses toxischen Peptids. Wegen seines C-terminalen Tyrosins wurde dieses Peptid nur in den chymotryptischen Verdaus gefunden.

VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQF

Mascot sowie InsPect konnten das 30-mer toxische Peptid nicht identifizieren. Auf der anderen Seite führen hohe signifikante Scores von OMSSA zur zuverlässigen Identifizierung dieses Peptids.

VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL

Dieses toxische Peptid wurde durch OMSSA mit einem nichtsignifikanten Score identifiziert. Diese Identifizierung sollte durch andere Identifizierungsmechanismen validiert werden. Keine der anderen Identifizierungssuchen waren in der Lage, dieses Peptid aus den MS/MS-Spektren zu identifizieren.

LGQQQPFPPQQPYQPQPF

Dieses toxische Peptid wurde durch OMSSA gefunden, konnte aber trotzdem nicht in irgendeiner Identifizierung zugeordnet werden. Der Score war wie für das Peptid VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPL so insignifikant, dass die Identifizierung sehr zweifelhaft war.

Das toxische Peptid LGQGSFPSQQN, das in Tabelle 9 dargestellt ist, konnte nicht gefunden werden. Die Peptide LGQQQPFPPQQPY und PQPQPFPSQQPY konnten nicht separat gefunden werden. Jedoch enthält eines der toxischen Peptide genau jene zwei Peptide als Präfix und Suffix. Keine der Proteasen war in der Lage, dieses Peptid zu schneiden.

Das Peptid (**VQQQQFPGQQQPFPPQQPYQPQPFPSQQPY**, 31-mer) konnte nicht intakt gefunden werden. Jedoch das Präfix **VQQQQFPGQQQPFPPQQPYQPQPF** wurde durch OMSSA mehrmals in den unterschiedlichen Datensätzen mit einem besten Score von 0.08 gefunden. Da dieses Präfix in der Datenbank einzigartig ist, war die Identifizierung dieses Präfixes äquivalent zu der Identifizierung des 31-mer toxischen Peptids. Zudem war OMSSA nicht in der Lage das komplette Peptid zu finden, weil es nicht möglich war, mehr als drei falsche Spaltungen in der Datenbanksuche zuzulassen.

Das toxische Peptid (**LQLQPFQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF**, 33-mer) konnte nicht gefunden werden. Auf der anderen Seite wurde die Subsequenz mit fehlendem Präfix LQLQPF als **PQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF** gefunden. Jedoch konnte lediglich OMSSA dieses Peptid mit einem sehr niedrigen Score identifizieren. Die Subsequenz erscheint in der Sequenzdatenbank nur innerhalb der Sequenz des kompletten toxischen Peptids. OMSSA war auch nicht in der Lage, das intakte Peptid zu finden. Wie bereits geschildert, konnten nicht alle Peptide erfolgreich in Folge der klassischen Verdauung identifiziert werden. Als Gründe dafür kommen zunächst die möglichen Einstellungseinschränkungen der drei Suchmaschinen in Betracht. Ein weiterer Grund kann auch ein instrumentelles Problem sein. Je nach Höhe des Ladungsgrades und Auflösung des verwendeten Massenspektrometers kann das Molekulargewicht der untersuchten Substanz direkt aus dem erhaltenen m/z-Signal und dem dazugehörigen ¹³C-Isotopenmuster ermittelt werden. Die Auflösung von herkömmlichen Ionenfallen- und Quadrupol-Analysatoren (Auflösung: 2000-4000) erlaubt eine eindeutige Bestimmung des Molekulargewichtes über das ¹³C-Isotopenmuster nur bis zu einer maximalen Ladung von 3+. Anhand des m/z-Abstands der aufeinander folgenden Isotopensignale kann auf die vorliegende Ladung des Analytmoleküls geschlossen werden. Beträgt bei einer 1-fachen Ladung beträgt der Abstand der Isotopenpeaks 1.0 m/z, so sinkt der Isotopenabstand bei einer 4-fachen Ladung auf 0.25 m/z. Nach Ermittlung der vorliegenden Ladung kann aus dem m/z-Verhältnis anschließend die molekulare Masse bestimmt werden. Ist das Analytmolekül jedoch mehr als 3-fach geladen, kann in den meisten Fällen das Isotopenmuster nicht mehr ausreichend aufgelöst werden (Ausnahme: Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS)). Hier kann auch die Suchmaschine anschließend keine sinnvollen Ergebnisse liefern.

Abgesehen von den instrumentellen Einschränkungen kann das auch mit der experimentellen Durchführung der Verdauung zusammenhängen. Bei dem klassischen Fall des Verdauens muss man Dialyse der Probe als ein Versuchsschritt durchführen, um die niedermolekularen Substanzen aus der Probe zu entfernen. Dieser Schritt führt immer zu einem Verlust der realen Probe aufgrund der Adsorption der Probe an der Dialyseschlauchwand, wobei diese Adsorptionseffekte ein besonderer Fall bei den Gluten-Kleberproteinen sein können. In Folge dieser Effekte wird die Menge der Probe vor der Dialyse nicht äquivalent der Probemenge nach der Dialyse. Aus diesem Grund kann man natürlich jene Proteine verlieren, die diese toxischen Peptidsequenzen enthalten. Des Weiteren können diese Probenverluste auch eine große Rolle bei dem Verdauung der Proteine spielen. Üblicherweise werden Massenmengen zwischen Enzym und Substrat in verschiedenen Verhältnissen eingestellt. Im Falle eines Überschusses des verwendeten Enzyms kann es in einem bestimmten Verdauungszeitraum zu entweder vielen ungespaltenen Spaltstellen (eng. missed cleavage) oder einer kompletten Spaltung der Proteine führen. Das kann auch eine weitere Erklärung sein, warum z.B. das 33-mer toxische Peptid nicht identifiziert werden konnte. Insbesondere werden jedoch die quantitativen Aussagen durch diese Probenverluste verfälscht. Um all diese bei dem klassischen Verdauung auftretenden Probleme und Schwierigkeiten zu beheben, sollte eine Lösung gefunden werden, die folgende Anforderungen erfüllt:

i. Steigerung der Effizienz des Proteinverdauens

Ein effizienter Proteinverdauung ist wünschenswert um eine repräsentative Peptidmischung herzustellen, die einen hohen Proteinanteil an Aminosäuresequenzen umfasst. Jedoch wurde gezeigt, dass enzymatische Spaltung bei den in Wasser unlöslichen und proteolytisch beständigen Proteinen schwierig ist. Dadurch werden begrenzte Mengen von Peptiden erzeugt (1-3). Hohe Peptidabdeckung ist besonders wünschenswert, wenn posttranslationale oder andere Proteinmodifikationen studiert werden, wobei die Leistungsfähigkeit des proteolytischen Verdauens auch eine Auswirkung auf die Analyse der komplexen Proteinmischungen hat (4-7).

ii. Zunahme der Ausbeute der hydrophoben bzw. proteolytisch resistenten Proteine

Gliadine bzw. Glutenproteine sind hydrophobe Proteine. Durch Studien wurde gezeigt, dass die hydrophoben und proteolytisch beständigen Proteine keine ausreichende Menge von Peptiden zur Analyse erzeugen (1,8).

iii. Reduzieren der Vorbereitungsprozeduren des Verdaus

Die klassischen Verdaue werden üblicherweise von einigen Stunden bis über Nacht durchgeführt, um eine genügende Menge von Peptiden für die Analyse zu erzeugen (9).

Es wurde versucht, diese Probleme mit Hilfe eines speziellen Denaturierungsreagenz namens RapiGestTM- SF zu beheben (10,11-14). Im folgenden Kapitel werden die chemischen Eigenschaften dieser Substanz angesprochen.

3.1.4 Denaturierungsdetergenz RapiGest™-SF

Ein generelles Problem für analytische Methoden stellt oft die Denaturierung von Proteinen dar, da diese meist unter Bedingungen abläuft, die die ausschließende Trennung mal/oder Detektion empfindlich stören. So wird z.B. auf herkömmliche Art mit hochkonzentrierter Harnstofflösung gearbeitet, die eine folgende Chromatographie mit MS-Detektion stark beeinträchtigt oder gar unmöglich macht. Als Konsequenz muss vor der eigentlichen HPLC-MS-Analytik das Denaturierungsreagenz Zeit- und arbeitsaufwändig, z.B. durch Dialyse, entfernt werden.

Das Denaturierungsreagenz RapiGest™-SF, das im 2002 von der Firma Waters (Milford, MA, USA) eingeführt wurde, behebt einige Schwachstellen der klassischen Verfahren. Die Struktur des Tensids ist in in Abbildung 29 (a) dargestellt.

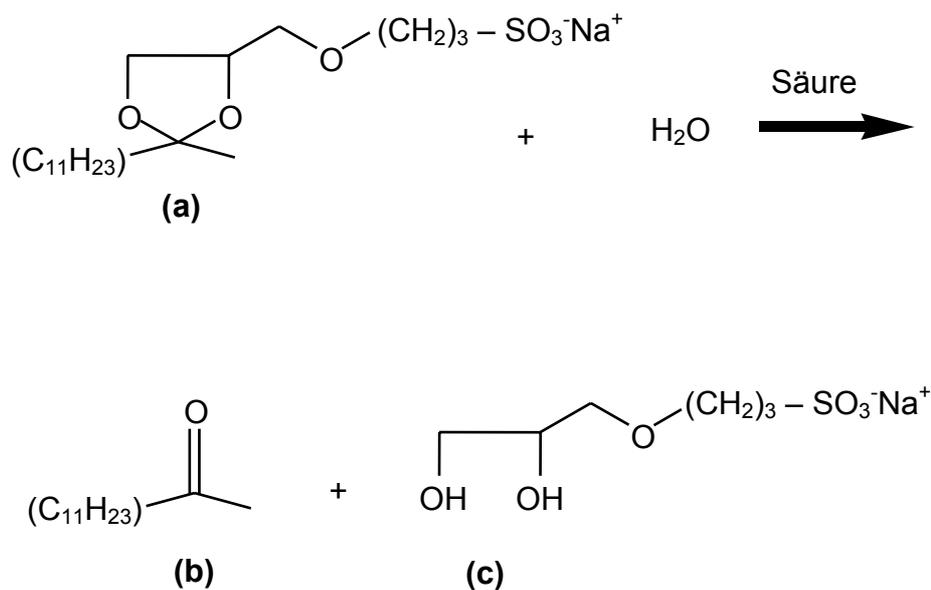


Abbildung 29. Struktur von RapiGest™-SF und ihre Abbauprodukte.

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich, besitzt das Tensid eine säurelabile Ketalgruppe, die eine einfache Entfernung der Substanz nach erfolgreicher Denaturierung ermöglicht. Dazu wird die Lösung angesäuert, und das Tensid wird in das wasserunlösliche Keton (Abbildung 29b) und das hochpolare Sulfonat (Abbildung 29c) gespalten.

Das Keton kann dann z.B. durch Zentrifugation bei 13 000 rpm abgetrennt werden, das Sulfonat (Abbildung 29c) wird anschließend während der Anreicherung im 2D-HPLC-MS-System entfernt, indem es, anders als die Probe, die Trapsäule inert verlässt. Der zeitraubende Arbeitsschritt der Dialyse wird dadurch vermieden, zudem steigt auch die Wiederfindungsrate, da diese Arbeitsschritte alle in einem Vial durchgeführt werden können und Probenverluste durch Wandadsorption bzw. Umpipettieren deutlich verringert werden. Darüberhinaus ist RapiGest™-SF ein sehr aktives Reagenz, welches schon bei Zusätzen im unteren Prozentbereich (0.1-2%) aktiv ist, während bei herkömmlichen Methoden deutlich große Reagenzmengen eingesetzt und entsprechend aufwändig wieder entfernt werden müssen.

In Tabelle 15 sind verschiedene Zusammensetzungen zur Vorbereitung der RapiGest™-SF Lösungen dargestellt.

Tabelle 15: Vorbereitung der RapiGest™-SF Lösungen in verschiedenen Zusammensetzungen (w/v).

Volumen des zu 1 mg RapiGest™-SF zugegebenen Puffers	RapiGest™-SF Konzentration (w/v)
1 mL	0.1 %
500 µL	0.2 %
200 µL	0.5 %
100 µL	1.0 %
50 µL	2.0 %

Abhängig von den Eigenschaften der zu denaturierenden Proteine und dem Verwendungszweck wurden RapiGest™-SF-Lösungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen hergestellt.

Zur Herstellung der RapiGestTM-SF-Lösung werden 1 mg von pulverförmigen RapiGestTMSF in einem 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat Puffer gelöst. Durch das Auflösen des RapiGestTMSF-Pulvers in unterschiedlichen Volumina von 50 µL bis 1 mL werden Konzentrationen von 0.1 % (w/v) bis 2.0 % (w/v) erreicht (s. Tabelle 15). Zur normalen Denaturierung wird üblicherweise die Konzentration von RapiGestTMSF-Pulver von 0.1 % (w/v) empfohlen (Anweisung von Waters). Mit dieser Konzentration an RapiGestTM-SF sind die nicht- oder wenighydrophoben Proteine sowie Myoglobin bei 37°C hervorragend zu denaturieren. Falls die zu denaturierenden Proteine wie Gliadine hoch hydrophob sind, dann sollte die Konzentration von RapiGestTM-SF entweder größer als 0.1 % (w/v) eingestellt werden oder die zu denaturierende Proteine bei Temperaturen zwischen 85-95°C inkubiert werden (Anweisung von Waters).

3.1.5 Peptischer Verdau von BSA mit RapiGest™-SF

Entsprechend den Empfehlungen von Waters für die Verwendung der RapiGest™-SF zur Bestimmung hydrophober und cysteinhaltiger Proteine wurde zuerst diese Substanz getestet und dadurch ein Protokoll entwickelt. Zum Testen wurde als Standardprotein das BSA gewählt. Das BSA wurde ausgewählt, weil das BSA wie Gliadine auch Cysteine enthält.

Dazu wurden 1.026 mg BSA in 1.5 mL Vial eingewogen. Dann wurde das Protein in 500 µL 0.2% (w/w) RapiGest™-SF-Lösung gelöst und bei 90°C (Thermomixer) für 5 min bei 900 rpm denaturiert. Danach wurden die Schwefelbrücken durch Zugabe von 8.5 µL 300 mM DTT bei 60 °C für 1 h bei 900 rpm reduziert. Nach diesem Schritt wurden alle Proben auf Raumtemperatur (RT) temperiert und für 30 min mit 10 µL 2M Iodessigsäure versetzt, um die freien Schwefelgruppen zu methylalkylieren. Diese Reaktion verlief unter Lichtausschluss. Um den Überschuss von 2M Iodessigsäure zu entfernen, wurden die Proben für 30 min bei RT mit 20 µL 1M 2-Mercaptoethanol versetzt (kein Lichtausschluss). Zum peptischen Verdau wurden 1.083 mg Pepsin in 1 mL dest. Wasser gelöst. Vor den Verdauen wurden die Proteinlösung, die Pepsinlösung und zusätzlich zur Einstellung des pH-Wertes 1M Guanidin-HCl Puffer, pH=1.3 durch Erwärmen für 15 min bei 37°C bei 900 rpm aktiviert bzw. zum Verdau vorbereitet. Nach der Aktivierung wurde durch Zugabe von 46.2 µL (50.00 µg Pepsin) Pepsinlösung in den vier Proteinlösungen ein Enzym/Protein-Verhältnis von 1/20 (w/w) erreicht. Dann wurde die Proteinlösung mit 350 µL 1M-Guanidin-HCl Puffer, pH= 1.3 angesäuert. Der Verdau wurde bei 37°C für 3 Std. bei 900 rpm durchgeführt. Anschließend wurde die Verdaureaktion irreversibel durch Zugabe von 100 µL 1M NaOH gestoppt. (ca. pH= 7-8)

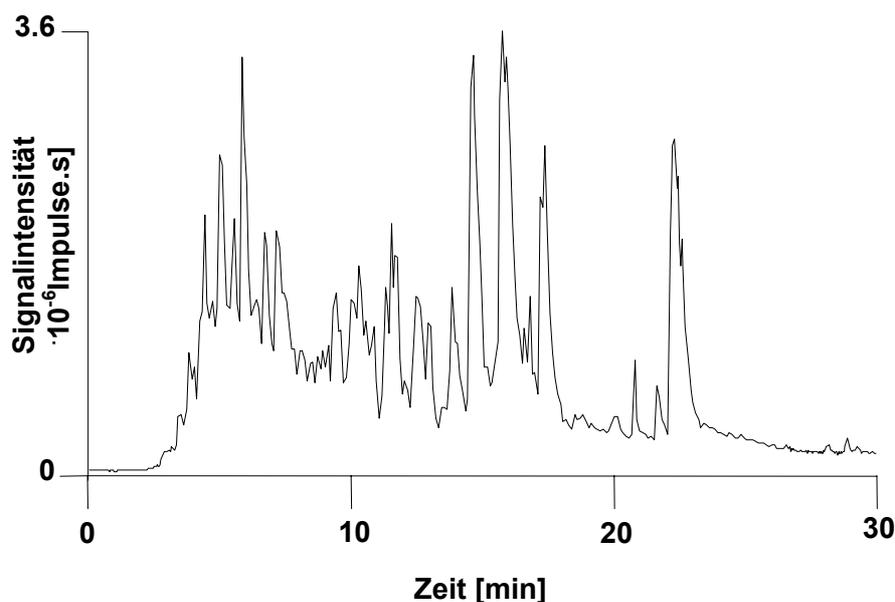


Abbildung 30. IP-RP-HPLC-MS/MS Analyse von peptisch verdaulichem BSA durch Denaturierung mit RapiGestTM-SF.

PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Gradient, 0 - 25% B in 30 min; Fluss, 2 µL/min; Temperatur, 50 °C; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Loopvolumen, 20 µL; Injektionsvolumen, 5 µL (partial); Detektion, MS/MS; Scan Modus, Ultra - Scan Modus; Massenbereich, 500-1500 m/z; Injizierte Menge: 1.0 µg BSA-Peptide.

In Abbildung 30 ist die IP-RP-HPLC-MS/MS-Analyse der BSA-Peptide nach dem peptischen Verdau dargestellt. Das aufgenommene MS/MS-Spektrum wurde mittels MASCOT-Software ausgewertet. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten, die in Tabelle 16 zusammengefasst sind. Die Daten wurden direkt aus der Software übernommen. Die Datenbanksuchen wurden mit der MSDB Datenbank unter der Taxonomie **Mammalia (mammals)** durchgeführt. Dadurch konnten fünf Serumalbumine zugeordnet werden. Die Datenbank konnte für das BSA 21 Peptide mit MOWSE-Scores von 7 bis 64 (s. Tabelle 21) zuordnen.

Tabelle 16 : Ergebnisse der Datenbanksuche mittels MASCOT-Software.

Database : MSDB 20060529x (3038380 sequences; 1012707669 residues)
 Taxonomy : Mammalia (mammals) (339269 sequences)
 Timestamp : 23 Aug 2006 at 12:18:23 GMT
 Significant hits : [Q3SZR2_BOVIN](#) ALB protein.- Bos taurus (Bovine).
 [S57632](#) serum albumin precursor - cat
 [ABPGS](#) serum albumin precursor - pig (fragment)
 [AAB58347](#) OCU18344 NID: - Oryctolagus cuniculus
 [ABHUS](#) serum albumin precursor [validated] - human

1. [Q3SZR2_BOVIN](#) Mass: 71221 Score: 447 Queries matched: 21
 ALB protein.- Bos taurus (Bovine).

Proteins matching the same set of peptides:

[AAN17824](#) Mass: 71309 Score: 447 Queries matched: 21
 AF542068 NID: - Bos taurus

Query Peptide	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank
9	678.2700	677.2627	677.3418	-0.0791	0	31	2.6	3
11	713.3200	712.3127	712.4119	-0.0992	0	23	17	2
13	713.3400	712.3327	712.4119	-0.0792	0	(20)	31	2
18	889.5000	888.4927	888.4916	0.0011	1	7	7.6e+02	1
26	541.2700	1080.5254	1080.5603	-0.0349	1	40	0.27	1
29	582.7200	1163.4254	1163.5202	-0.0948	1	41	0.26	1
31	589.6700	1177.3254	1177.4921	-0.1666	1	27	4.8	1
38	619.7800	1237.5454	1237.5767	-0.0313	0	19	35	1
67	676.2500	1350.4854	1350.6608	-0.1753	1	(20)	27	1
70	676.5000	1350.9854	1350.6608	0.3247	1	40	0.22	1
84	711.2300	1420.4454	1420.8038	-0.3583	1	11	2.4e+02	2
96	750.5800	1499.1454	1498.8355	0.3100	0	24	7.8	1
103	769.9300	1537.8454	1537.7664	0.0791	1	(16)	93	1
104	769.9900	1537.9654	1537.7664	0.1991	1	46	0.11	1
112	775.0000	1547.9854	1547.8307	0.1547	2	33	2.6	1
135	879.1700	1756.3254	1755.8349	0.4906	0	64	0.0013	1
138	882.1700	1762.3254	1761.9988	0.3266	2	11	2.6e+02	2
150	929.8400	1857.6654	1857.0836	0.5819	0	10	3.6e+02	1
41	638.7900	1913.3482	1912.8659	0.4823	1	(9)	6.2e+02	1
165	957.7600	1913.5054	1912.8659	0.6396	1	19	36	1
106	771.3500	2311.0282	2310.1889	0.8393	1	7	8.4e+02	2

3.1.6 Peptischer Verdau des Gliadinextraktes durch Denaturierung mittels RapiGest™SF

Dasselbe Protokoll wie in Kapitel 3.3.2. wurde für 1.007 mg Gliadinextrakt durchgeführt. Nach dem Verdau wurden die entstandenen Peptide wie in Abbildung 31a in einem IP-RP-HPLC-MS-System getrennt und analysiert.

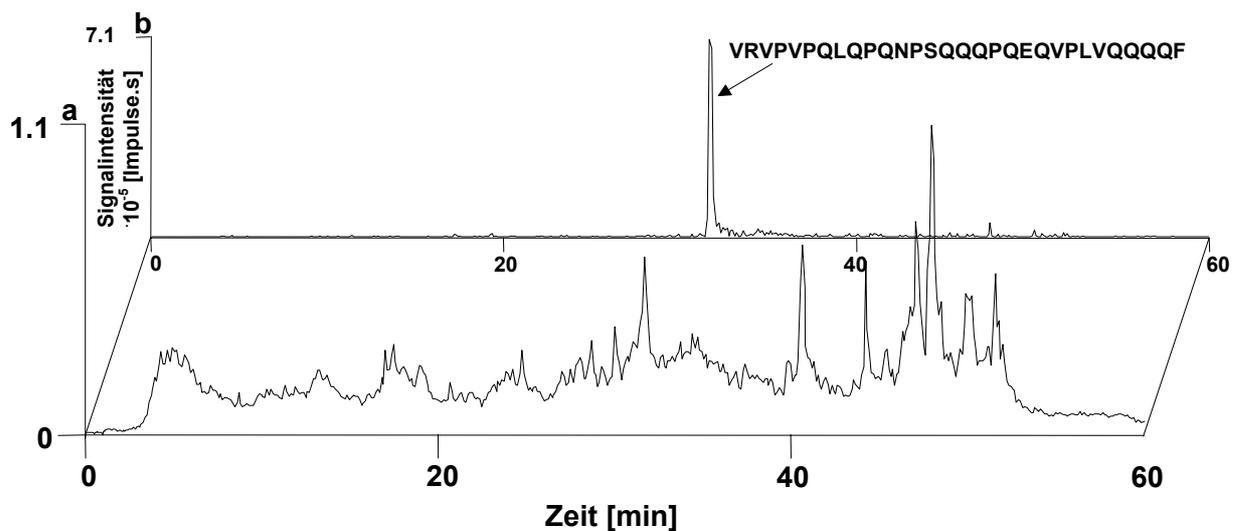


Abbildung 31. IP-RP-HPLC-MS/MS-Analyse von peptisch verdautem Gliadinextrakt durch Denaturierung mit RapiGest™-SF.

Abbildung 31 (a). (TIC) Totalionenstromchromatogramm , Abbildung 31 (b). (EIC) extrahiertes Ionenchromatogramm.

PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Gradient, 0 - 30% B in 60 min; Fluss, 2 µL/min; Temperatur, 50 °C; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Injektionsvolumen, 1 µL (vollloop); Detektion, MS/MS; Scan Modus, Standard Enhanced Modus; Massenbereich, 600-1500 m/z; Injizierte Menge: 100.4 ng Gliadinpeptide.

Das aufgenommene MS/MS-Spektrum wurde mittels MASCOT-Software ausgewertet. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten, die in Tabelle 17 zusammengefasst sind.

Tabelle 17 : Ergebnisse der Datenbanksuche mittels MASCOT-Software.

Database : MSDB 20060529x (3038380 sequences; 1012707669 residues)
Taxonomy : Other green plants (110484 sequences)
Timestamp : 23 Aug 2006 at 13:54:46 GMT
Significant hits : [Q68AN2_WHEAT](#) LMW-s KS2.- Triticum aestivum (Wheat).
[Q8W3X6_WHEAT](#) Low-molecular-weight glutenin subunit group 1 type I.
- Triticum aestivum (Wheat).
[Q5MFI2_WHEAT](#) Low molecular weight glutenin. - Triticum aestivum
(Wheat).
[Q5MFN4_WHEAT](#) Low molecular weight glutenin (Fragment).- Triticum
aestivum (Wheat).
[Q6QGV8_WHEAT](#) LMW glutenin pGM107. - Triticum aestivum (Wheat).
[Q94G96_WHEAT](#) Gamma-gliadin. - Triticum aestivum (Wheat).
[Q3LGB3_WHEAT](#) Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment).
- Triticum aestivum (Wheat).
[Q8W3X5_WHEAT](#) Low-molecular-weight glutenin subunit group 2 type I.
- Triticum aestivum (Wheat).
[Q9M6P7_WHEAT](#) Gamma-gliadin (Fragment).- Triticum aestivum
(Wheat).
[Q571Q5_WHEAT](#) Putative LMW-glutenin subunit. - Triticum aestivum
(Wheat).
[Q3YFI0_TRITU](#) Alpha-type gliadin (Fragment).- Triticum turgidum
subsp. dicoccoides.
[Q5TLY8_WHEAT](#) Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment),
- Triticum aestivum (Wheat).

11. [Q3YFI0_TRITU](#) Mass: 31825 Score: 59 Queries matched: 2
Alpha-type gliadin (Fragment). - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
193	1012.4500	3034.3282	3034.4977	-0.1695	3	30	0.39	1	F.LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSQQPYL.Q
227	1164.3100	3491.7082	3491.8273	-0.1191	2	29	0.42	1	M.VRVVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQF.L

Proteins matching the same set of peptides:

[Q9M4M0_WHEAT](#) Mass: 32539 Score: 59 Queries matched: 2

Alpha-gliadin.- Triticum aestivum (Wheat).

[Q9M4M1_WHEAT](#) Mass: 32829 Score: 59 Queries matched: 2

Alpha-gliadin. - Triticum aestivum (Wheat).

[Q9M4M2_WHEAT](#) Mass: 32541 Score: 59 Queries matched: 2

Alpha-gliadin. - Triticum aestivum (Wheat).

[Q41533_WHEAT](#) Mass: 30325 Score: 59 Queries matched: 2

Alpha-gliadin (Fragment). - Triticum aestivum (Wheat).

Die Datenbanksuchen wurden mit der MSDB Datenbank unter der Taxonomie **Other Green Plants** durchgeführt. Dadurch konnten drei Gliadine zugeordnet werden, die das 30-mer toxische Peptid enthielten (s. Tabelle 17). Die MOWSE-Scores waren größer als 15, d.h. das 30-mer toxische Peptid stammt mit einer großen statistischen

Sicherheit von Gliadinen. Weiters konnten über die Datenbank Peptide aus weiteren Weizenproteinen wie Glutenine und andere Gliadine in der Analyse zugeordnet werden, welche das 30-mer toxische Peptid nicht enthalten. Der gewählte Massenbereich für die Analyse war 600-1500 m/z. Von dieser HPLC-MS/MS-Analyse wurde für das 30-mer toxische Peptid ein extrahiertes Ionenchromatogramm mit einer Isolationsbreite von ± 0.5 m/z-Einheiten erstellt, das in Abbildung 31 (b) dargestellt ist.

Durch diese Verdaustudie wurde bewiesen, dass das 30-mer toxische Peptid durch Denaturierung mittels RapiGestTM-SF erhalten werden konnte. Weil bei diesem Denaturierungsverfahren alle Reaktionen nur in einem Vial verlaufen, sind durch diese Methode die Probenverluste minimiert, was für eine präzise Quantifizierung von großer Bedeutung ist. Aber es sollten noch weitere Vorstudien wie Überprüfen der Reproduzierbarkeit der peptischen Verdauung und Optimierung der Verdauungszeit gemacht werden. All diese Vorstudien wurden in den kommenden Kapiteln durchgeführt.

3.1.7 Studie zur Optimierung der Verdauzeit über die Peakflächen des 30-mer toxischen Peptides

Das Ziel dieser Studie war die Optimierung der Verdauzeit über die Bestimmung der Peakflächen der durch peptischen Verdau entstandenen 30-mer toxischen Peptide. Durch diese Optimierung wurde versucht, die höchste Ausbeute an 30-mer toxischen Peptiden zu bekommen. Weil das Pepsin im Vergleich zum Trypsin aktiver ist, hat es kürzere Verdauzeiten. Deshalb wurde für diese Studie im Rahmen eines Zeitintervalls bei 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 und 6.0 Stunden mit drei parallelen Verdauen durchgeführt. Hier war zu beachten, dass die Konzentrationen aller Verdau gleich sind. Deswegen wurden erst 3.800 mg Proteinextrakt in einem 15 mL Plastikgefäß mit 1600 µL 0.2% iger RapiGest™-SF-Lösung versetzt. Dann wurde in einem Wasserbad für 10 min bei 85-90°C denaturiert. Danach wurde die gesamte Lösung in drei frischen 1.5 mL-Vials auf jeweils 500 µL Aliquote aufgeteilt (in jedem Vial sind 1187.5 µg Proteinpulverextrakt vorhanden). Danach wurden die Schwefelbrücken durch Zugabe von 8.5 µL 300 mM DTT bei 60 °C für 1 Std. bei 900 rpm reduziert. Nach diesem Schritt wurden alle Proben auf Raumtemperatur (RT) temperiert und für 30 min mit 10 µL 2M Iodessigsäure versetzt, um die freien Schwefelgruppen zu carboxymethylieren. Diese Reaktion verlief unter Lichtausschluss. Um den Überschuss von 2M Iodessigsäure zu entfernen, wurden die Proben für 30 min bei RT mit 20 µL 1M 2-Mercaptoethanol versetzt (kein Lichtausschluss). Zum peptischen Verdau wurden 0.935 mg Pepsin in 1 mL dest. Wasser gelöst. Vor den Verdauen wurden alle drei Proteinlösungen, die Pepsinlösung und zusätzlich der zur Einstellung des pH-Wertes verwendete 1M Guanidin-HCl Puffer (pH=1.3) durch Erwärmen für 15 min bei 37°C bei 900 rpm aktiviert bzw. zum Verdau vorbereitet. Nach der Aktivierung wurde durch Zugabe von 63.5 µL (59.38 µg-Pepsin) Pepsinlösung in den drei Proteinlösungen ein Enzym/Protein-Verhältnis von 1/20 (w/w) erreicht. Dann wurden alle Proteinlösungen mit jeweils 350 µL 1M-Guanidin-HCl Puffer, pH= 1.3 versetzt, um den pH-Wert in den sauren Bereich zu bringen. 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 und 6.0 Stunden nach dem Start der drei parallelen Verdau bei 37°C und 900 rpm wurden aus jedem Verdau jeweils 120 µL Probelösungen entnommen und mit 10 µL 1M NaOH die Reaktionen irreversibel gestoppt (ca. pH= 8-9).

Tabelle 18: Resultierende Peakflächen des 30-mer toxische Peptides aus den EIC der entsprechenden Verdauzeiten (4 Wiederholungsmessungen).

Verdauzeit [h]	Peakflächen [Impulse's] des 30 mer toxischen Peptides
0.5	5361500
0.5	5142077
0.5	5225793
0.5	5166193
1.0	7378568
1.0	7455249
1.0	7408373
1.0	7536457
1.5	8583122
1.5	8540806
1.5	8311771
1.5	8188280
2.0	8283223
2.0	8518550
2.0	8576850
2.0	8502777
2.5	9220601
2.5	9114150
2.5	9277370
2.5	9077150
3.0	9467024
3.0	9329890
3.0	9560135
3.0	9332817
6.0	8495501
6.0	8608200
6.0	9540298
6.0	9517501

Die Analysen dieser Studie wurden mittels IP-RP-HPLC-MS mit einem Gradienten 0-30 %B in 60 min durchgeführt. Alle Peptide wurden in einem Massenbereich zwischen 600-1500 m/z detektiert. Für eine aussagekräftige Statistik wurden die Messungen jeweils vier Mal wiederholt. In Tabelle 18 sind die resultierenden Peakflächen des 30-mer toxischen Peptides aus den EIC der entsprechenden Verdauzeiten dargestellt. Alle Peakflächen wurden aus dem TIC mit der Masse von

1165.4 m/z und einer Isolationsbreite von ± 0.5 m/z extrahiert. Sämtliche Daten wurden mit der Software Data-Analysis (Versionsnummer 3.4) von Bruker ausgewertet. Die resultierenden Peakflächen wurden mit Hilfe einer Gauß-Funktion (Glättungsfaktor 5) geglättet und anschließend integriert. In Tabelle 19 werden die Mittelwerte der integrierten Peakflächen bei einzelnen Verdauzeiten, Standardabweichungen, RSD des 30-mer toxischen Peptides (1165.4 m/z / +3) gezeigt.

Tabelle 19: Mittelwerte der integrierten Peakflächen bei einzelnen Verdauzeiten, Standardabweichungen, RSD des 30-mer toxischen Peptides (1165.4 m/z / +3).

Bei einzelnen Verdauzeiten: Mittelwerte der Peakflächen [Impulse's], Standardabweichung, RSD des 30-mer toxischen Peptides.							
	0.5 Std.- Verdau	1.0 Std.- Verdau	1.5 Std.- Verdau	2.0 Std.- Verdau	2.5 Std.- Verdau	3.0 Std.- Verdau	6.0 Std.- Verdau
Mittelwert [N=4]	5223891	7444662	8405995	8470350	9172318	9422467	9040375
Stabw.	98256	68857	187817	128755	92750	111871	566049
RSD [%]	1.9	0.9	2.2	1.5	1.0	1.2	6.3

Wie man in Tabelle 19 sieht, erhält man bei 0.5 Std. durch peptischen Verdau das 30-mer toxische Peptid. Das beweist, wie hoch aktiv und spezifisch das Pepsin ist. Bis 3 h nimmt die Ausbeute des Peptides kontinuierlich zu. Bei einer Verdauzeit von 3 h ergibt sich die maximale Ausbeute an dem toxischen Peptid mit dem größten Flächenwert (9422467 Impulse.s). Nach 6 Std. Verdau sieht man aus der Tabelle 19, dass der Mittelwert der Peakflächen deutlich gesunken ist. Dies kann durch einen Abbau des toxischen Peptides durch Pepsin erklärt werden. Aufgrund dessen wurde 3 h Verdaue mit einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1/20 als Verdauoptimum angenommen. Alle weiteren Verdaue wurden nach diesem Optimum durchgeführt. Die relativen Standardabweichungen der Ergebnisse bei einzelnen Verdauzeiten variieren zwischen 0.9% und 6.3%.

3.1.8 Studie zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der drei parallelen Verdaue bei 3 Std. über die Peakflächen des 30-mer toxischen Peptides

Das Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der drei parallelen Verdaue bei 3 h über die Peakflächen der durch peptischen Verdau entstanden 30-mer toxischen Peptide. Deswegen wurden die Proben der drei parallelen Verdaue bei 3 Std. mittels eines IP-RP-HPLC-MS-Systems analysiert. (s. Abbildung 32)

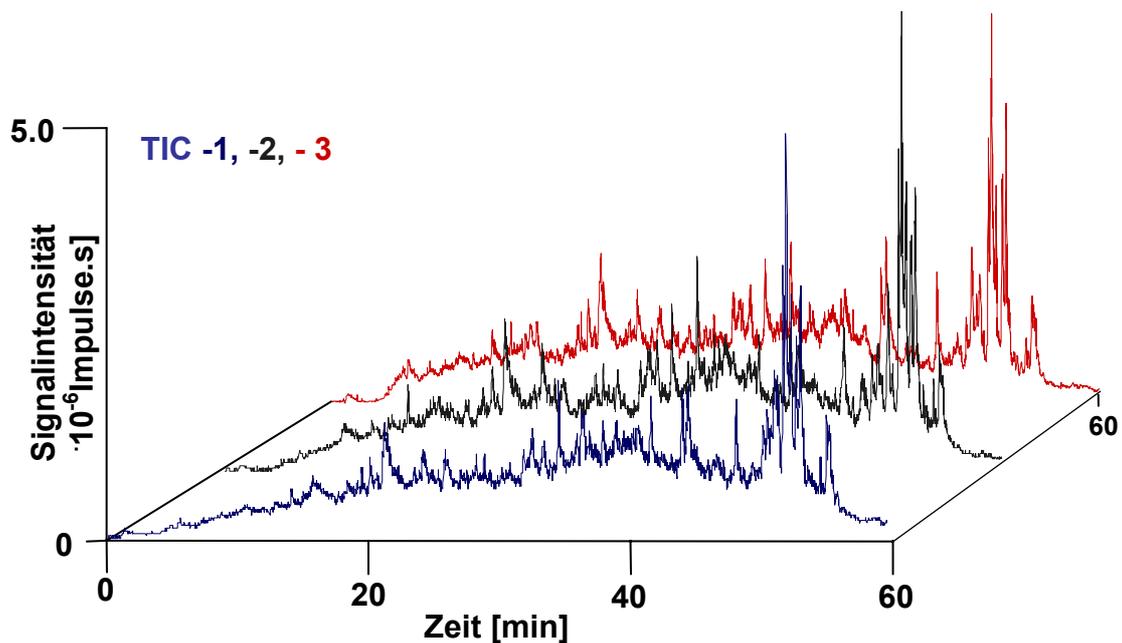


Abbildung 32. IP-RP-HPLC-MS-Analyse der drei parallelen peptischen Verdaue von Gliadinextrakten zur Optimierung der Reproduzierbarkeit.

Trap Säule, PS/DVB Monolith, 60 x 0.10 mm ID; Gradient, 100% Wasser in 0.1% HFBA; Fluss, 100 μ L/min; Trap-Zeit, 3 min; Analytische Säule, PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Gradient, 0 - 30% B in 60 min; Fluss, 2 μ L/min; Temperatur, 50 °C; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Injektionsvolumen, 1 μ L (vollloop); Detektion, MS/MS; Scan Modus, Standard Enhanced Modus; Massenbereich, 600-1500 m/z; Injizierte Menge: 100 ng Gliadinpeptide.

Die Analysen dieser Studie wurden mittels IP-RP-HPLC-MS mit einem Gradienten 0-30 %B in 60 min durchgeführt. Alle Peptide wurden in einem Massenbereich zwischen 600-1500 m/z detektiert. Für eine aussagekräftige Statistik wurden die Messungen jeweils vier Mal wiederholt. Alle Peakflächen wurden aus dem TIC mit der Masse von 1165.4 m/z und einer Isolationsbreite von ± 0.5 m/z extrahiert (s. Abbildung 33). Sämtliche Daten wurden mit der Software Data-Analysis (Versionsnummer 3.4) von Bruker ausgewertet.

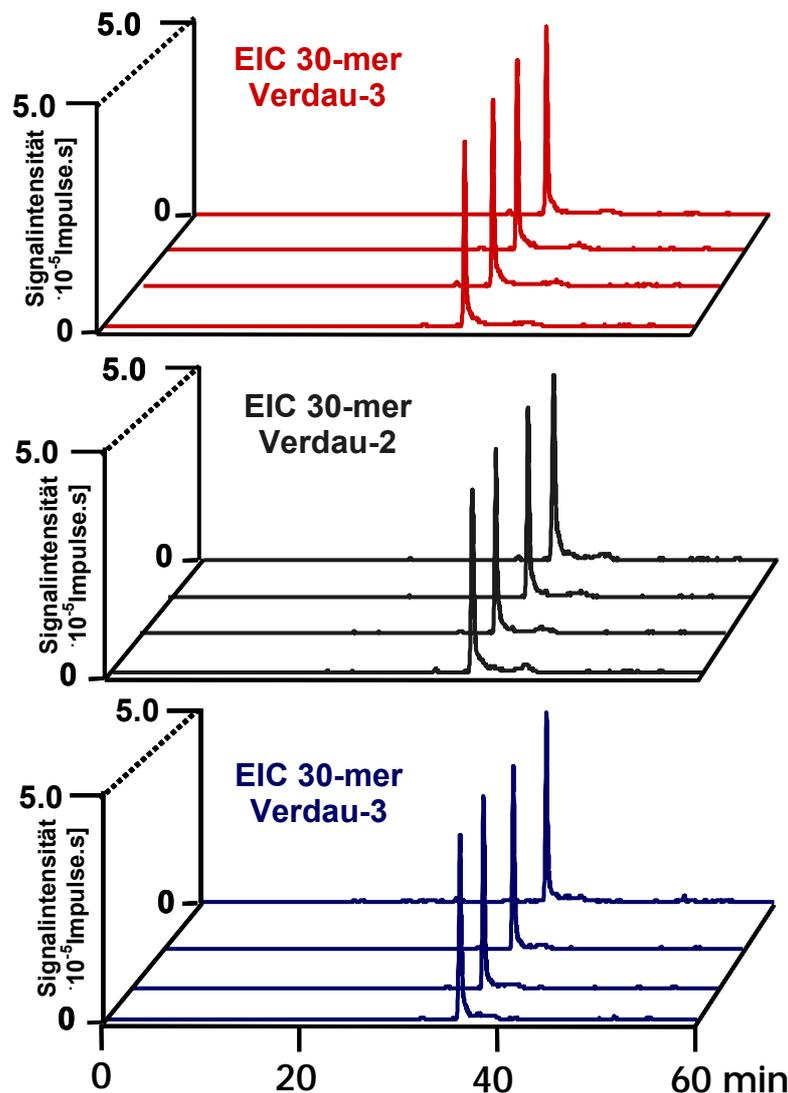


Abbildung 33. Extrahierte Ionenchromatogramme (EIC) der 30-mer toxischen Peptide der IP-RP-HPLC-MS Analysen der drei parallelen peptischen Verdau von Gliadinextrakten bei der Optimierung der Reproduzierbarkeit.

Auch hier wurden die Peaks vor dem Integrieren mit Hilfe einer Gaußfunktion (Glättungsfaktor 5) geglättet. In Tabelle 20 sind die Mittelwerte der integrierten Peakflächen des 30-mer toxischen Peptides, Standardabweichungen und RSD [%] bei dieser Reproduzierbarkeitsstudie zusammengefasst.

Tabelle 20: Mittelwerte der integrierten Peakflächen der drei parallelen Verdaue nach 3 h Verdauzeit, Standardabweichungen, RSD des 30-mer toxischen Peptides (1165.4 m/z / +3).

Bei einzelnen 3 Std. Verdau: Mittelwerte der Peakflächen [Impulse's], Standardabweichung, RSD des 30-mer toxischen Peptides.			
Injektion Nr.	3.0 Std. Verdau- 1	3.0 Std. Verdau - 2	3.0 Std. Verdau – 3
1.	10523313	11016803	9761936
2.	10140718	11122234	9407118
3.	9995127	10807281	9708633
4.	9804130	10375991	10777573
Mittelwert [N=4]	10115822	10830577	9913815
Stabw.	304624	330119	596654
RSD [%]	3.0	3.0	6.0

Daraus ergeben sich drei Mittelwerte der parallelen Verdaue. Innerhalb der Messwerte eines Verdaus variieren die relativen Standardabweichungen [RSD%] zwischen 3% und 6%. In Tabelle 21 ist der Mittelwert der integrierten Peakflächen aller 3 Std. Verdaue der drei parallelen Verdaue, Standardabweichungen und RSD des 30-mer toxischen Peptides (1165.4 m/z / +3) zusammengefasst. Die Reproduzierbarkeit aller drei Verdaue lag bei 5.5 %.

Tabelle 21: Mittelwerte der integrierten Peakflächen [Impulse·s] aller 3 h-Verdaue der drei parallelen Verdaue, Standardabweichungen, RSD des 30-mer toxischen Peptides (1165.4 m/z / +3).

	Für alle drei parallele 3 Std. Verdaue
Mittelwert [N=12]	10286738
Stabw.	566447
RSD [%]	5.5

Durch diese Studie konnte man die Reproduzierbarkeit der 30-mer toxischen Peptide über ihre Peakflächen bei parallel durchgeführten Verdauen nachweisen. Dadurch wurde auch gezeigt, dass Pepsin die Proteine innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls gleich verdauen konnte. Entsprechend dieser reproduzierbaren Ergebnisse konnte dann mit der Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide angefangen werden.

3.1.9 Auswahl und Analyse des isotopenmarkierten Standards

Die Kalibrierung für die absolute Quantifizierung wurde mittels eines isotopenmarkierten internen Standards durchgeführt (IS). Die Anwendung eines internen Standards ist für die absolute Quantifizierung der Peptide in den komplexen Mischungen vorgeschrieben, um unter Anderem die Signalveränderung wegen der Ionensuppression während der Elektrospray-Ionisation herabzusetzen. Als interner Standard wurde ein Peptid verwendet, welches die dieselbe Sequenz des 30-mer toxischen Peptides hatte. Der IS wurde durch Einbau von sechs schweren Atomen in das N-terminale Valin isotopenmarkiert und anschließend gereinigt.



Abbildung 34. Darstellung des isotopenmarkierten 30-mer internen Standards.

Die Qualitätskontrolle des internen Standardpeptids durch IP-RP-HPLC-MS ist in Abbildung 35 gezeigt. Zur Qualitätskontrolle wurden 20 ng des IS in das IP-RP-HPLC-MS-System injiziert. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0-30% Acetonitril in 0.05% TFA in 15 min durchgeführt. Der IS wurde mit der gleichen Detektionsmethode wie das unmarkierte 30-mer toxische Peptid analysiert. Die Detektion wurde in einem Massenbereich zwischen 600-1500 m/z mit dem Scan-Modus Standard-Enhanced (SE) durchgeführt, wobei der SE-Modus langsamer als der Scan-Modus Ultra-Scan (US) ist. Der SE-Modus erlaubte eine bessere Auflösung der Isotopenpeaks von mehrfach geladenen Ionen. Abbildung 35 (b) zeigt das Massenspektrum des IS. Wegen der relativ hohen molekularen Masse des 30-mer Peptids konnte der IS mit einem Ladungszustand bis zu 5+ durch ESI-MS detektiert werden. Zusätzlich sieht man in Abbildung 35 (a) auch, dass die Reinheit des Standards ausreichend ist.

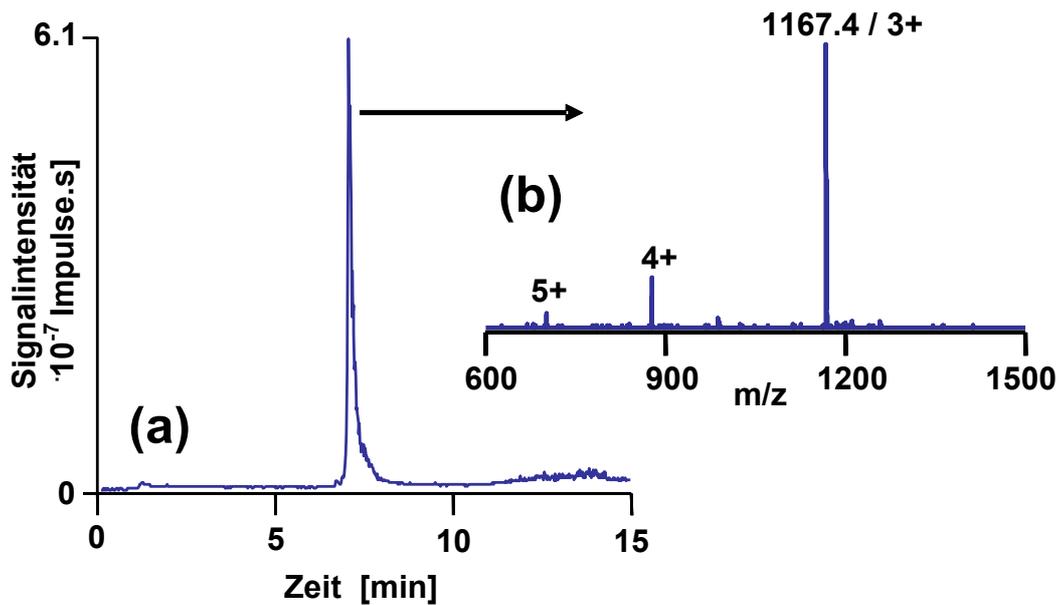


Abbildung 35. IP-RP-HPLC-MS Analyse des isotopenmarkierten internen Standards. **(a)** Totalionenchromatogram (TIC), **(b)** Massenspektrum mit den Ladungszuständen.

Analytische Säule, PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Gradient, 0 - 50% B in 15 min; Fluss, 2 $\mu\text{L}/\text{min}$; Temperatur, 50 $^{\circ}\text{C}$; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Injektionsvolumen, 1 μL (vollloop); Detektion, MS; Scan Modus, Standard Enhanced Modus; Massenbereich, 600-1500 m/z; Injizierte Menge: 20 ng IS.

3.1.10 Bestimmung der unteren Nachweisgrenze des 30-mer IS

Nachdem der IS mit dem SE-Modus nachgewiesen werden konnte, wurde die untere Nachweisgrenze des 30-mer IS bestimmt, um die Kalibriergeraden zu erstellen. Durch Injektionen der IS-Peptidlösungen in abnehmenden Konzentrationen bis zu 0.25 ng/μL wurde die untere Nachweisgrenze für das IS-Peptid bestimmt. Bei der Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurde auf das S/N-Verhältnis geachtet. Ein S/N-Verhältnis von 14:1 wurde im extrahierten Ionenchromatogramm bei einer Konzentration von 0.25 ng/μL beobachtet (siehe Abbildung 8). Diese Analyse wurde mit einem linearen Gradienten von 0-30% Acetonitril in 60 Minuten durchgeführt. Die Detektion wurde in einem Massenbereich zwischen 600-1500 m/z und dem Scan-Modus SE durchgeführt.

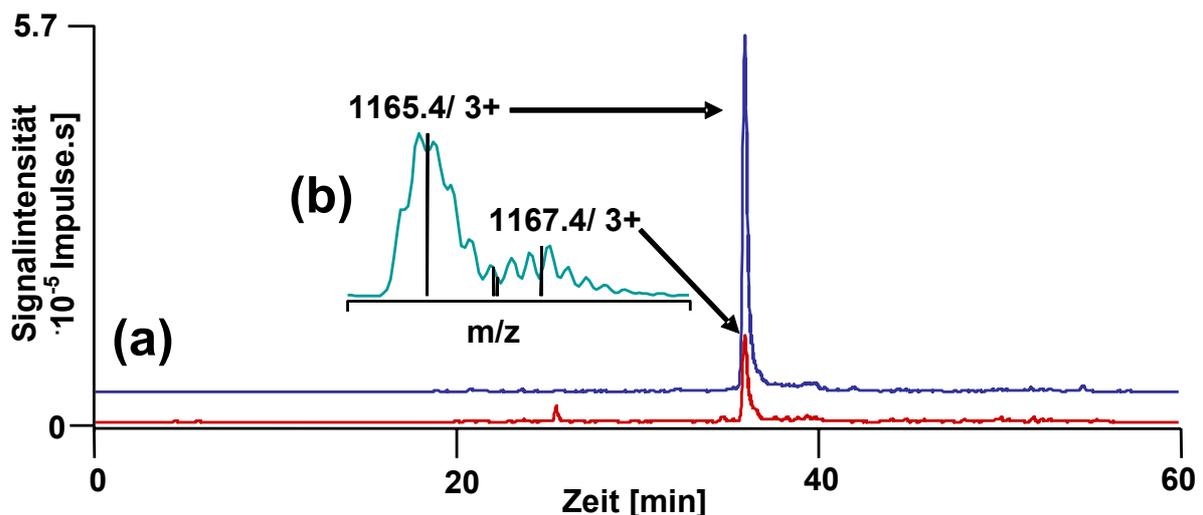


Abbildung 36. IP-RP-HPLC-MS-Analyse des 30-mer toxischen Peptides (a) mit markierten 30-mer IS (b). Große Abbildung: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) des 30-mer toxischen Peptides. Kleine Abbildung: Massenspektrum und Ladungszustände des 30-mer toxischen Peptides (1165.4 / 3+) und des markierten 30-mer IS (1167.4 / 3+). PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Gradient, 0 - 30% B in 60 min; Fluss, 2 μL/min; Temperatur, 50 °C; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Injektionsvolumen, 1 μL (vollloop); Scan Modus, Standard-Enhanced Modus; Massenbereich, 600-1500 m/z; Injizierte IS Menge: 0.25 ng im gesamten Injektionsvolumen.

3.2 Absolute Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides in einem Gliadinextrakt mittels IP-RP-HPLC-MS

3.2.1 Vorbereitung der peptischen Verdau zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide

Für diese Quantifizierungsstudie wurden vier parallele Verdau durchgeführt. Zum Verdau wurden in vier separaten 1.5 mL Vials jeweils 1.004 mg, 1.001 mg, 1.004 mg und 1.002 mg Proteinextrakte eingewogen. Dann wurde in 500 µL 0.2% (w/w) iger RapiGestTM-SF Lösung gelöst und bei 90°C im Thermomixer für 5 min bei 600 rpm denaturiert. Danach wurden die Schwefelbrücken durch Zugabe von 8.5 µL 300 mM DTT bei 60 °C für 1 Std. bei 900 rpm reduziert. Nach diesem Schritt wurden alle Proben auf Raumtemperatur (RT) temperiert und für 30 min mit 10 µL 2M Iodessigsäure versetzt, um die freien Schwefelgruppen zu carboxymethylieren (s. oben). Diese Reaktion verlief unter Lichtausschluss. Um den Überschuss von 2M Iodessigsäure zu entfernen, wurden die Proben für 30 min bei RT mit 20 µL 1M 2-Mercaptoethanol versetzt (kein Lichtausschluss). Zum peptischen Verdau wurden 0.975 mg Pepsin (vom Schweinemagen) in 1 mL dest. Wasser gelöst. Vor den Verdauen wurden alle vier Proteinlösungen, die Pepsinlösung und zusätzlich der zur Einstellung des pH-Wertes verwendete 1M-Guanidin-HCl Puffer (pH=1.3) durch Erwärmen für 15 min bei 37°C bei 900 rpm aktiviert bzw. zum Verdau vorbereitet. Nach der Aktivierung wurde durch Zugabe von 51.3 µL (50.05 µg-Pepsin) Pepsinlösung in den vier Proteinlösungen ein Enzym/Protein-Verhältnis von 1/20 (w/w) erreicht. Dann wurden alle Proteinlösungen mit jeweils 350 µL 1M-Guanidin-HCl Puffer, pH= 1.3 angesäuert. Die vier parallelen Verdau wurden bei 37°C für 3 h bei 900 rpm durchgeführt. Anschließend wurden alle Verdaureaktionen irreversibel durch Zugabe von 100 µL 1M NaOH gestoppt. (ca. pH= 7-8). Nach dem Stoppen aller Reaktionen der vier Verdau wurden folgende Endkonzentrationen (siehe Tabelle 22) erhalten.

Tabelle 22: Die Endkonzentrationen der vier hergestellten Verdaue (Stammlösungen) zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide.

	Verdau-1	Verdau-2	Verdau-3	Verdau-4
Eingewogene Menge an Proteinpulverextrakt	1.004 mg	1.001 mg	1.004 mg	1.002 mg
Endvolumen, in dem die Proteine gelöst sind (nach dem Stoppen)	1039.8 µL	1039.8 µL	1039.8 µL	1039.8 µL
Endkonzentration der hergestellten Stammlösung	0.966 µg/µL	0.963 µg/µL	0.966 µg/µL	0.964 µg/µL

Die 30-mer toxischen Peptide wurden mit Hilfe eines isotopenmarkierten 30-mer IS durchgeführt. Die Herstellung der Proben zur Quantifizierung mit dem IS zum Erstellen der Kalibrierkurven ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Die Herstellungen der Proben zur Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides mit dem IS zum Erstellen der Kalibrierkurven.

Zugefügte Volumina aus	Herstellung der Proben zur Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides und zum Erstellen der Kalibrierkurven mit dem IS.					
	0.25 ng/µL	0.5 ng/µL	1.0 ng/µL	1.5 ng/µL	2.0 ng/µL	2.5 ng/µL
der 10 ng/µL IS-Lsg.	2.5 µL	5.0 µL	10 µL	15 µL	20 µL	25 µL
der Stamm.-Lsg.	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Endvolumina	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Endkonz. des inj. IS	0.25 ng/µL	0.5 ng/µL	1.0 ng/µL	1.5 ng/µL	2.0 ng/µL	2.5 ng/µL

Danach wurden in einem IP-RP-HPLC-MS-System mit einem Injektionsvolumen von 1µL injiziert und analysiert. Die Analyse wurde mit einem linearen Gradienten von 0-30%B in 60 min durchgeführt. Wegen der Ionenunterdrückung in der ESI-Quelle (Ionensuppression) konnten solche lange und flache Gradienten bei der Analyse hochkomplexer Protein- oder Peptidmischungen wie diese verdaute Gliadinextraktmischung notwendig werden. Ionensuppression ist ein Ionisierungsproblem, das in der Ionenquelle des Massenspektrometers bei der Ionenbildung vorkommt. Wenn zu einer bestimmten Zeit an der Ionenquelle zu viele Peptide ankommen, wird nur ein Teil davon ionisiert. D. h. vor allem niedrig abundante Peptide werden nicht ionisiert und können so auch nicht detektiert werden. Durch eine leistungsfähige und trennscharfe

HPLC-Methode des Peptidgemischs kann eine Überschreitung der Kapazität der Ionenquelle vermieden und so die Ionensuppression verringert werden.

3.3 Auswertung

Alle MS-Daten wurden sowohl manuell als auch automatisch ausgewertet. Die Durchführung dieser Auswertungen wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.3.1 Manuelle Auswertung

Unter der manuellen Auswertung versteht man die Integration der extrahierten Peaks durch den Benutzer mit Hilfe der Software Data-Analysis von Bruker. Diese Software erlaubte die Extraktion der Peaks der entsprechenden Proteine und Peptide.

Alle Peakflächen sowohl des 30-mer toxischen Peptides (m/z 1165.4/ +3) als auch des IS-Peptides (m/z 1167.4/ +3) wurden aus dem TIC mit Isolationsbreiten von ± 0.5 m/z extrahiert. Sämtliche Daten wurden mit Hilfe der Software Data-Analysis von Bruker ausgewertet. Die chromatographischen Peaks wurden dabei in eine Gauß-Funktion umgewandelt. Das Erstellen aller Gauß-Funktionen wurde durch einen Glättungsfaktor von 5 durchgeführt. Dadurch wurden Gaußförmige Peaks erzeugt und diese anschließend manuell integriert.

3.3.2 Automatische Auswertung

Die automatische Auswertung zur absoluten Quantifizierung wurde vom Arbeitskreis der Bioinformatik von *Prof. K. Reinert (Freie Universität Berlin)* berechnet. Die automatische Auswertung der Daten zur absoluten Quantifizierung wurde nach folgenden zwei Schritten durchgeführt:

- i. Extraktion der 30-mer toxischen Peptide und markierten 30-mer Peptide (IS) aus den rekonstruierten Totalionenstromchromatogrammen**
- ii. Erstellen und Bewertung der Regressionsgeraden**

3.3.2.1 Extraktion der 30-mer toxischen Peptide und markierten 30-mer Peptide (IS) aus den Totalionenchromatogrammen bei der automatischen Auswertung

Zur automatischen Quantifizierung des toxischen 30-mers wurde eine angepasste Fassung der auf OpenMS basierenden FeatureFinder-Applikation eingesetzt. Der zugrunde liegende FeatureFinderGliadin-Algorithmus extrahiert dabei aus dem gesamten Datenraum, der aus den Retentionszeiten eines Chromatogramms, den zugehörigen MS-Spektren und der entsprechenden Signalintensität aufgespannt wird, die quantitative Information des toxischen 30-mers sowie des isotopenmarkierten Standards in vier Phasen: **Seeding**, **Extension**, **Modeling** und **Adjusting**. Generelles Ziel des Quantifizierungsprogramms ist es, aus dem genannten multidimensionalen Datensatz genau das Volumenelement herauszufiltern und zu berechnen, das aus der Retentionszeit eines bestimmten chromatographischen Peaks, dessen MS-Spektren einschließlich Isotopenverteilung und der damit verbundenen Signalhöhe besteht. Die Analytsubstanz, hier das 30-mer bzw. der isotopenmarkierte interne Standard, wird dabei durch die Retentionszeit und das damit verbundene MS-Spektrum (molekulare Masse, Ladungszustand und Isotopenverteilung) hinreichend identifiziert. Die einzelnen Schritte des Algorithmus sollen nun im Folgenden kurz umrissen werden.

I. Seeding

Am Beginn der Auswertung steht zunächst die eigentliche Identifizierung der gesuchten Substanz im dreidimensionalen Datenraum, die über das Massenspektrum erfolgt. Da die gemessenen MS-Spektren gewissen inhärenten Schwankungen unterliegen, ist es für eine Quantifizierung zunächst notwendig, die Spektren zu normieren. Anschließend soll das typische Isotopenmuster der gesuchten Substanz innerhalb des Spektrums identifiziert werden. Dies geschieht über eine Wellentransformation, die sog. *Continuous Wavelet Transformation (CWT)*. Diese mathematische Operation erlaubt zudem eine Unterdrückung der Basislinie sowie deren Rauschens, so dass in den transformierten Spektren die Isotopenintensitätsverteilung klar zutage tritt. Das CW-transformierte Massenspektrum wird auf Maxima hin untersucht und deren Lage mit dem theoretischen Spektrum des

Analyten verglichen. Jedes Maximum der CWT, das nahe genug an den mittleren Massen des theoretischen Massenspektrums liegt, wird als Ausgangspunkt für die weitere Spektrenauswertung (sog. *seed*) verwendet.

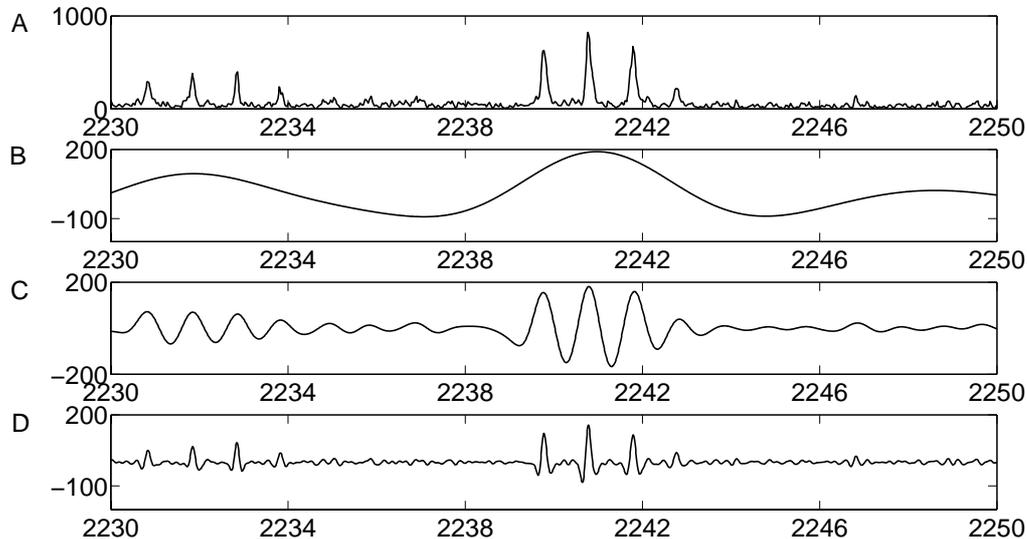


Abbildung 37. Schematische Erklärung der Continuous Wavelet Transformation (CWT).

In den graphischen Darstellungen von A, B, C und D stellt die X-Achse den Massebereich zwischen 2230 Da und 2250 Da dar. Die Y-Achse zeigt die Intensität. A: Teil eines Massenspektrums. Die Darstellungen B, C und D zeigen die Ergebnis der CTW des Spektrums mit einer Marr Wellentransformation, umgewandelt mit unterschiedlichen Ausdehnungswerten [a] (B: $a = 3$, C: $a = 0.3$, D: $a = 0.06$).

II. Extension

Innerhalb der *Extension*-Phase werden nun Anfang- und Endpunkt der gemessenen Isotopenpeaks für das toxische 30-mer und den internen Standard bestimmt, indem schrittweise von jedem *seed*-Datenpunkt ausgehend die gemessenen Daten mit der theoretischen Isotopenverteilung verglichen werden. Alle Datenpunkte, die oberhalb einer bestimmten Entscheidungsgrenze liegen, werden zur weiteren Berechnung hinzugezogen. Am Ende der *Extension*-Phase ist somit das Massenspektrum der gesuchten Substanz eingegrenzt und identifiziert.

III. Modeling und Adjusting

Während die MS-Spektreninformation zunächst einer qualitativen Aussage dient, ist für die quantitative Bestimmung die Berechnung der Peakfläche im Chromatogramm erforderlich; Zudem liefert die Retentionszeit der Chromatographie noch ein weiteres identifizierendes Merkmal, da die HPLC häufig isomere Verbindungen, die ein identisches Massenspektrum liefern, zeitlich voneinander zu trennen vermag. Im Modeling- bzw. Adjusting-Schritt wird dabei zunächst der gemessene chromatographische Peak, der mit den MS-Spektren der *Extension*-Phase verbunden ist, durch eine Gaußkurve beschrieben, was durch die Theorie der Chromatographie gerechtfertigt ist. Peakanfang bzw. -ende werden iterativ durch Ausschluss aller Werte bestimmt, die nicht innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der Gaußkurve liegen. In Abbildung 38 ist das Prinzip von Seeding und Extension schematisch dargestellt.

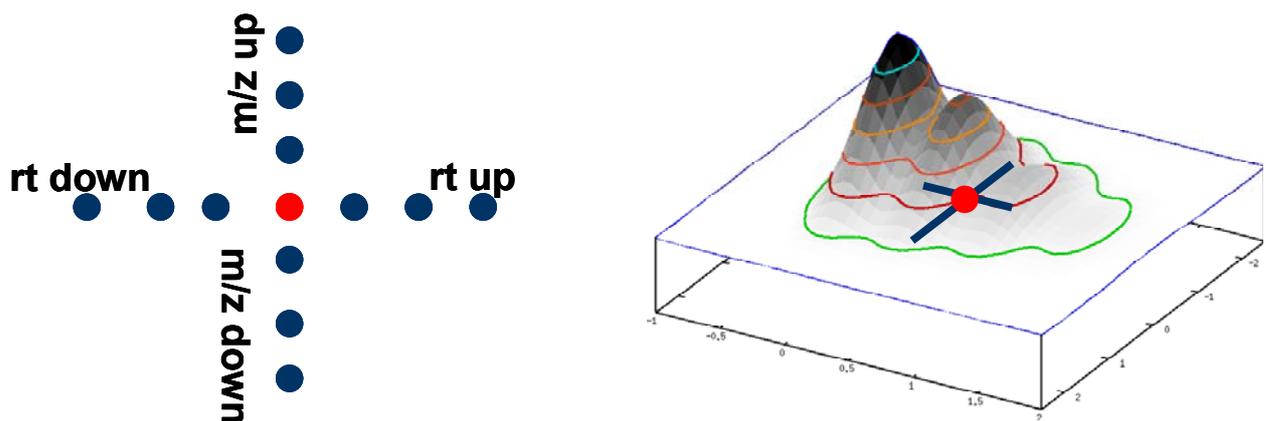


Abbildung 38. Schematische Darstellung des Prinzips von Seeding und Extensions-Algorithmen. (Roter Punkt: Seed; Blaue Punkte: Extension)

Mit Hilfe der so gewonnenen Parameter kann nun aus einem HPLC-MS-Chromatogramm automatisch das Volumen des Raumelementes berechnet werden, das von dem HPLC-Peakprofil, dem MS-Spektrenprofil und der Signalintensität gebildet wird. Durch Erstellen einer Kalibrierung, bei der die eingesetzte Kalibrierkonzentration mit dem automatisch berechneten Volumenelement korreliert wird, kann so eine automatisierte Qualifizierung und Quantifizierung des 30-mers bzw. des isotopenmarkierten Standards durchgeführt werden.

3.3.3 Quantifizierungsergebnisse nach der manuellen Auswertung

Wie in **Kapitel 3.6.2.1.** beschrieben wird, wurden alle Peaks des 30-mer toxischen Peptides (1165.4/ +3 m/z) und IS-Peptides (1167.4/ +3 m/z) mit Hilfe der Software Data-Analysis von Bruker aus dem TIC extrahiert. Beide Peptide wurden aus dem TIC mit Isolationsbreiten von ± 0.5 m/z extrahiert. Danach wurden alle Peakflächen dieser Peptide in einer Gaus-Funktion umgewandelt. Das Erstellen aller Gauß-Funktionen wurde durch einen Glättungsfaktor von 5 durchgeführt. Anschließend wurden Gaußförmige Peaks erzeugt und integriert.

In Tabelle 24 sind alle integrierten Peakflächen [Impulse·s] der IS-Peptide in sechs verschiedenen Konzentrationsreihen bei den vier parallelen Verdauen aufgelistet. Zur Erstellung der Regressionsgeraden wurde eine Konzentrationsreihe von 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ng/μL verwendet. Mit Hilfe der in Tabelle 24 aufgelisteten Peakflächen wurden für jeden der vier Verdauere Regressionsgeraden erstellt, die in den Abbildungen 39-42 gezeigt werden. Alle Regressionsgeraden wurden mit einem Vertrauensbereich von 99% (zweiseitig) erstellt, wobei der Vertrauensbereich die Unsicherheit einer Regressionsgerade beschreibt. Die Vertrauensbereiche der Regressionsgeraden (VB_{reg}) wurden mit Hilfe der Gleichung-5 festgestellt bzw. berechnet. (Analyse einer Probe mit dem Gehalt \hat{X}).

$$VB_{reg} = s_{reg} \cdot t = s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(\hat{x} - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \cdot t(f = N - 2, P\%) \quad \text{Gleichung-5}$$

Diese Gleichung entspricht dem Vertrauensbereich der Regressionsgeraden an der Stelle \hat{X} in y-Richtung.

Die Reststandardabweichung S_y ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um die Ausgleichsgerade, d.h. sie beschreibt die Präzision (die Güte) der **Ausgleichsfunktion** und damit der gemessenen **Messwerte**. Mit **N** wird die Anzahl der Kalibrierpunkte definiert, wobei die Werte aus der t-Tabelle für **N-2 Freiheitsgrade** zu wählen sind. \bar{X} ist der Mittelwert aller Standardkonzentrationen (IS). \hat{X} ist mittels der Regressionsfunktion aus dem Messwert berechneter Gehaltswert, wobei der **Summenterm** $\sum (X_i - \bar{X})^2$ ein Maß für den Arbeitsbereich ist. Je größer er ist, desto besser ist die Steigung **b** definiert.

Tabelle 24: Peakflächen [Impulse's] des 30-mer Int.Std (IS) **nach manueller Integration** in den vier hergestellten Verdauen zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptides.

Peakflächen [Impulse's] des 30 mer Int.Std. in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4				
Int. Std. Konzentration ng/μL	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=30]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
0.25	3594503	3456728	4122807	-
0.25	3217060	4111879	4041863	-
0.25	3282551	3903162	3850565	-
0.25	3475973	3430098	3985419	4728631
0.25	3471754	3364879	3769440	4511072
0.5	7521640	7502808	8297377	8997000
0.5	7630906	7270410	8060467	8754504
0.5	7546464	7181169	8653171	8874609
0.5	7622511	7656783	8783421	8603145
0.5	7485205	-	8265093	8989172
1.0	14121754	14329693	13961125	16098547
1.0	14424701	14171952	13544074	15804672
1.0	14776251	13528536	14064268	15655750
1.0	14093869	13287264	14396083	15953768
1.0	14091730	-	14890360	15998232
1.0	-	-	15852601	-
1.0	-	-	14260717	-
1.0	-	-	14862211	-
1.0	-	-	15717179	-
1.5	19892234	22082852	22924335	22566524
1.5	20026461	21176530	23298788	23914827
1.5	19377217	20940067	23239082	22252323
1.5	18646774	22313189	22945363	21626815
1.5	-	-	23887985	-
2.0	27147705	29047827	28182117	37483964
2.0	26606219	28474971	28699380	32114350
2.0	26545999	28248396	28995516	34751953
2.0	26333992	28637275	28028566	32267531
2.0	26625615	27642089	27516781	33283625
2.0	-	-	30147534	-
2.0	-	-	29955562	-
2.5	31079357	43676450	35261369	39345721
2.5	31884633	40308018	33877018	38687855
2.5	31564862	40825068	34024039	37725501
2.5	30671488	42058778	34134550	37396599
2.5	31280415	33044412	34961163	36320896
2.5	-	33730456	-	38460126
2.5	-	33395451	-	-
2.5	-	33726001	-	-

Tabelle 25: Für alle Verdaue (Verdau-1,2,3,4): Mittelwert der Peakflächen [Impulse·s], Standardabweichung, RSD [%] des 30-mer-IS. (nach manueller Integration)

Für alle Verdaue, (Verdaue-1,2,3,4): Peakflächen [Impulse·s], Standardabweichung, RSD [%] des 30-mer IS in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4						
	0.25 ng/µL [N=17]	0.5 ng/µL [N=19]	1.0 ng/µL [N=23]	1.5 ng/µL [N=17]	2.0 ng/µL [N=22]	2.5 ng/µL [N=24]
Mittelwert [Impulse·s]	3783434	8089256	14690667	21830080	29397135	35726676
Stabw. [Impulse·s]	431446	635431	886253	1592983	2904824	3706807
RSD [%] der Peakflächen	11.4	7.9	6.0	7.3	9.9	10.4

Mit den ermittelten Peakflächen für das 30-mer IS, die in Tabelle 24 aufgelistet sind, wurden nun Kalibriergeraden erstellt. Darin sind neben den Gleichungen für die Regressionsgeraden auch die Bestimmtheitsmaße angegeben, die mit Werten zwischen $R^2 = 0.9946$ (Verdau-1) und $R^2 = 0.9808$ (Verdau-4) eine sehr gute lineare Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration zeigen. Die Reproduzierbarkeit über alle vier Verdaue gemittelt (s. Tabelle 25) zeigt mit RSD-Werten zwischen 6.0 und 11.4% eine gute Robustheit der Methode an, wobei der hohe RSD-Wert bei 0.25 ng/µL auf einen größeren Fehler bei der Peakflächenbestimmung aufgrund der kleinen Peakfläche zurückzuführen ist (vgl. auch Abbildung 36, S/N für IS beträgt 14.6). Aus statistischer Betrachtung sollte die Bestimmungsgrenze bei einer Quantifizierung ein S/N-Verhältnis von mindestens 10 aufweisen. Tabelle 26 fasst die zwischen 4.4 und 9.4% liegenden RSD-Werte zusammen. Die gemittelten Peakflächen der 30-mer toxischen Peptids weisen eine ebenfalls gute Reproduzierbarkeit auf.

Tabelle 26: Für alle einzelnen Verdaue, (Verdau-1,2,3,4): Mittelwert der Peakflächen [Impulse·s], Standardabweichung, RSD [%] des 30-mer toxischen Peptides

Für alle einzelnen Verdaue: Peakflächen [Impulse·s], Standardabweichung, RSD des 30-mer toxischen Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4				
	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=30]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
Mittelwert [Impulse·s]	11462397	11479665	13073390	12967235
Stabw. [Impulse·s]	1037681	1080296	571441	639210
RSD [%] der Peakflächen	9.1	9.4	4.4	4.9

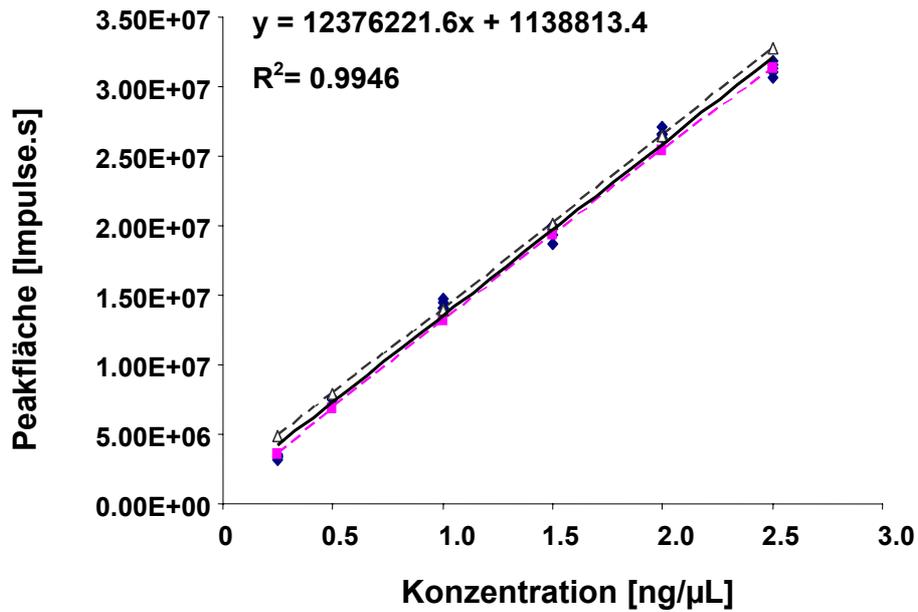


Abbildung 39. Regressionsgerade von **Verdau-1** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=29, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *manuell* integriert.

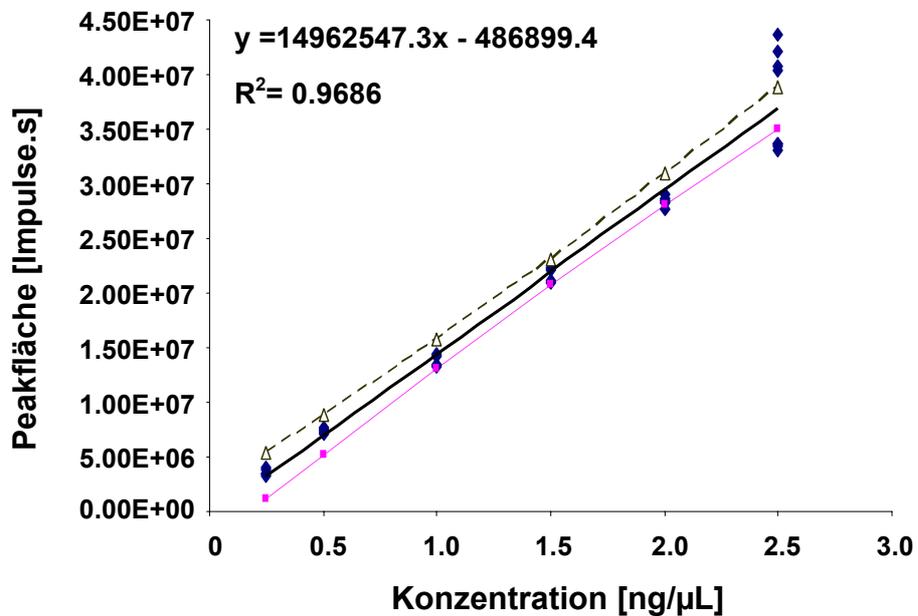


Abbildung 40. Regressionsgerade von **Verdau-2** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=30, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *manuell* integriert.

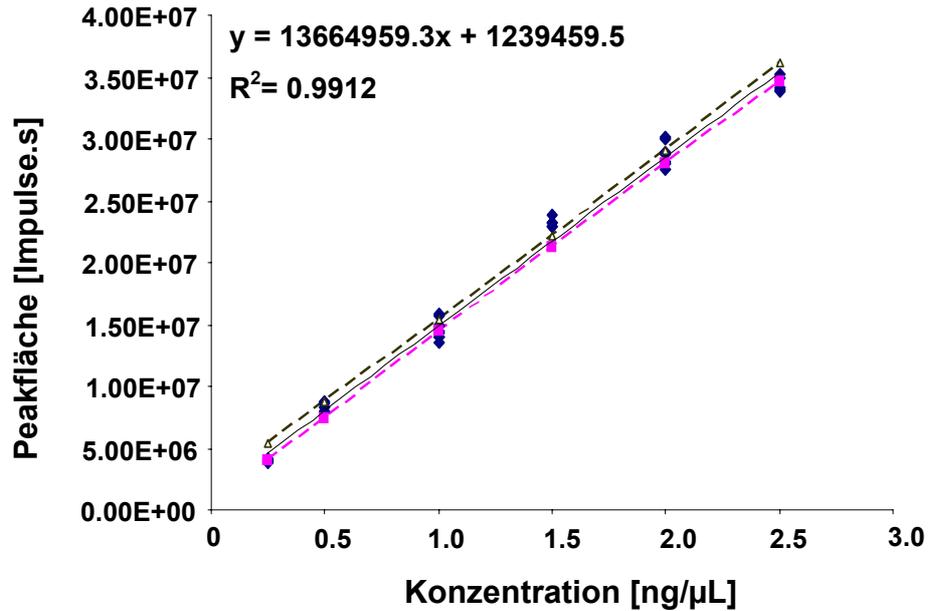


Abbildung 41. Regressionsgerade von **Verdau-3** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=36, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *manuell* integriert.

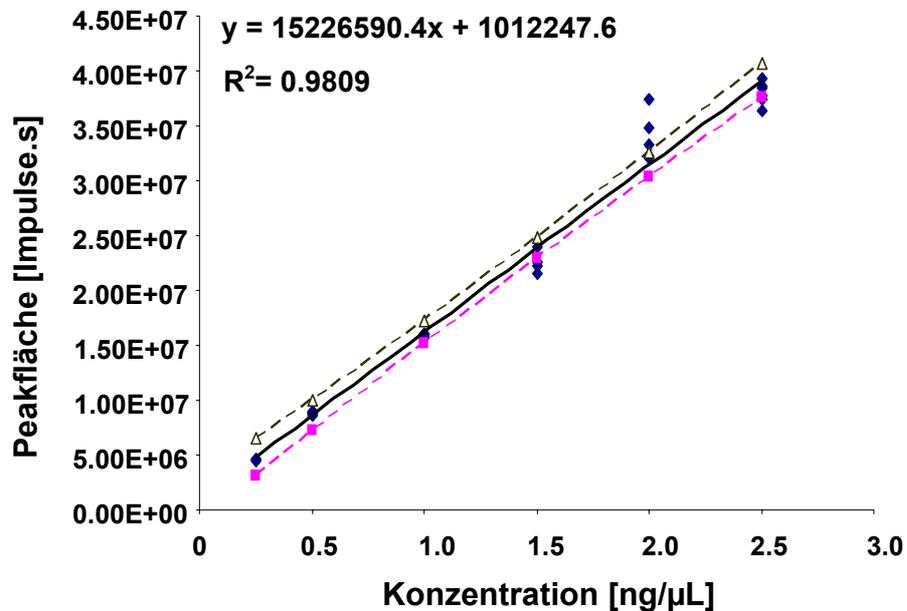


Abbildung 42. Regressionsgerade von **Verdau-4** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=27, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *manuell* integriert.

Tabelle 27: Peakflächen [Impulse·s] der 30-mer toxischen Peptide **nach manueller Integration** in den vier hergestellten Verdauen.

Int. Std. Konzentration ng/µL	Peakflächen des 30 mer Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4 [Impulse·s]			
	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=30]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
0.25	12599170	13049010	13320910	-
0.25	12584975	13197565	13511295	-
0.25	13000819	11799781	13787065	-
0.25	12924448	11458380	13966498	13989977
0.25	12917946	12562572	13902167	14023782
0.5	12036956	11706949	13975508	13352433
0.5	12017357	12320098	13771671	13460588
0.5	12143995	12579057	13576896	12527123
0.5	12240719	13150177	12934063	13058605
0.5	12289399	-	13048366	13282444
1.0	12103681	12016256	13334224	14094549
1.0	11831051	12852981	12761899	12039711
1.0	12196162	11544176	13098983	12788788
1.0	11856530	11618989	13109336	12249674
1.0	12021599	-	13731343	13169048
1.0	-	-	13826592	-
1.0	-	-	12785770	-
1.0	-	-	13281215	-
1.0	-	-	13884192	-
1.5	10991755	12559811	13296711	12604709
1.5	11571633	11426001	12836368	13672129
1.5	11101299	11720819	12920121	13096280
1.5	11127232	11755092	12359758	13113849
1.5	-	-	13230736	-
2.0	9676006	11186443	12935252	12479158
2.0	10563103	11187278	12812945	12195138
2.0	9328084	11462551	12560306	12867940
2.0	11152621	11303225	12575512	12157764
2.0	10119025	11148155	12275544	12023663
2.0	-	-	12563076	-
2.0	-	-	12814536	-
2.5	10272452	10293757	12657644	13280536
2.5	10988665	9056055	12573643	11862111
2.5	10437600	10261067	11641425	13452571
2.5	10135005	10687613	12117533	13407911
2.5	10180237	9221066	12862937	12585016
2.5	-	10550376	-	13279858
2.5	-	9762939	-	-
2.5	-	10951698	-	-

Tabelle 28: Konzentrationen des 30-mer toxischen Peptides in den vier hergestellten Verdauen (nach manueller Integration).

Int. Std. Konzentration ng/μL	Konzentrationen des 30 mer Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4 [ng/μL]			
	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=30]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
0.25	0.926	0.905	0.884	-
0.25	0.925	0.915	0.898	-
0.25	0.958	0.821	0.918	-
0.25	0.952	0.798	0.931	0.852
0.25	0.952	0.872	0.927	0.855
0.5	0.881	0.815	0.932	0.810
0.5	0.879	0.856	0.917	0.818
0.5	0.889	0.873	0.903	0.756
0.5	0.897	0.911	0.856	0.791
0.5	0.901	-	0.864	0.806
1.0	0.886	0.836	0.885	0.859
1.0	0.864	0.892	0.843	0.724
1.0	0.893	0.804	0.868	0.773
1.0	0.866	0.809	0.869	0.738
1.0	0.879	-	0.914	0.798
1.0	-	-	0.921	-
1.0	-	-	0.845	-
1.0	-	-	0.881	-
1.0	-	-	0.925	-
1.5	0.796	0.872	0.882	0.761
1.5	0.843	0.796	0.849	0.831
1.5	0.805	0.816	0.855	0.794
1.5	0.807	0.818	0.814	0.795
1.5	-	-	0.878	-
2.0	0.690	0.780	0.856	0.753
2.0	0.761	0.780	0.847	0.734
2.0	0.662	0.799	0.828	0.779
2.0	0.809	0.788	0.830	0.732
2.0	0.726	0.778	0.808	0.723
2.0	-	-	0.829	-
2.0	-	-	0.847	-
2.5	0.738	0.721	0.836	0.806
2.5	0.796	0.638	0.829	0.713
2.5	0.751	0.718	0.761	0.817
2.5	0.727	0.747	0.796	0.814
2.5	0.731	0.649	0.851	0.760
2.5	-	0.738	-	0.806
2.5	-	0.685	-	-
2.5	-	0.764	-	-

Tabelle 29: Über die entsprechenden Regresionsgleichungen berechnete Endkonzentrationen (Mittelwerte der Wiederholungsmessungen), Standardabweichungen (Stabw.), RSD [%]-Werte der zu analysierenden 30-mer toxischen Peptide bei den zugehörigen Konzentrationen von 30-mer IS in den vier hergestellten Verdauen.

Mittelwert, Standardabweichung und RSD [%] der Konzentrationen des 30-mer toxischen Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4				
Int. Std. Konzentration ng/μL	Verdau-1 [ng/μL] [N=29]	Verdau-2 [ng/μL] [N=30]	Verdau-3 [ng/μL] [N=36]	Verdau-4 [ng/μL] [N=27]
Mittelwert	0.834	0.800	0.866	0.785
Stabw.	0.084	0.072	0.042	0.043
RSD [%] der Konzentrationen	10.1	9.0	4.8	5.4

Setzt man die in Tabelle 27 dargestellten Peakflächen des zu quantifizierenden 30-mer toxischen Peptides in die entsprechenden Funktionsgleichungen der Regressionsgeraden in den Abbildungen 39-42 ein, dann ergeben sich die folgenden Konzentrationen in ng/μL des 30-mer toxischen Peptides wie in der Tabelle 28. Wie aus Tabelle 29 ersichtlich ist, weisen die Endergebnisse ebenso gute Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen innerhalb einer Messreihe mit RSD-Werten zwischen 5.4 bis 10.1 % auf. Die Vertrauensbereiche (VB_{Prog}) der Endergebnisse in X-Richtung wurden mit der Gleichung-6 ermittelt.

Gleichung-6

$$VB_{\text{Prog}} = s_{\hat{x}} \cdot t = \frac{s_y}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{(\hat{x} - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \cdot t(f = N - 2, P\%)$$

S_y: Reststandardabweichung; **b**: Steigung der Regressionsgerade; **m**: Anzahl der Wiederholungsmessungen der Probe; **N**: Anzahl der Kalibrierpunkte der Regressionsgerade; **\hat{X}** : Gehalt der Probe; **\bar{X}** : Mittelwert aller Std.-Konzentrationen der Regressionsgerade; **X_i**: Kalibrierkonzentrationen.

Tabelle 30 fasst die Endkonzentrationen der 30-mer toxischen Peptides in den einzelnen vier Proben mit ihren Vertrauensbereichen zusammen, die zwischen 7.85 ± 0.69 ng/ μ L und 8.66 ± 0.36 ng/ μ L liegen (Die 1/10 Verdünnungen wurden berücksichtigt).

Tabelle 30: Endkonzentrationen der 30-mer toxischen Peptides in den einzelnen vier Proben (Mit Berücksichtigung der 1/10 Verdünnung wurden die Ergebnisse hochgerechnet.).

Für 30-mer im Verdau -1: 8.34 ± 0.29 ng/ μ L (N= 29, m=29, $s_y = 614162$, f=29-2 (t=2.052), P=95%,zweiseitig).

Für 30-mer im Verdau -2: 8.00 ± 0.91 ng/ μ L (N= 30, m=30, $s_y = 2384707$, f=30-2 (t=2.048), P=95%,zweiseitig).

Für 30-mer im Verdau -3: 8.66 ± 0.36 ng/ μ L (N= 36, m=36, $s_y = 993431$, f=36-2 (t=1.96), P=95%,zweiseitig).

Für 30-mer im Verdau -4: 7.85 ± 0.69 ng/ μ L (N=27, m=27, $s_y = 1727138$, f=27-2 (t=2.06), P=95%,zweiseitig).

3.3.4 Quantifizierungsergebnisse nach automatischer Auswertung

Entsprechend der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Algorithmen wurden alle Rohdaten automatisch ausgewertet. In Tabelle 31 sind die Peakflächen [Impulse·s] des 30-mer IS **nach automatischer Integration** in den vier hergestellten Verdauen zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptides aufgelistet. Mit Hilfe dieser Peakflächen der IS wurden die entsprechenden Regressionsgeraden der vier parallelen Verdau erstellt, die in den Abbildungen 43-46 dargestellt werden. Alle Regressionsgeraden wurden mit einem Vertrauensbereich von 99% (zweiseitig) erstellt (s. Gleichung-5).

Tabelle 31: Peakflächen [Impulse's] der 30-mer Int.Std (IS) **nach automatischer Integration** in den vier hergestellten Verdauen zur Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides.

Int. Std. Konzentration ng/µL	Peakflächen [Impulse's] des 30 mer Int.Std. in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4			
	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=29]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
0.25	4285430	4205840	4900510	-
0.25	4177390	4712520	4745140	-
0.25	4012780	4516240	4851090	-
0.25	3803660	4252890	4488780	5235660
0.25	3779140	4047350	3932020	5071870
0.5	10057800	8919080	10440600	1879580
0.5	9183890	9267230	10588200	10719300
0.5	9163910	9172330	9989140	10968300
0.5	8943460	9719300	10143400	10778500
0.5	8591310	-	9597490	10889200
1.0	15955400	16774400	17237000	21502000
1.0	17673800	17592600	14611200	20912500
1.0	17800800	17150000	17537300	18907600
1.0	17647600	16692600	17031000	20806600
1.0	17238400	-	18033600	21078100
1.0	-	-	18382300	-
1.0	-	-	17612600	-
1.0	-	-	18795300	-
1.0	-	-	18387500	-
1.5	24674300	27315700	31220500	27183400
1.5	23152700	27456300	29229000	29981900
1.5	23030500	27669000	29401400	26998900
1.5	23622700	27884200	29722200	28647200
1.5	-	-	30955000	-
2.0	31299300	37390400	35239400	46264100
2.0	31816800	35539600	35499700	39754800
2.0	32344100	33766100	35737400	43015000
2.0	30094600	35352700	35882300	41752500
2.0	31875900	33850200	34446200	43176300
2.0	-	-	36575100	-
2.0	-	-	38596100	-
2.5	35555200	52814100	45230800	50652600
2.5	36711000	-	44305900	49967800
2.5	36346000	51939900	45064600	46789500
2.5	36001900	50619000	41649700	46702200
2.5	36824200	40444500	44984200	46183600
2.5	-	40368000	-	47462300
2.5	-	40679100	-	-
2.5	-	40096200	-	-

Tabelle 32: Für alle Verdaue (Verdau-1,2,3,4): Mittelwert der Peakflächen [Impulse's], Standardabweichung, RSD [%] des 30-mer-IS. (nach automatischer Integration)

Für alle Verdaue (Verdau-1,2,3,4): Peakflächen [Impulse's], Standardabweichung, RSD [%] des 30-mer IS in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4						
	0.25 ng/µL [N=17]	0.5 ng/µL [N=18]	1.0 ng/µL [N=23]	1.5 ng/µL [N=17]	2.0 ng/µL [N=22]	2.5 ng/µL [N=24]
Mittelwert [Impulse's]	4412842	9421685	18059139	27537935	36222500	43799665
Stabw. [Impulse's]	446901	1973428	1682415	2588803	4317913	5457080
RSD [%] der Peakflächen	10.1	20.9	9.3	9.4	11.9	12.5

Tabelle 33: Für alle einzelnen Verdaue (Verdau-1,2,3,4): Mittelwert der Peakflächen [Impulse's], Standardabweichung, RSD [%] des 30-mer toxischen Peptides (nach automatischer Integration)

Für alle einzelnen Verdaue: Peakflächen [Impulse's], Standardabweichung, RSD des 30-mer toxischen Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4				
	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=29]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
Mittelwert [Impulse's]	14337107	14932228	16351806	16464564
Stabw. [Impulse's]	741731	985862	930274	3124156
RSD [%] der Peakflächen	5.2	6.6	5.7	19.0

Mit den ermittelten Peakflächen für das 30-mer IS, die in Tabelle 31 aufgelistet sind, wurden nun Kalibriergeraden erstellt. Die Regressionsgeraden zeigen Werte der Bestimmtheitsmaße zwischen $R^2 = 0.9653$ (Verdau-2) bis $R^2 = 0.9898$ (Verdau-1), wobei diese Werte eine gute lineare Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration aufweisen. Die Reproduzierbarkeit, über alle vier Verdaue gemittelt (s. Tabelle 32), zeigt mit RSD-Werten zwischen 9.3 und 12.5 % (mit der Ausnahme von 20.9%) eine gute Robustheit der Methode an. Tabelle 33 fasst die zwischen 5.2 und 6.6 % (mit der Ausnahme 19.0%) liegenden RSD-Werte zusammen, welche über die Peakflächen der 30-mer toxischen Peptide gemittelt wurden.

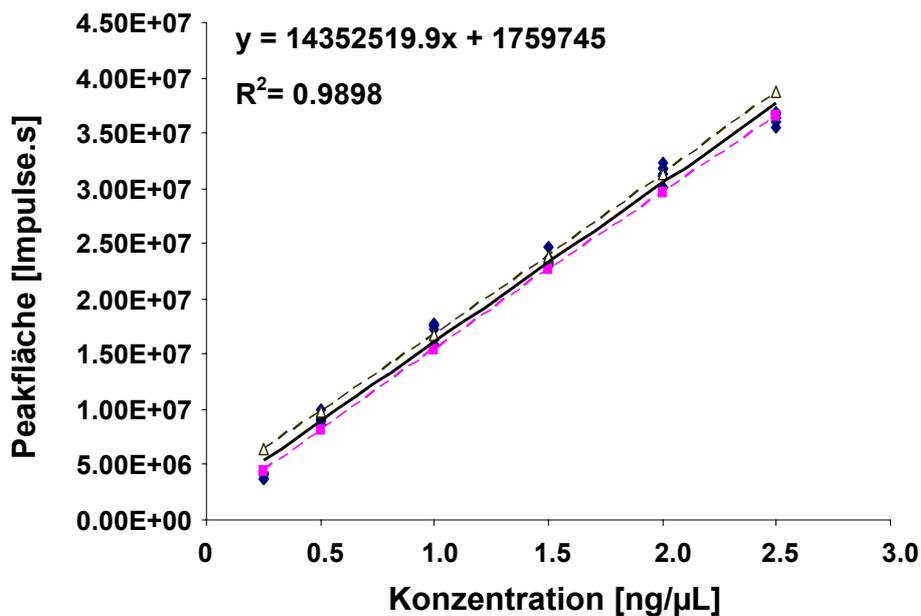


Abbildung 43. Regressionsgerade von **Verdau-1** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=29, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *automatisch* integriert.

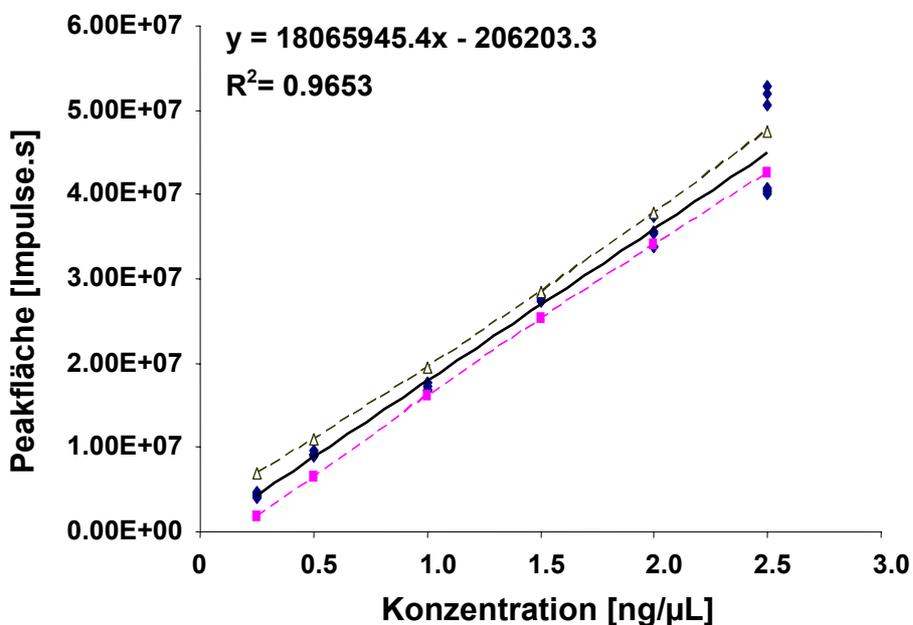


Abbildung 44. Regressionsgerade von **Verdau-2** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=29, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *automatisch* integriert.

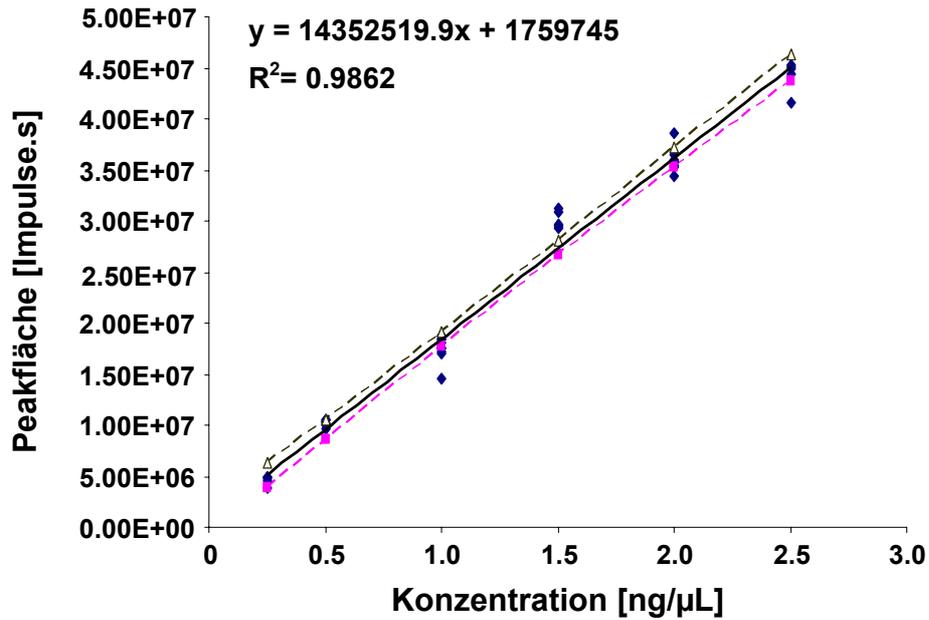


Abbildung 45. Regressionsgerade von **Verdau-3** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=36, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *automatisch* integriert.

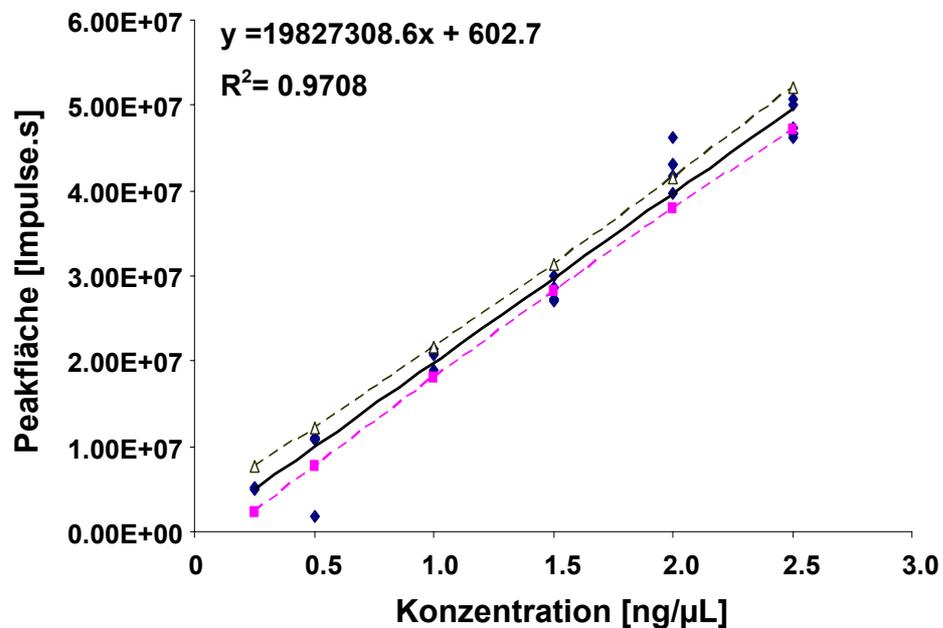


Abbildung 46. Regressionsgerade von **Verdau-4** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=27, 99%-zweiseitig. Peakflächen wurden *automatisch* integriert.

Tabelle 34: Peakflächen [Impulse·s] des 30-mer toxischen Peptides in den vier Verdaun. (nach automatischer Integration)

Int. Std. Konzentration ng/µL	Peakflächen des 30 mer Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4 [Impulse·s]			
	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=29]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
0.25	14678800	13772800	15038600	-
0.25	15565900	15322500	16219900	-
0.25	15123100	13450800	16966900	-
0.25	14358100	13610900	14412000	16841500
0.25	13712800	13230100	13893300	15706200
0.5	15080900	14324600	17565600	1862020
0.5	14682700	14904500	17067800	16650200
0.5	14761100	15317300	16139400	15276100
0.5	14145400	16843700	15645700	15305600
0.5	13825400	-	16123400	16136800
1.0	14908000	15212600	16597400	17068700
1.0	15395900	16218400	13790700	15665000
1.0	15697100	15729200	15273100	14894400
1.0	15563500	14712000	15953500	16835100
1.0	14845400	-	16637400	16886500
1.0	-	-	17194300	-
1.0	-	-	15771000	-
1.0	-	-	17166500	-
1.0	-	-	16680100	-
1.5	14507700	16286700	17322500	17505400
1.5	14404600	15766100	16823000	18136900
1.5	13599800	15759900	16897400	18118500
1.5	14691800	15644000	15847300	18156200
1.5	-	-	17102700	-
2.0	13317900	16487700	17119200	19487000
2.0	13684400	15761600	16677800	15971500
2.0	13525000	15194600	16630100	17664100
2.0	14041900	15191700	16970800	17131700
2.0	13519500	14546700	16061400	17224400
2.0	-	-	15886100	-
2.0	-	-	16985800	-
2.5	13616300	15269800	17409700	19141500
2.5	13772700	-	17038200	17569100
2.5	13247800	13832500	16713700	17800100
2.5	13386700	14629000	16420900	17137000
2.5	14115900	13522900	16621800	16906600
2.5	-	14217900	-	17465100
2.5	-	14157900	-	-
2.5	-	14116200	-	-

Tabelle 35: Konzentrationen des 30-mer toxischen Peptides in den vier hergestellten Verdauen zur Quantifizierung (nach automatische Integration).

Int. Std. Konzentration ng/ μ L	Konzentrationen des 30 mer Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4 [ng/ μ L]			
	Verdau-1 [N=29]	Verdau-2 [N=29]	Verdau-3 [N=36]	Verdau-4 [N=27]
0.25	0.900	0,751	0.808	-
0.25	0.962	0,837	0.874	-
0.25	0.931	0,733	0.916	-
0.25	0.878	0,742	0.772	0.849
0.25	0.833	0,721	0.743	0.792
0.5	0.928	0,781	0.950	0.0939
0.5	0.900	0,814	0.922	0.840
0.5	0.906	0,836	0.870	0.770
0.5	0.863	0,921	0.842	0.772
0.5	0.841	-	0.869	0.814
1.0	0.916	0,831	0.896	0.861
1.0	0.950	0,886	0.737	0.790
1.0	0.971	0,859	0.821	0.751
1.0	0.962	0,803	0.860	0.849
1.0	0.912	-	0.898	0.852
1.0	-	-	0.929	-
1.0	-	-	0.849	-
1.0	-	-	0.928	-
1.0	-	-	0.900	-
1.5	0.888	0,890	0.936	0.883
1.5	0.881	0,861	0.908	0.915
1.5	0.825	0,861	0.912	0.914
1.5	0.901	0,855	0.853	0.916
1.5	-	-	0.924	-
2.0	0.805	0,901	0.925	0.983
2.0	0.831	0,861	0.900	0.806
2.0	0.820	0,830	0.897	0.891
2.0	0.856	0,829	0.917	0.864
2.0	0.819	0,794	0.865	0.869
2.0	-	-	0.855	-
2.0	-	-	0.917	-
2.5	0.826	0,834	0.941	0.965
2.5	0.837	-	0.920	0.886
2.5	0.800	0,754	0.902	0.898
2.5	0.810	0,798	0.886	0.864
2.5	0.861	0,737	0.897	0.853
2.5	-	0,776	-	0.881
2.5	-	0,772	-	-
2.5	-	0,770	-	-

Tabelle 36: Über die entsprechenden Regressionsgleichungen berechnete Endkonzentrationen (Mittelwert), Standardabweichungen (Stabw.), RSD [%]-Werte der zu analysierenden 30-mer toxischen Peptide bei den zugehörigen Konzentrationen von 30-mer IS in den vier hergestellten Verdauen.

Mittelwert, Standardabweichung und RSD [%] der Konzentration des 30-mer toxischen Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4				
Int. Std. Konzentration ng/μL	Verdau-1 [ng/μL] [N=29]	Verdau-2 [ng/μL] [N=29]	Verdau-3 [ng/μL] [N=36]	Verdau-4 [ng/μL] [N=27]
Mittelwert	0.876	0.815	0.882	0.830
Stabw.	0.052	0.055	0.052	0.056
RSD [%] der Konzentrationen	5.9	6.7	5.9	6.7

Tabelle 37: Endkonzentrationen der 30-mer toxischen Peptides in den einzelnen vier Proben (Mit Berücksichtigung der 1/10 Verdünnung wurden die Ergebnisse hochgerechnet.).

Für 30-mer im Verdau -1: 8.76 ± 0.37 ng/μL (N= 29, m=29, $s_y = 927810$, $f=29-2$ (t=2.052), P=95%,zweiseitig).

Für 30-mer im Verdau -2: 8.15 ± 0.96 ng/μL (N= 29, m= 29, $s_y = 3006739$, $f=29-2$ (t=2.052), P=95%,zweiseitig).

Für 30-mer im Verdau -3: 8.82 ± 0.45 ng/μL (N= 36, m=36, $s_y = 1623100$, $f=36-2$ (t=1.96), P=95%,zweiseitig).

Für 30-mer im Verdau -4: 8.30 ± 0.84 ng/μL (N=27, m=27, $s_y = 2797982$, $f=27-2$ (t=2.06), P=95%,zweiseitig).

3.3.5 Vergleich der Quantifizierungsergebnisse zwischen den manuellen automatischen Auswertungen

In Tabelle 38 sind die aus der manuellen und automatischen Integration berechneten Endkonzentrationen der 30-mer toxischen Peptide in vier Proben zusammengefasst. Aus diesen Zusammenfassungstabellen ist zu ersehen, dass die aus beiden Integrationsdurchführungen erhaltenen Ergebnisse eine recht gute Reproduzierbarkeit aufweisen. Im Einzelnen sind die Ergebnisse der manuellen Integration für Verdau-3 und Verdau-4 besser als die der automatischen Integration, wohingegen die Ergebnisse der automatischen Integration bei Verdau-1 und Verdau-2 bessere Reproduzierbarkeit darstellen.

Tabelle 38: Der Vergleich der Quantifizierungsergebnisse zwischen den manuellen automatischen Auswertungen

Mittelwert, Standardabweichung und RSD [%] der Konzentration des 30-mer toxischen Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4 [Nach manueller Integration]				
	Verdau-1 [ng/ μ L] [N=29]	Verdau-2 [ng/ μ L] [N=30]	Verdau-3 [ng/ μ L] [N=36]	Verdau-4 [ng/ μ L] [N=27]
Mittelwert	0.834	0.800	0.866	0.785
Stabw.	0.084	0.072	0.042	0.043
RSD [%] der Konzentrationen	10.1	9.0	4.8	5.4
Mittelwert, Standardabweichung und RSD [%] der Konzentration des 30-mer toxischen Peptides in Verdau-1, Verdau-2, Verdau-3, Verdau-4 [Nach automatischer Integration]				
	Verdau-1 [ng/ μ L] [N=29]	Verdau-2 [ng/ μ L] [N=29]	Verdau-3 [ng/ μ L] [N=36]	Verdau-4 [ng/ μ L] [N=27]
Mittelwert	0.876	0.815	0.882	0.830
Stabw.	0.052	0.055	0.052	0.056
RSD [%] der Konzentrationen	5.9	6.7	5.9	6.7

3.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine Studie mit dem Ziel zur absoluten Quantifizierung eines 30-mer toxischen Peptides in einem hochkomplexen Gliadinextrakt durchgeführt. Zu dieser absoluten Quantifizierung wurde eine Strategie entwickelt, deren Schrittweise in Abbildung 47 schematisch dargestellt wird.

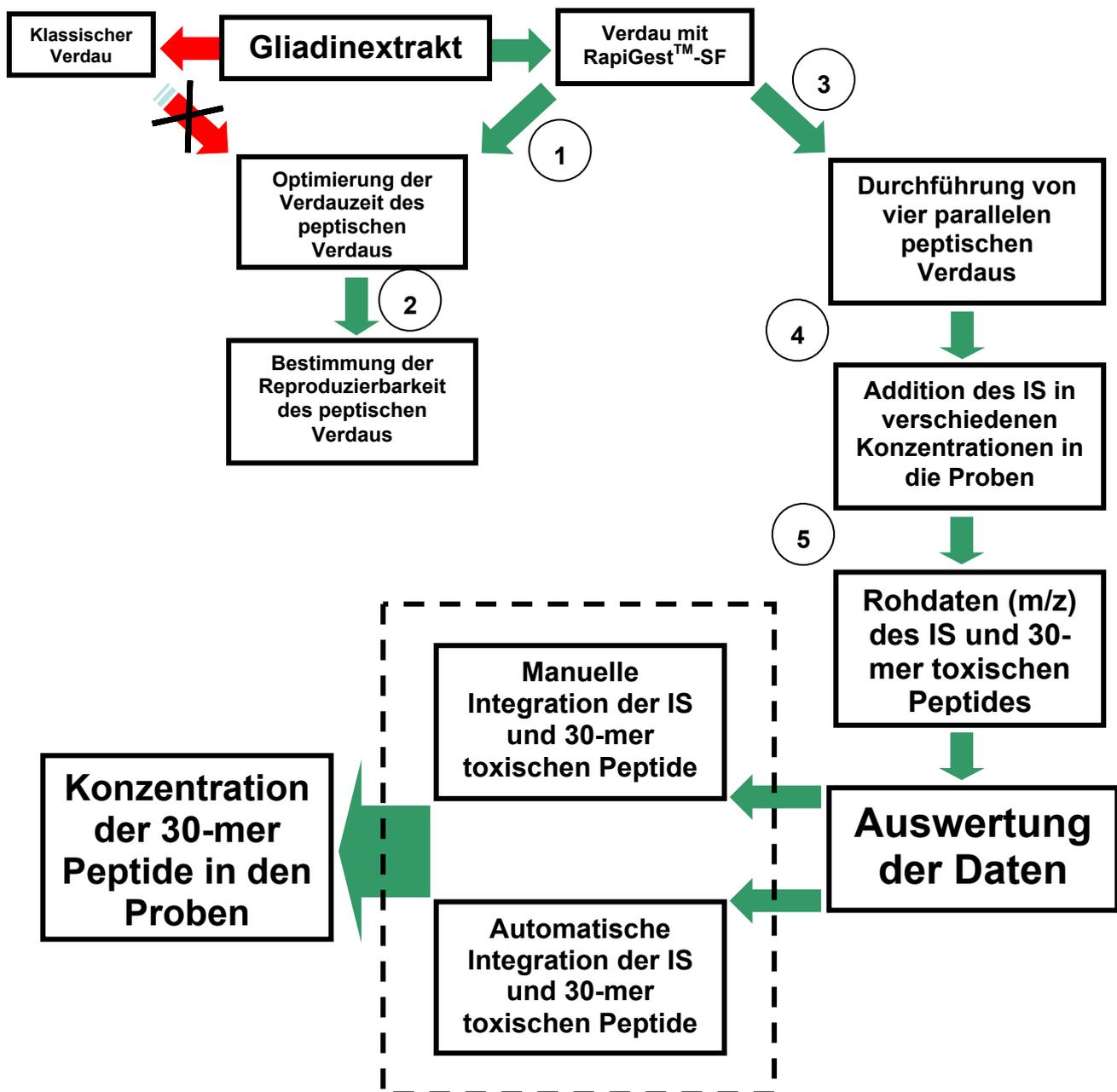


Abbildung 47. Strategie zur absoluten Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide

Eine der wichtigsten Motivationen dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode für die Quantifizierung der Peptide, so dass die Gehaltsbestimmung der Peptide in relativ kurzer Zeit, mit möglichst wenig Probenverlust und höhere Reproduzierbarkeit mittels Massenspektrometrie durchgeführt werden kann.

Diese Arbeit bestand aus zwei eigentlichen Hauptteilen. Im ersten Teil wurden qualitative Studien durch die klassische Verdautechnik durchgeführt, um die in der Fachliteratur bekannten toxischen Peptide zu identifizieren (s. Tabelle 9). Sie wurden durch peptische und chymotryptische Verdaue erhalten. Die komplette Auswertung der MS/MS-Daten zur Peptididentifizierungen wurden von den Arbeitskreisen der Bioinformatik von *Prof. O. Kohlbacher (Universität Tübingen)* und *Prof. K. Reinert (Freie Universität Berlin)* mit Hilfe der dieser Suchmaschinen (OMSSA, InsPect und Mascot) durchgeführt. Als Resultat der Identifizierungsergebnisse konnten nicht alle Peptide aufgrund der aufgetretenen Zuordnungsschwierigkeiten und niedrigeren Scores identifiziert werden (s. Kapitel 3.1.3). Auf der anderen Seite führten hohe signifikante Scores von OMSSA zu zuverlässiger Identifizierung des 30-mer toxischen Peptides. Ein Grund für die niedrigeren Scores abgesehen von den MS-Einstellungen ist eine niedrigere Konzentration der gesuchten Peptide in der Probe. Je niedriger ist die Konzentration der gesuchten Peptide, desto schwieriger kann der Nachweis dieser Peptide unter den entsprechenden Einstellungsparametern der Massenspektrometrie werden. Bei dem klassischen Verdauverfahren der Proteine wird die Dialyse der Probe benötigt, um die niedermolekularen Substanzen aus der Probe zu entfernen. Dieser wichtige Schritt des klassischen Verdau führte öfters zu Probenverlusten aufgrund der Adsorptionseffekte der Probe an dem Dialysenschlauch. Ein zweiter Nachteil des klassischen Verdau wegen der Dialyse war seine lange Vorbereitungsdauer, die bis zu mehr als 24 Stunden dauern konnte. Um dieses Problem zu lösen, wurden Proteine mit Hilfe einer oberflächenaktiven Substanz namens **RapiGestTMSF** denaturiert und anschließend enzymatisch verdaut. Die Methode nannte sich Verdau mit **RapiGestTMSF**. Durch ein entwickeltes Verdauprotokoll wurde der Gliadinextrakt mit Hilfe von RapiGestTMSF denaturiert und peptisch verdaut (s. Kapitel 3.1.6). Abgesehen von seinen qualitativen Vorteilen brachte diese Verdautechnik auch quantitative Vorteile mit, die zur einen absoluten Quantifizierung der Peptide von sehr großer Bedeutung war. Weil alle Reaktionsschritte in einem Vial passierten, sollte das zu minimalen Probenverlusten führen.

Zur Optimierung einer absoluten Quantifizierung durch diese Methode wurde das 30-mer toxische Peptid verwendet. Das 30-mer toxische Peptid wurde nach einer schrittweise verfolgten Strategie quantitativ bestimmt. Der erste Schritt dieser Quantifizierungsstrategie war die Optimierung der Verdauzeit, mit dem Ziel, dass die höchste Ausbeute von diesen Peptiden erhalten werden kann. Aufgrund der hohen Reaktivität des Pepsins wurde der Gliadinextrakt in relativ kurzen Zeitintervallen verdaut. Nach dem Starten der Verdaureaktionen wurden Proben aus der Stammlösung an den Zeitpunkten bei 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 und 6.0 Stunden entnommen. Nach dieser Studie ergab sich, dass eine Verdauzeit von 3 Stunden für das 30-mer toxische Peptid die größte Ausbeute zeigte (s. Kapitel 3.1.7).

Als zweiter Schritt der Quantifizierungsstrategie war die Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Pepsinverdaus. Um diese Frage der Reproduzierbarkeit zu beantworten, wurden drei parallele peptische Verdaue unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit des peptischen Verdaus wurde über die Peakflächen der 30-mer toxischen Peptide bestimmt. Die relative Standardabweichung [RSD%] für alle drei Verdaue lag bei 5.5% (s. Tabelle 21), wobei die einzelnen drei parallelen Verdaue mit einer Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zwischen 3.0 und 6.0% variierten (s. Tabelle 20).

Entsprechend dieser Optima wurden vier Proben des Extraktes unter den gleichen Bedingungen parallel verdaut (s. Kapitel 3.2.1). Die Kalibrierung für die absolute Quantifizierung wurde mit dem Konzept eines isotonenmarkierten internen Standards durchgeführt (IS), wobei die Anwendung eines internen Standards für absolute Quantifizierung der Peptide in den komplexen Mischungen vorgeschrieben war, um die Signalveränderung wegen der Ionensuppression während der Elektrospray-Ionisation herabzusetzen. Als interner Standard wurde ein Peptid verwendet, welches die dieselbe Sequenz des 30-mer toxischen Peptides hatte (1167.4 m/z / +3) und am N-terminalen Valin durch sechs C-13-Atome isotonenmarkiert war. Alle Kalibriergeraden wurden jeweils mit sechs Kalibrierpunkten (0.25 ng/μL, 0.5 ng/μL, 10 ng/μL, 1.5 ng/μL, 2.0 ng/μL, 2.5 ng/μL) erstellt.

Der letzte Schritt dieser Quantifizierungsstudie war die Auswertung der Rohdaten. Alle MS-Daten wurden mit Hilfe der manuellen und automatischen Integration ausgewertet. Dadurch wurden Endergebnisse der beiden Auswertungen miteinander verglichen.

In Tabelle 39 sind die Endergebnisse beider Auswertungsweisen zusammengefasst.

Tabelle 39: Zusammenfassung der Konzentrationen (mg/g) der 30-mer Peptide in den Gliadinextrakten nach manueller und automatischer Integration.

Endergebnisse nach manueller Integration
Für 30-mer im Verdau -1: 8.65 ± 0.30 mg/g (N= 29, m=29, $s_y = 614162$, f=29-2 (t=2.052), P=95%,zweiseitig).
Für 30-mer im Verdau -2: 8.31 ± 0.95 mg/g (N= 30, m=30, $s_y = 2384707$, f=30-2 (t=2.048), P=95%,zweiseitig).
Für 30-mer im Verdau -3: 8.97 ± 0.37 mg/g (N= 36, m=36, $s_y = 993431$, f=36-2 (t=1.96), P=95%,zweiseitig).
Für 30-mer im Verdau -4: 8.15 ± 0.72 mg/g (N=27, m=27, $s_y = 1727138$, f=27-2 (t=2.06), P=95%,zweiseitig).
Endergebnisse nach automatischer Integration
Für 30-mer im Verdau -1: 9.07 ± 0.38 mg/g (N= 29, m=29, $s_y = 927810$, f=29-2 (t=2.052), P=95%,zweiseitig).
Für 30-mer im Verdau -2: 8.47 ± 0.99 mg/g (N= 29, m= 29, $s_y = 3006739$, f=29-2 (t=2.052), P=95%,zweiseitig).
Für 30-mer im Verdau -3: 9.13 ± 0.47 mg/g (N= 36, m=36, $s_y = 1623100$, f=36-2 (t=1.96), P=95%,zweiseitig).
Für 30-mer im Verdau -4: 8.61 ± 0.87 mg/g (N=27, m=27, $s_y = 2797982$, f=27-2 (t=2.06), P=95%,zweiseitig).

3.5 Absolute Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides in Weizenmehl

3.5.1 Motivation

Um diese Quantifizierungsmethode in der alltäglichen Praxis der Lebensmittelindustrie zu realisieren, wurde anhand der entwickelten Quantifizierungsstrategie das toxische 30-mer Peptid in kommerziell erhältlichem Weizenmehl quantitativ bestimmt.

3.5.2 Praktischer Teil

3.5.3 Chemikalien und Materialien

Acetonitril (HPLC gradient-grade) und Ethanol (99.8%) wurden bei Riedel-deHaën (Seelze, Deutschland) erworben. Natriumchlorid (p. a.) war von Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland). Trifluoressigsäure (TFA, für Proteinsequenzanalyse), Natronlaugeplättchen (p. a.), Iodessigsäure (p. a.), Guanidin-HCl (p.a.), Ammoniumhydrogencarbonat (p.a.) und Pepsin vom Schweinemagen wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft. Serumalbumin vom Rind (BSA), 2-Mercaptoethanol (p. a.) und Dithiothreitol (DTT) (p. a.) wurden bei Sigma (St. Louis, MO, USA) erworben. Das Denaturierungsreagenz RapiGestTM-SF war von Waters (Milford, MA, USA). Das entionisierte Wasser wurde dem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Deutschland) genommen. Zur absoluten Quantifizierungsstudie wurde der 30-mer interne Standard von Thermo-Electron GmbH (Ulm, Deutschland) bestellt. Das Weizenmehl Typ-405 (Harina de trigo tipo 405 - Farinha de trigo tipo 405) der Firma Fabulo wurde in einem lokalen Supermarkt gekauft.

3.5.4 Geräte

Die benutzte Waage (AE163) war von Mettler (Giessen, Deutschland). Zum Verdauen von Proteinproben wurden ein Eppendorf Thermomixer comfort und eine Zentrifuge Biofuge 13 (Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland) benutzt. Für IP-RP-HPLC-Analysen wurde ein Ultimate Capillary/Nano LC System, ausgestattet mit Mikropumpe, Beladungspumpe, Säulenschaltssystem, Autosampler und Säulenofen, verwendet (LCPackings, Amsterdam, Niederlande). Das benutzte Massenspektrometer war eine Ionenfalle Esquire HCT (Bruker, Bremen, Deutschland), ausgestattet mit einer modifizierten ESI-Ionenquelle. Die chromatographische Säule für die IP-RP-HPLC war eine monolithische Kapillarsäule (60 x 0.20 mm ID), die im Labor selbst synthetisiert wurde und bei LCPackings kommerziell erhältlich ist. Als Trapsäule für die zweidimensionale Chromatographie wurde eine monolithische PS/DVB-Kapillarsäule mit den Dimensionen 10 x 0.20 mm ID benutzt. Die Trennsäule wurde mit der ESI-Spraykapillare (Quarz, 90 µm OD, 20 µm ID, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) mittels eines Microtight Unions aus Stahl (Fritz Gyger AG Swiss, Gwatt-Thun, Schweiz) verbunden. Der Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301) zum Einengen von Lösungen wurde bei Eppendorf erworben und war mit einer Membranvakuumpumpe von Vacuubrand (Wertheim, Deutschland) bestückt.

3.5.5 Entfetten des Weizenmehls

Das Weizenmehl wurde durch Soxhlet-Extraktion entfettet. Dafür wurden 10.00 g Weizenmehl eingewogen und in einer Soxhletapparatur mit Petrolether vom Fett befreit. Die Entfettung der Probe wurde bei 40°C durchgeführt (7 Kreisläufe des Petrolethers).

Anschließend wurde das entfettete Mehl über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

3.5.6 Extraktion der Gliadine aus dem entfettetem Weizenmehl

Von der trockenen Masse des entfetteten Weizenmehls wurden 2 g eingewogen. Die Probe wurde in 20 mL 70% iger wässriger Ethanollösung gelöst. Die entstandene Suspension wurde für 40 min bei RT geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die Probelösung für 15 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand der Suspension in 1.5 mL-Vials verteilt und bei RT bis zur Trockene eingengt. Nach dem kompletten Trocknen wurden die in sehr kleinen Mengen extrahierten Gliadine in einem Vial vereinigt.

3.5.7 Peptischer Verdau des Gliadinextrakts

3.021 mg Gliadinextrakt wurden in ein 1.5 mL-Vial eingewogen. Dann wurde in 500 µL 0.2% (w/w) iger RapiGestTM-SF-Lösung gelöst und bei 90°C für 5 min bei 600 rpm denaturiert. Danach wurden die Schwefelbrücken durch Zugabe von 25.5 µL 300 mM DTT bei 60 °C für 1 Std. bei 900 rpm reduziert. Nach diesem Schritt wurde die Probe auf Raumtemperatur (RT) temperiert und für 30 min mit 10 µL 2M Iodessigsäure versetzt, um die freien Schwefelgruppen zu carboxymethylieren. Diese Reaktion verlief unter Lichtausschluss. Um den Überschuss von 2M Iodessigsäure zu entfernen, wurde die Probe für 30 min bei RT mit 20 µL 1M 2-Mercaptoethanol versetzt (kein Lichtausschluss). Zum peptischen Verdau wurden 2.430 mg Pepsin (vom Schweinemagen) in 1 mL dest. Wasser gelöst. Vor den

Verdauen wurden die Proteinlösung, die Pepsinlösung und zusätzlich der zur Einstellung des pH-Wertes verwendete 1M Guanidin-HCl-Puffer (pH=1.3) durch Erwärmen für 15 min bei 37°C bei 900 rpm aktiviert bzw. zum Verdau vorbereitet. Nach der Aktivierung wurden 62.2 µL (151.05 µg-Pepsin) Pepsinlösung zu der Proteinlösung gegeben, um ein Enzym/Protein Verhältnis von 1/20 (w/w) zu erreichen. Dann wurde die Proteinlösung mit 350 µL 1M-Guanidin-HCl-Puffer, pH= 1.3 angesäuert. Der Verdau wurde bei 37°C für 3 Std. bei 900 rpm durchgeführt. Anschließend wurde die Verdaureaktion irreversibel durch Zugabe von 70 µL 1M NaOH gestoppt. (ca. pH= 7-8)

In Tabelle 40 ist die Endkonzentration der durch peptischen Verdau hergestellten Peptidlösung dargestellt.

Tabelle 40: Die Endkonzentration der hergestellten Stammlösung zur absoluten Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide in Weizenmehl.

	Gliadinextrakt
Zur Entfettung eingewogene Menge des Weizenmehls	10.000 g
Zur Gliadinextraktion eingewogene Menge des entfetteten Weizenmehls	2.000 g
Eingewogene Menge an Gliadinextrakt	3.021 mg
Endvolumen, in dem die Peptide gelöst sind (nach dem Stoppen)	1037.7 µL
Endkonzentration der hergestellten Stammlösung	2.911 µg/µL

3.5.8 RP-HPLC-MS/MS Analyse des peptisch verdauten Gliadinextrakts

Zur qualitativen Bestimmung des toxischen 30-mer Peptides nach diesem Verdau wurden 290 ng der entstandenen Peptide wie in Abbildung 48 in ein IP-RP-HPLC-MS-System injiziert und anschließend analysiert. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0-30% Acetonitril in 0.05% TFA in 60 min durchgeführt. Die MS/MS-Detektion wurde in einem Massenbereich zwischen 600-1500 m/z durchgeführt.

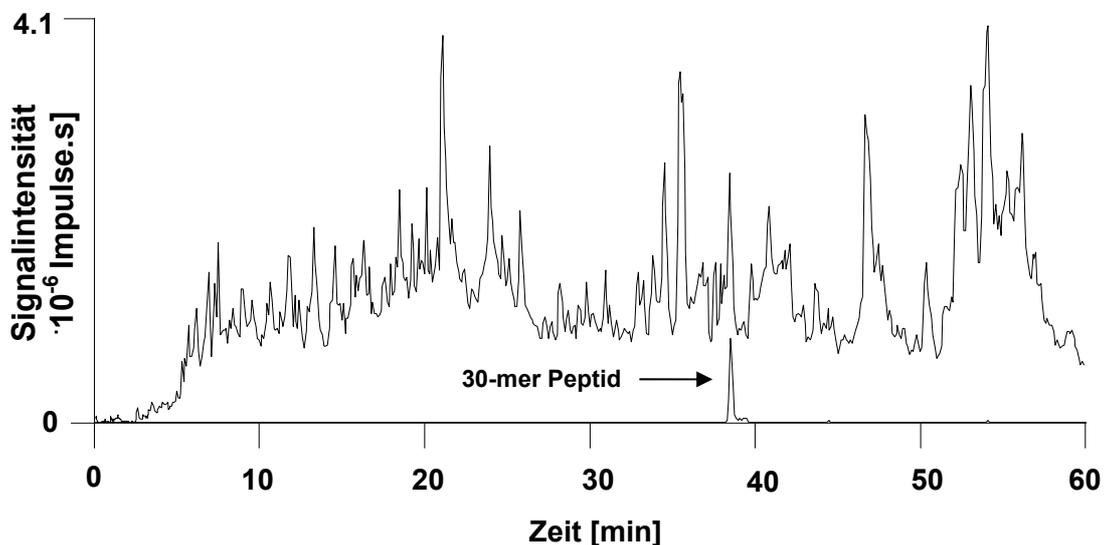


Abbildung 48. IP-RP-HPLC-MS/MS Analyse vom peptisch verdauten Gliadinextrakt aus dem entfetteten Weizenmehl Typ-405 durch Denaturierung mit RapiGestTM-SF

PS/DVB Monolith, 60 x 0.20 mm ID; Gradient, 0 - 30% B in 60 min; Fluss, 2 μ L/min; Temperatur, 50 °C; Eluent A, 0.05% TFA in Wasser (v/v); Eluent B, 0.05% TFA in Acetonitril (v/v); Injektionsvolumen, 1 μ L (vollloop); Detektion, MS/MS; Scan Modus, Standard Enhanced Modus; Massenbereich, 600-1500 m/z; Injizierte Menge: 290 ng Gliadinpeptide.

Die aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden mittels MASCOT-Software ausgewertet. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten, die in Tabelle 41 zusammengefasst sind.

Tabelle 41 : Ergebnisse der Datenbanksuche mittels MASCOT-Software.

Database	: MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues)								
Taxonomy	: Other green plants (129973 sequences)								
Timestamp	: 25 Jul 2007 at 15:07:31 GMT								
Protein hits	: Q18NR2_WHEAT Low molecular weight glutenin subunit. Q8W3X6_WHEAT Low-molecular-weight glutenin subunit group 1 type I. Q5MFQ0_WHEAT Low molecular weight glutenin- Triticum aestivum (Wheat). Q5MFN4_WHEAT Low molecular weight glutenin (Fragment). Q6QGV8_WHEAT LMW glutenin pGM107.- Triticum aestivum (Wheat). Q3LGB3_WHEAT Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment). Q8W3X3_WHEAT Low-molecular-weight glutenin subunit group 3 type II. Q3YFI0_TRITU Alpha-type gliadin (Fragment).- Triticum turgidum subsp. Q9M6P7_WHEAT Gamma-gliadin (Fragment).- Triticum aestivum (Wheat). Q571Q5_WHEAT Putative LMW-glutenin subunit.- Triticum aestivum (Wheat). Q2V5Z6_TRITU Alpha-gliadin protein.- Triticum turgidum subsp. Q9M4L9_WHEAT Alpha-gliadin.- Triticum aestivum (Wheat). B22364 alpha/beta-gliadin precursor (clone A26) - wheat Q6DLC7_AEGTA Omega gliadin.- Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) Q8W3W2_WHEAT Low-molecular-weight glutenin subunit group 5 type III.								
8.	Q3YFI0_TRITU	Mass:	31825	Score:	78	Queries matched:	4	emPAI:	0.39
	Alpha-type gliadin (Fragment). - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.								
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Peptide		
77	744.3700	1486.7254	1486.7753	-0.0499	0	31	L.QQHNIAGRSLQ		
169	1012.9600	3035.8582	3034.4978	1.3604	3	(37)	F.LGQQQFPFPQYPQPFPSQQPYL.Q		
170	1012.9700	3035.8882	3034.4978	1.3904	3	43	F.LGQQQFPFPQYPQPFPSQQPYL.Q		
217	1165.3800	3493.1182	3491.8274	1.2908	2	43	M.VRVVPQLQPQNPSSQQQPEQVPLVQQQF.		
Proteins matching the same set of peptides:									
Q9M4M0_WHEAT	Mass:	32539	Score:	78	Queries matched:	4			
Alpha-gliadin.- Triticum aestivum (Wheat).									
Q9M4M1_WHEAT	Mass:	32829	Score:	78	Queries matched:	4			
Alpha-gliadin. - Triticum aestivum (Wheat).									
Q9M4M2_WHEAT	Mass:	32541	Score:	78	Queries matched:	4			
Alpha-gliadin. - Triticum aestivum (Wheat).									
Q41533_WHEAT	Mass:	30325	Score:	78	Queries matched:	4			
Alpha-gliadin (Fragment). - Triticum aestivum (Wheat).									

Die Datenbanksuchen wurden mit der MSDB-Datenbank unter der Taxonomie **Other Green Plants** durchgeführt. Peptide wurden mit einer Peptid-Toleranz von ± 1.5 Da und MS/MS-Toleranz ± 0.5 Da gesucht. Dadurch konnten vier Gliadine zugeordnet werden, die das 30-mer toxische Peptid enthielten (s. Tabelle 41). Die MOWSE-Scores waren größer als 15, d.h. das 30-mer toxische Peptid stammt mit einer großen statistischen Sicherheit von Gliadinen. Weiters konnten über die Datenbank Peptide aus weiteren Weizenproteinen wie Glutenine und andere Gliadine in der Analyse zugeordnet werden, welche das 30-mer toxische Peptid nicht enthalten. Von dieser HPLC-MS/MS-Analyse wurde für das 30-mer toxische Peptid ein extrahiertes Ionenchromatogramm mit einer Isolationsbreite von ± 0.5 m/z-Einheiten erstellt, welches in Abbildung 48 gezeigt wird.

3.5.9 Herstellung der Proben zum Erstellen der Kalibrierkurve

Die 30-mer toxischen Peptide wurden mit Hilfe eines isotopenmarkierten 30-mer IS durchgeführt. Die Herstellungen der Proben zur Quantifizierung mit dem IS zum Erstellen der Kalibrierkurven sind in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: Herstellung der Proben zur Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides mit dem IS zum Erstellen der Kalibrierkurven.

Zugefügte Volumina aus	Die Herstellungen der Proben zur Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides und zum Erstellen der Kalibrierkurven mit dem IS.				
	0.25 ng/ μ L	0.5 ng/ μ L	1.0 ng/ μ L	2.0 ng/ μ L	3.0 ng/ μ L
der 10 ng/ μ L IS-Lsg.	2.5 μ L	5.0 μ L	10 μ L	20 μ L	30 μ L
der Stamm.-Lsg.	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Endvolumina	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Endkonz. des inj. IS	0.25 ng/ μ L	0.5 ng/ μ L	1.0 ng/ μ L	2.0 ng/ μ L	3.0 ng/ μ L

3.5.10 Diskussion und Ergebnisse

In Tabelle 43 sind alle Peakflächen des IS bei den entsprechenden Standardkonzentrationen und Peakflächen der 30-mer toxischen Peptide gezeigt. Die Regressionsgerade wurde durch Einstellung von fünf Standardkonzentrationen erstellt. Jede Reihe der Standardkonzentrationen wurde fünfmal wiederholend gemessen. Die anhand der Peakflächen des IS erstellte Regressionsgerade ist in Abbildung 49 dargestellt.

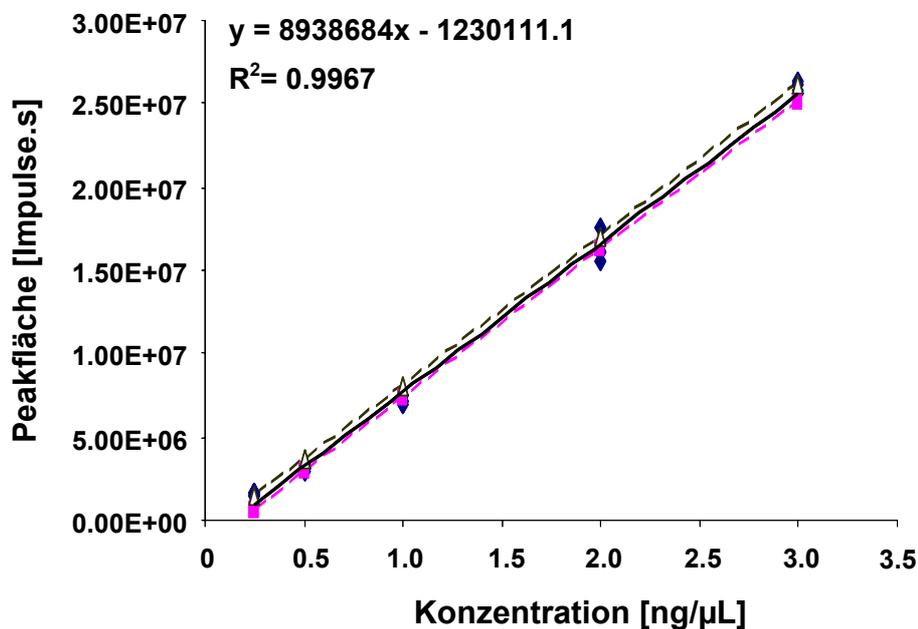


Abbildung 49. Regressionsgerade des **Verdaus** zur Quantifizierung der 30-mer toxischen Peptide im entfetteten Weizenmehl Typ-405. Vertrauensbereich der Regressionsgerade, N=25, 99%-zweiseitig.

Die Regressionsgerade zeigt einen Wert für das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9967$, wobei dieser Wert auf eine gute lineare Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration hinweist. Die 30-mer toxischen Peptide konnten mit einer Reproduzierbarkeit von 6,4% detektiert werden. In Tabelle 43 sind auch anhand der Funktion der Regressionsgerade berechnete Konzentrationen der 30-mer toxischen Peptide zusammengefasst. Das Endresultat der Konzentration dieser Peptide wurde durch den Mittelwert gesamter Konzentrationen bestimmt.

Tabelle 43: Peakflächen [Impulse·s] des IS, Peakflächen [Impulse·s] des 30-mer toxischen Peptides, anhand der Regressionsfunktion berechneten Konzentrationen des 30-mer toxischen Peptides, Endkonzentration des 30-mer toxischen Peptides, RSD [%]- Werte des IS und 30-mer toxischen Peptides **nach manueller Integration** zur Quantifizierung des 30-mer toxischen Peptides im entfetteten Weizenmehl von Typ-405.

Konz. von IS ng/μL	Peakflächen [Impulse·s] von IS [N=25]	Peakflächen [Impulse·s] von 30-mer Pep. [N=25]	Konz. [ng/μL] von 30-mer Pep. [N=25]
0.25	1642873	11263422	1.40
0.25	1615186	10763650	1.34
0.25	1658421	10746490	1.34
0.25	1550252	9374120	1.19
0.25	1530893	10478965	1.31
0.5	3209054	9248787	1.17
0.5	3053229	9589855	1.21
0.5	3131881	10779483	1.34
0.5	2890561	10224016	1.28
0.5	3073896	9430286	1.19
1.0	7138323	9501793	1.20
1.0	7491882	10109876	1.27
1.0	6936369	9303718	1.18
1.0	7182435	10007655	1.26
1.0	7409544	9689599	1.22
2.0	15609122	8899125	1.13
2.0	16031374	9476636	1.20
2.0	16030271	9197945	1.17
2.0	17571029	10036252	1.26
2.0	16676172	10047293	1.26
3.0	25699229	9349031	1.18
3.0	25595025	9273325	1.18
3.0	26141014	9566482	1.21
3.0	25792088	8983363	1.14
3.0	26267682	9837892	1.24
Mittelwert		9807162	1.24 ± 0.036
Stabw.		623056	0.070
RSD [%]		6.4	5.6

Die Endkonzentration des 30-mer toxischen Peptides beträgt 1.24 ng/μL (ohne Berücksichtigung der 1/10-Verdünnung). Dieser Wert wurde mit einer Reproduzierbarkeit von 5.6% gefunden.

3.6 Zusammenfassung

In der durchgeführten Applikationsstudie wurde versucht, die entwickelte Quantifizierungsstrategie auf Realproben der Lebensmittelindustrie zu übertragen. Zu diesem Zweck wurde das 30-mer toxische Peptid in einem kommerziell erhältlichen Weizenmehl von Typ 405 qualitativ und quantitativ untersucht. Zur qualitativen Untersuchung wurde erst das Weizenmehl durch Soxhlet-Extraktion entfettet. Danach wurden aus der Trockenmasse der entfetteten Probe die Gliadine mit Hilfe einer 70% igen wässrigen Ethanollösung extrahiert. Danach wurden 3 mg Gliadinextrakt peptisch verdaut (s. Kapitel 3.7.5). Durch diesen Verdau konnte das 30-mer toxische Peptid mit Hilfe der Mascot-Suche identifiziert werden.

Die absolute Quantifizierung dieses Peptides wurde anhand eines 30-mer IS durchgeführt. Durch Addition dieses IS in fünf verschiedenen Konzentrationen wurde die Regressionsgerade erstellt. Diese Regressionsgerade zeigte ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.9967$. Die 30-mer toxischen Peptide konnten mit einer Reproduzierbarkeit von 6.4% detektiert werden. Das Endresultat der Konzentration dieser Peptide wurde durch den Mittelwert der Werte aus allen Standardkonzentrationen bestimmt. Anschließend wurde die Endkonzentration (mg/g) des 30-mer Peptides im Mehl berechnet:

**1.29 ± 0.37 µg/g Mehl, m=25, N=25, $S_y = 545075$, f=25-2 (t=2.069),
P=95%,zweiseitig**

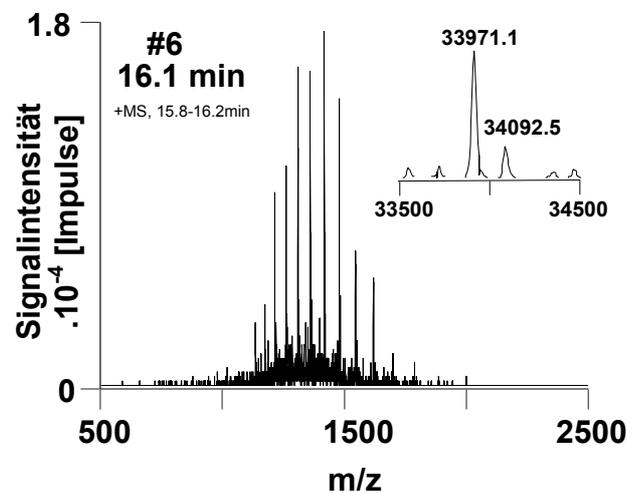
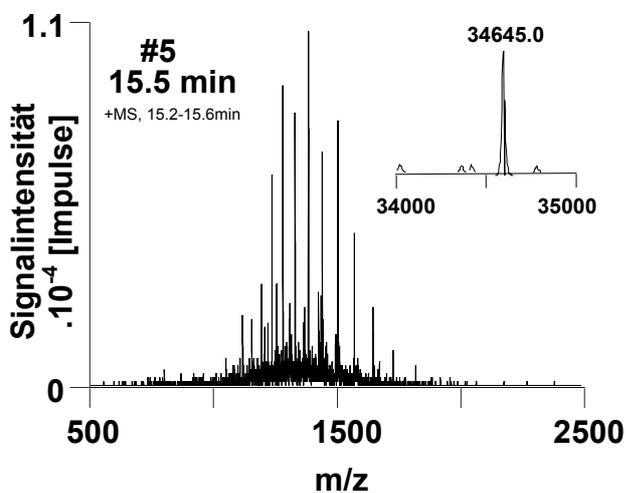
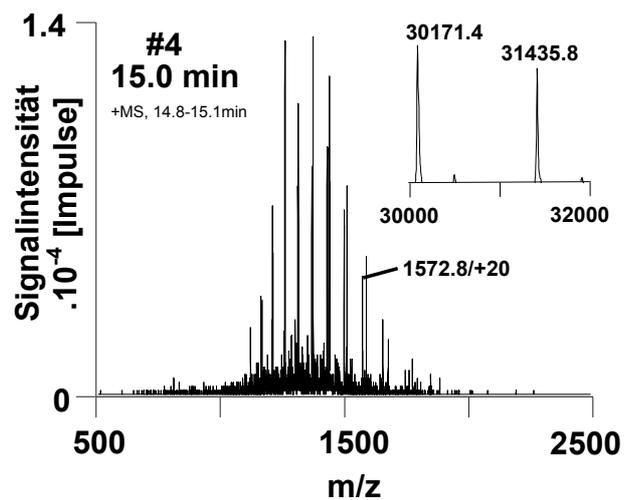
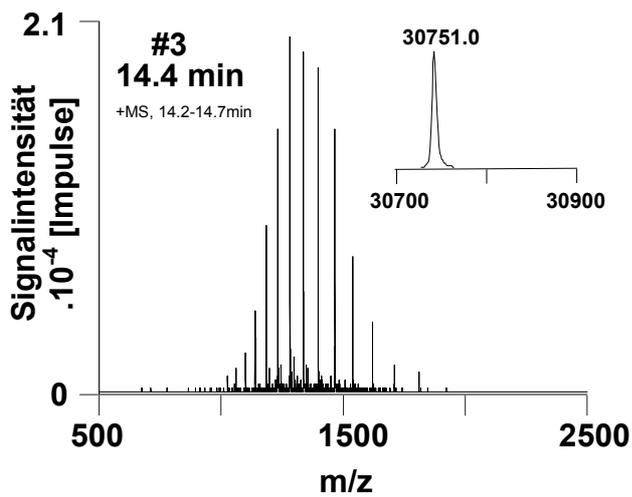
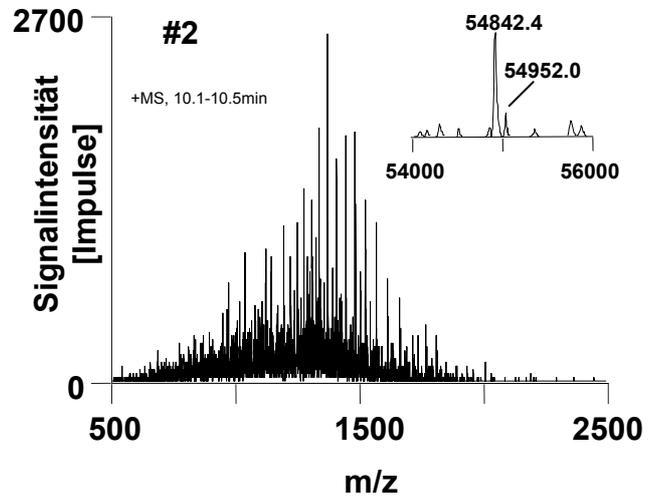
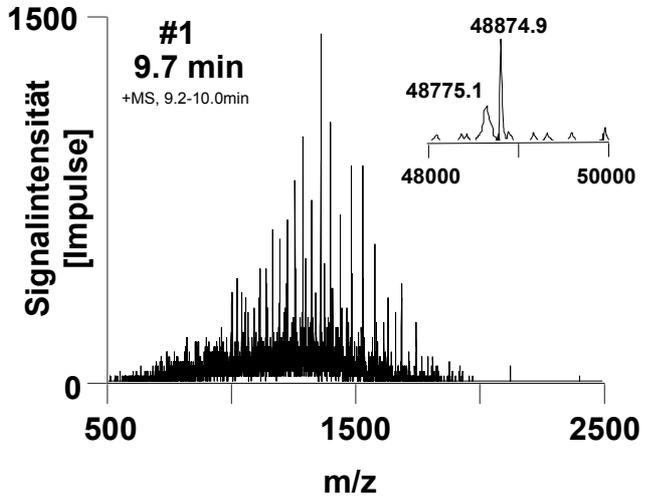
3.7 Literaturverzeichnis

1. Russell, W.K., Park, Z.Y., and Russell, D.H. (2001) Proteolysis in mixed organic-aqueous solvent systems: applications for peptide mass mapping using mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **73**, 2682-5.
2. Park, Z.Y. and Russell, D.H. (2001) Identification of individual proteins in complex protein mixtures by high-resolution, high-mass-accuracy MALDI-TOF-mass spectrometry analysis of in-solution thermal denaturation/enzymatic digestion. *Anal. Chem.*, **73** , 2558-64.
3. Park, Z.Y. and Russell, D.H. (2000) Thermal denaturation: a useful technique in peptide mass mapping. *Anal. Chem.*, **72**, 2667-70.
4. Yates, J.R.I. (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.*, **33**, 1-19.
5. Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., and Mann, M. (1997) Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Anal. Chem.*, **69**, 4741-50.
6. Shevchenko, A., Loboda, A., Shevchenko, A., Ens, W., and Standing, K.G. (2000) MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Anal. Chem.*, **72**, 2132-41.
7. Wolters, D.A., Washburn, M.P., and Yates, J.R. (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.*, **73**, 5683-90.
8. Hixson, K.K., Rodriguez, N., Camp, D.G. 2nd. , Strittmatter, E.F., Lipton, M.S., and Smith, R.D. (2002) Evaluation of enzymatic digestion and liquid chromatography-mass spectrometry peptide mapping of the integral membrane protein bacteriorhodopsin. *Electrophoresis*, **23**, 3224-32.
9. Morjana, N.A., McKeone, B.J., and Gilbert, H.F. (1993) Guanidine hydrochloride stabilization of a partially unfolded intermediate during the reversible denaturation of protein disulfide isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 2107-11.

10. Nomura, E., Katsuta, K., Ueda, T., Toriyama, M., Mori, T., and Inagaki, N. (2004) Acid-labile surfactant improves in-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel protein digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping. *J. Mass Spectrom.*, **39**, 202-7.
11. Yu, Y.Q., Gilar, M., Lee, P.J., Bouvier, E.S., and Gebler, J.C. (2003) Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal. Chem.*, **75**, 6023-8.
12. Yu, Y.Q., Gilar, M., and Gebler, J.C. (2004) A complete peptide mapping of membrane proteins: a novel surfactant aiding the enzymatic digestion of bacteriorhodopsin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 711-5.
13. Suder, P., Bierczynska, A., Konig, S., and Silberring, J. (2004) Acid-labile surfactant assists in-solution digestion of proteins resistant to enzymatic attack. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 822-4.
14. Arnold, R.J. , Hrnčirova, P., Annaiah, K., and Novotny, M.V. (2004) Fast proteolytic digestion coupled with organelle enrichment for proteomic analysis of rat liver. *J. Proteome Res.*, **3**, 653-7.

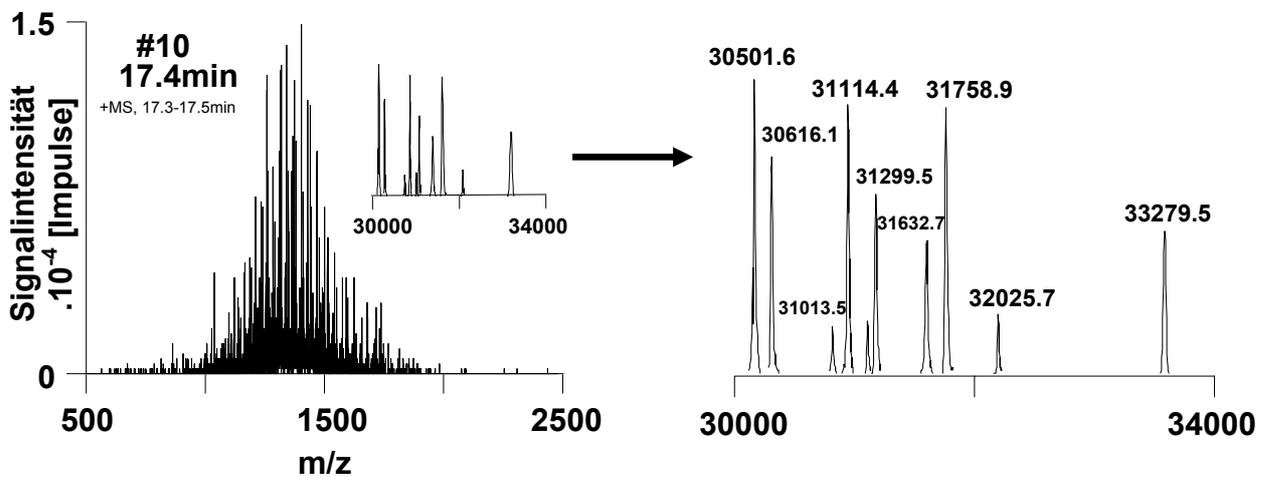
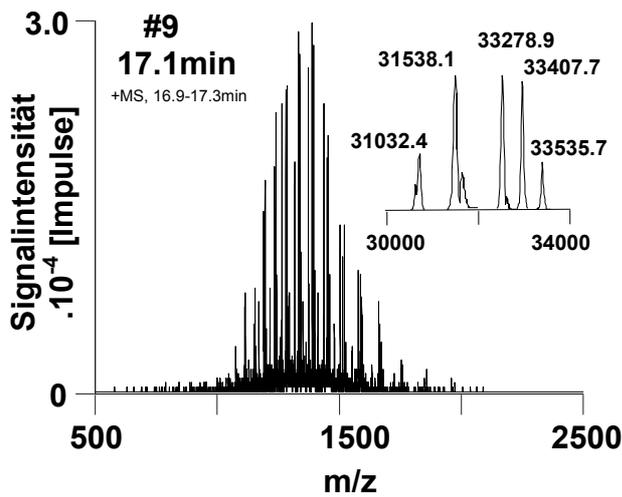
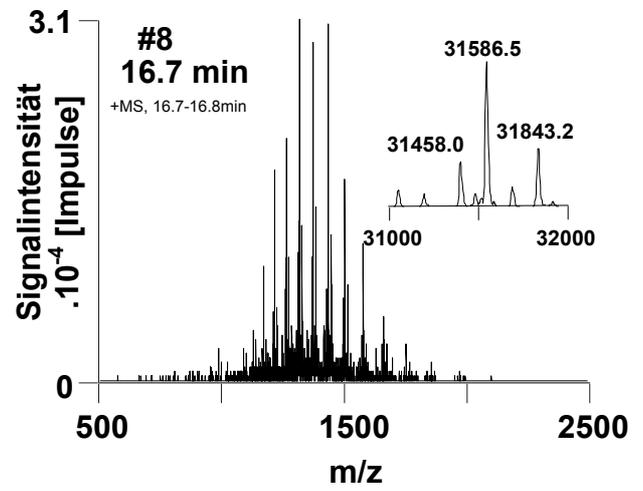
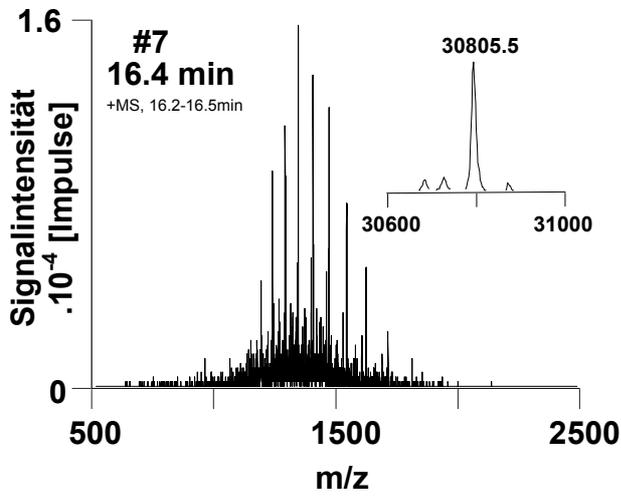
Anhang-1

IP-RP-HPLC-ESI/MS Analyse eines Gliadinextrakts mit Cytochrom-C-Tuning



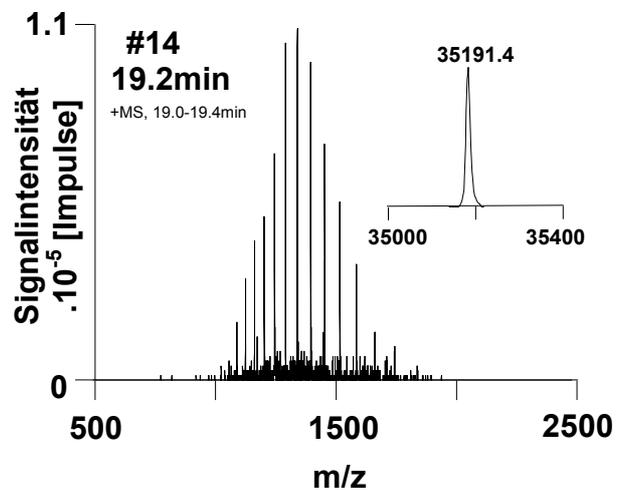
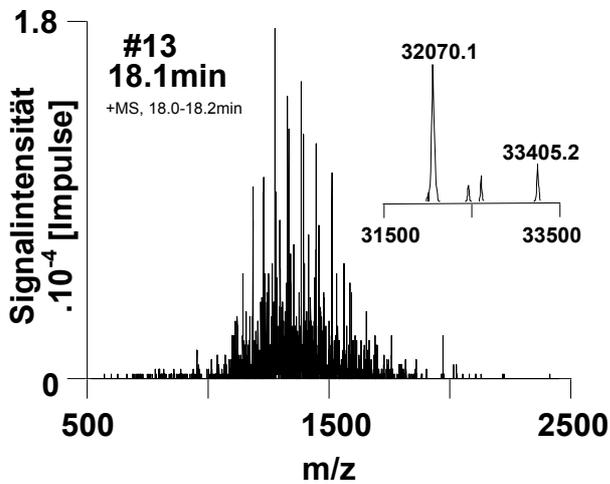
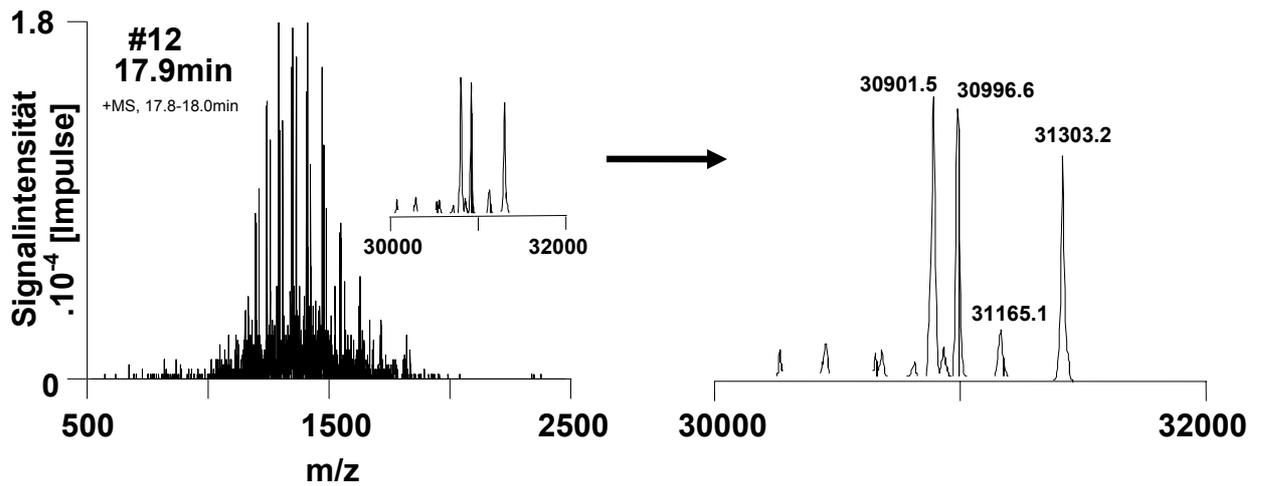
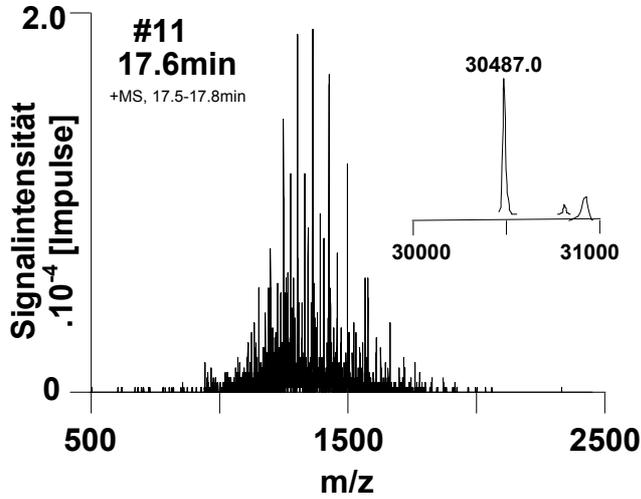
Anhang-1

IP-RP-HPLC-ESI/MS Analyse eines Gliadinextrakts mit Cytochrom-C-Tuning



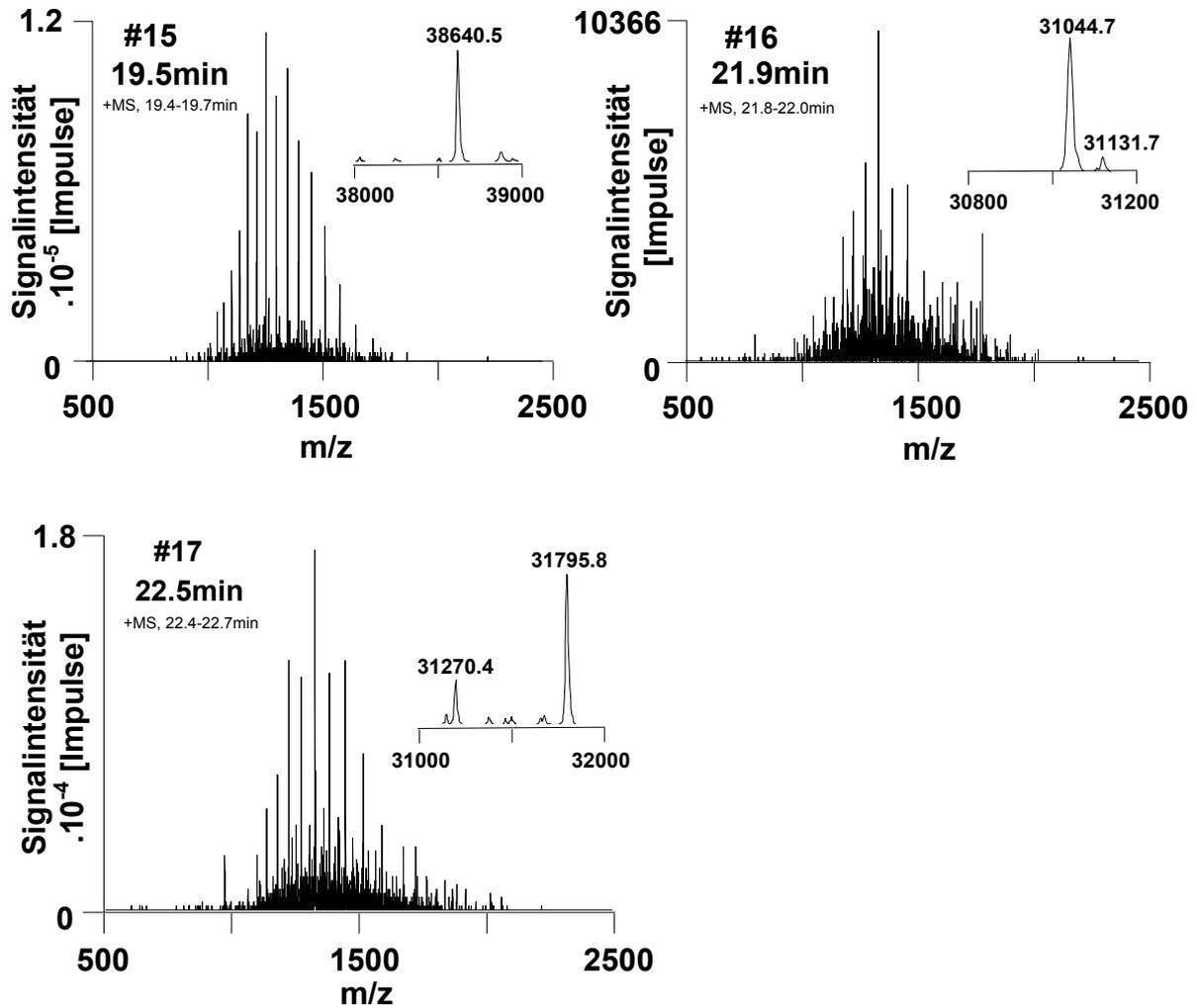
Anhang-1

IP-RP-HPLC-ESI/MS Analyse eines Gliadinextrakts mit Cytochrom-C-Tuning



Anhang-1

IP-RP-HPLC-ESI/MS Analyse eines Gliadinextrakts mit Cytochrom-C-Tuning



Q9FEG9 : γ -Gliadin (Fragment)

(Theoretische Masse: 30747.8 Da / Gemessene Masse: 30751.0 Da)

10 20 30 40 50
 GTANMQVDPS SQVQWPQQQ VPQPHQPFSQ QPQQTFPQPQ QTFPHQPQQQ

60 70 80 90 100
 FPQPQQPQQQ FLQPQQPFPQ QPQQPYPPQP QQPFPQTQQP QQLFPQSQQP

110 120 130 140 150
 QQQFSQPQQQ FPQPQQPQQS FPQQPPFIQ PSLQQQVNPC KNFLLQQCKP

160 170 180 190 200
 VSLVSSLWSM IWPQSDCQVM RQCCQQLAQ IPQQLQCAAI HTVIHSIIMQ

210 220 230 240 250
 QEQQQGMHIL LPLYQQQVQV QGTLVQGGI IQPQQPAQLE AIRSLVLQTL

260 267
 PTMCNVYVPP ECSIIKA

Q41632 : α/β -Gliadin

(Theoretische Masse: 33969.3 Da / Gemessene Masse: 33971.1 Da)

10 20 30 40 50
 MKTFLILALL AIVATTATTÄ VRVPVPQPQP QNPSQPQPQR QVPLVQQQQF

60 70 80 90 100
 PGQQQQFPPQ QPYPQPQFP SQQPYLQLQP FPQPQFPFPQ LPYPQPPPFQ

110 120 130 140 150
 PQQPYPQPQP QYPQPQQPIS QQAQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQILPQILQQ

160 170 180 190 200
 QLIPCRDVVL QQHNIHARS QVLQQSTYQP LQQLCCQQLW QIPEQSRCQA

210 220 230 240 250
 IHNVVHAIL HQQQQQQQPS SQVSLQQPQQ QYPSGQGFQ PSQQNPQAQG

260 270 280 290 296
 SVQPQQLPQF EEIRNLALQT LPRMCNVYIP PYCSTTTAPF GIFGTN

Q41543 : γ -Gliadin

(Theoretische Masse: 31851.3 Da / Gemessene Masse: 31843.2 Da)

10 20 30 40 50
 NIQVDPSPGQV QWPQQQPFQ PHQPFSQQPQ QTFPQPQQT FPHQPQQQFSQ

60 70 80 90 100
 PQQPQQQFIQ PQQPFPQQPQ QTYPQRPPQP FPQTQQPQQP FPQSQQPQQP

110 120 130 140 150
 FPQPQQQFPQ PQQPQQSFPQ QQPSLIQQSL QQQLNPCKNF LLQCKPVS L

160 170 180 190 200
 VSSLWSMILP RSDCQVMRQQ CCQQLAQIPQ QLQCAIHSI VHSIIMQQEQ

210 220 230 240 250
 QEQRQGVQIL VPLSQQQQVG QGTLVQGGI IQPQQPAQLE VIRSSVLQTL

260 270 279
 ATMCNVYVPP YCSTIRAPFA SIVAGIGGQ

P18573 : α/β -Gliadin

(Theoretische Masse: 33284.2 Da / Gemessene Masse: 33278.9 Da)

10 20 30 40 50
 VRVPVPQLQ PQNPSQQQPQ EQVPLVQQQ FPGQQQPFPP QQPYPQPQP

60 70 80 90 100
 PSQQPYLQLQ PFPQPQLPYP QPQLPYPQPQ LPYPQPQPFR PQQPYPQSQP

110 120 130 140 150
 QYSQPQQPIS QQQQQQQQQQ QKQQQQQQQ QILQQILQQQ LIPCRDVVLQ

160 170 180 190 200
 QHSIAYGSSQ VLQQSTYQLV QQLCCQQLWQ IPEQSRCQAI HNVVHAILH

210 220 230 240 250
 QQQQQQQQQQ QQLSQVSFQ QPQQQYPSGQ GSFQPSQQNP QAQGSVQPQQ

260 270 280 288
 LPQFEEIRNL ALETLPAMCN VYIPPYCTIA PVGIFGTN

Q9M4M3 : α/β -Gliadin (Precursor)

(Theoretische Masse: 30625.2 Da / Gemessene Masse: 30616.1 Da)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>
MVRVPVQLQ	PQNPSQQQPQ	EQVPLMQQQQ	QFPGQQEQFP	PQQPYPHQQP
<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>
FPSQQPYQP	QPFPPQLPYP	QTQPFPPQQP	YPQPQPQYPQ	PQQPISQQQA
<u>110</u>	<u>120</u>	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>
QQQQQQQQIL	QQILQQQLIP	CRDVVLQQHN	IAHASSQVLQ	QSSYQQLQQL
<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>	<u>190</u>	<u>200</u>
CCQQLFQIPE	QSRCQAIHNV	VHAILHHHQ	QQQQQPSSQV	SYQQPQEQYP
<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>
SGQGSFQSSQ	QNPQAQGSVQ	PQQLPQFQEI	RNLALQTLPA	MCNVYIPPYC
<u>260</u>	<u>265</u>			
STTIAPFGIF	GTNYR			

Q9M4L7 : α/β -Gliadin

(Theoretische Masse: 31292.3 Da / Gemessene Masse: 31299.5 Da)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>
MVRVPVQLQ	PQNPSQQQPQ	EQVPLVQQQQ	FLGQQQPFPP	QQPYQPQPFP
<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>
PSQLPYLQLQ	PFPQPQLPYS	QPQPFRPQQP	YPQPQPQYSQ	PQQPISQQQQ
<u>110</u>	<u>120</u>	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>
QQQQQQQQQQ	QQQILQQIL	QQQLIPCMDV	VLQQHNIAHG	RSQVLQQSTY
<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>	<u>190</u>	<u>200</u>
QLLQELCCQH	LWQIPEQSQC	QAIHNVVHAI	ILHQQQKQQQ	QPSSQVSFQQ
<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>
PLQQYPLGQG	SFRPSQQNPQ	AQGSVQPQQL	PQFEEIRNLA	LQTLPAMCNV
<u>260</u>	<u>269</u>			
YIPPYCTIAP	FGIFGTNYR			

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Peptischer Verdau <u>mit</u> Reduktion]		
Q0QBR3	LMW-glutenin P3-5 - Triticum aestivum (Wheat).	7-8
Q41552	Low molecular weight glutenin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	7
Q18NR2	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	6
Q5PU41	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Thinopyrum ponticum x Triticum aestivum.	5
Q0GQX1	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	5
Q0NGG1	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	5
Q5MFQ0	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	5
O22108	LMM glutenin 1 (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q2V724	LMW glutenin subunit t128 - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) (Aegilops squarrosa).	4
Q6QGV8	LMW glutenin pGM107 - Triticum aestivum (Wheat).	4-5
Q7Y074	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum subsp. tibeticum.	4
P93790	Low-molecular-weight glutenin storage protein - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q0GNF9	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q68VI0	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum turgidum (Poulard wheat)	4
Q6J160	S-type low molecular weight glutenin L4-55 (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q8W3W3	Low-molecular-weight glutenin subunit group 4 type II - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q0ZCA8	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q9M6P7	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q94G96	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q94G97	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q6SPZ0	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q2V724	LMW glutenin subunit t128 - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) (Aegilops squarrosa).	3
Q52NZ5	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q52NZ5	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q571Q5	Putative LMW-glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q3LGB7	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q3YB18	LMW-glutenin G177-6 - Thinopyrum ponticum x Triticum aestivum.	3
Q41550	Low molecular weight glutenin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q52NZ3	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q52NZ4	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q308Q7	Alpha-gliadin - Triticum aestivum subsp. spelta.	3
P04725	Alpha/beta-gliadin A-V - Triticum aestivum (Wheat).	3
P04727	Alpha/beta-gliadin clone PW8142 - Triticum aestivum (Wheat).	3

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Peptischer Verdau <u>mit</u> Reduktion]		
P04725	Alpha/beta-gliadin A-V - Triticum aestivum (Wheat).	3
P04727	Alpha/beta-gliadin clone PW8142 - Triticum aestivum (Wheat).	
Q2QL53	Alpha-gliadin storage protein (Fragment) - Aegilops speltoides (Goatgrass).	3
Q2QL55	Alpha-gliadin storage protein (Fragment) - Aegilops speltoides (Goatgrass).	
Q5MB97	Low-molecular-weight glutenin subunit - Aegilops triuncialis.	3
Q5MB98	Low-molecular-weight glutenin subunit - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) (Aegilops squarrosa).	
A2IBJ9	LMW-m1 glutenin subunit - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.	3
Q2PQJ7	Low molecular weight glutenin subunit LMW-Di31 - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.	3
Q6J162	S-type low molecular weight glutenin L4-292 (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q84NE2	GLU-A3-2 - Triticum monococcum (Einkorn wheat) (Small spelt).	3
Q84U12	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum/Thinopyrum intermedium alien addition line.	3
P18573	Alpha/beta-gliadin MM1 - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q94G92	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q9M6P7	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q9FEG9	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum subsp. macha.	
Q6EEW8	Gamma gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
Q9FEA8	Gamma-gliadin (Fragment) - Aegilops bicornis (Spach goatgrass).	
Q9FUA0	Gamma-gliadin (Fragment) - Aegilops longissima (Goatgrass).	
Q1W676	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q3LGB3	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q5TLY9	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	
Q0ZCA8	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q41551	Low molecular weight glutenin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	
A2IBV6	Glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2-6
A2IBJ7	LMW-m1 glutenin subunit - Aegilops longissima (Goatgrass).	2
Q75ZV9	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2-5
Q8GU18	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q8W3V9	Low-molecular-weight glutenin subunit group 6 type IV - Triticum aestivum (Wheat).	2
A2IBJ4	LMW-m1 glutenin subunit - Aegilops geniculata.	2
A2IBK0	LMW-m1 glutenin subunit - Triticum zhukovskiyi.	2
Q1ZZT4	Low-molecular-weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q3LGB6	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q7DM83	Low-molecular-weight glutenin storage protein (Fragment) - Triticum aestivum	2

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Peptischer Verdau <u>mit</u> Reduktion]		
Q5MFP7	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q5MFP8	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	
Q5MFQ5	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	
Q5MGR3	Low molecular weight glutenin subunit - Secale sylvestre.	
Q84U13	Low-molecular-weight glutenin subunit - Triticum aestivum/Thinopyrum intermedium alien addition line.	
Q5MB97	Low-molecular-weight glutenin subunit - Aegilops triuncialis.	2-4
Q5XM79	Low-molecular-weight glutenin - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.	2
Q7Y075	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum subsp. tibeticum.	2
Q38L52	Low molecular weight glutenin subunit Y22 - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.	2
Q38L53	Low molecular weight glutenin subunit Y13 - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.	
Q8W3V0	Low-molecular-weight glutenin subunit group 12 type VI - Triticum aestivum (Wheat).	
Q2L990	Low molecular weight glutenin subunit LMW-M5 - Triticum monococcum (Einkorn wheat) (Small spelt).	2
Q2PQJ6	Low molecular weight glutenin subunit LMW-M1 - Triticum monococcum (Einkorn wheat) (Small spelt).	2
Q2PQJ8	Low molecular weight glutenin subunit LMW-B8 - Triticum monococcum subsp. aegilopoides.	
Q308Q5	Low molecular weight glutenin - Triticum monococcum subsp. aegilopoides.	
Q8W3V1	Low-molecular-weight glutenin subunit group 11 type VI - Triticum aestivum	
Q84U14	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum aestivum/Thinopyrum intermedium alien addition line.	2
Q40021	B1 hordein - Hordeum vulgare (Barley).	2
Q38L52	Low molecular weight glutenin subunit Y22 - Triticum turgidum subsp. dicoccoides.	2
P04722	Alpha/beta-gliadin A-II - Triticum aestivum (Wheat).	2
P04722	Alpha/beta-gliadin A-II - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q41632	Alpha/beta-type gliadin - Triticum urartu.	
P18573	Alpha/beta-gliadin MM1 - Triticum aestivum (Wheat).	
Q6SPY8	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	2
P06659	Gamma-gliadin B - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q94G92	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
Q6EEW3	Gamma gliadin - Triticum turgidum subsp. durum (durum wheat).	
Q6EEW5	Gamma gliadin - Triticum turgidum subsp. durum (durum wheat).	
Q6DLC7	Omega gliadin - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) (Aegilops squarrosa).	2
Q94G94	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	2

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Peptischer Verdau <u>ohne</u> Reduktion]		
Q94G96	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q94G97	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
A2IBV6	Glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q18NR2	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q6QGV8	LMW glutenin pGM107 - Triticum aestivum (Wheat).	
P04722	Alpha/beta-gliadin A-II - Triticum aestivum (Wheat).	2
P18573	Alpha/beta-gliadin MM1 - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q6DLC7	Omega gliadin - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) (Aegilops squarrosa).	2
Q9FUW7	Omega gliadin storage protein - Triticum aestivum (Wheat).	
Q5PU41	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Thinopyrum ponticum x Triticum aestivum.	2
Q6IZ85	High molecular weight glutenin subunit 1Sx-3.0b - Aegilops bicornis (Spach goatgrass).	2

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Chymotryptischer Verdau <u>mit</u> Reduktion]		
Q94G96	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	6
Q94G97	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
Q94G94	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	5
Q9ZP09	Alpha-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum var. arduini.	5-8
Q571R2	Putative omega-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	5
Q9M6P7	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	4-5
Q45R38	HMW glutenin x-type subunit Bx7 - Triticum aestivum (Wheat).	4
P06659	Gamma-gliadin B - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q1W676	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q6EEW3	Gamma gliadin - Triticum turgidum subsp. durum (durum wheat).	4
P06659	Gamma-gliadin B - Triticum aestivum (Wheat).	
Q6EEW5	Gamma gliadin - Triticum turgidum subsp. durum (durum wheat).	
Q94G92	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
P04722	Alpha/beta-gliadin A-II - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q41632	Alpha/beta-type gliadin - Triticum urartu.	4
Q94G96	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	6
Q94G97	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
P18573	Alpha/beta-gliadin MM1 - Triticum aestivum (Wheat).	4-6
Q9ZP09	Alpha-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum var. arduini.	
Q7Y0S6	HMW-glutenin - Taeniatherum caput-medusae var. crinitum.	4
Q0Q5D2	X-type HMW glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	4
Q599I0	HMW subunit of glutenin 1Dx2.2* (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	
Q8GV12	HMW glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	
Q9FEG9	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum subsp. macha.	3
Q6EEW8	Gamma gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
Q9FEA8	Gamma-gliadin (Fragment) - Aegilops bicornis (Spach goatgrass).	3
Q03872	High molecular weight glutenin subunit 1Ax1 - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q8H0L1	HMW glutenin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	
P06659	Gamma-gliadin B - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q6EEX0	Gamma gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	
P18573	Alpha/beta-gliadin MM1 - Triticum aestivum (Wheat).	3-7
P93790	Low-molecular-weight glutenin storage protein - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q52NZ4	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	3
Q94G92	Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).	3
A2IBJ7	LMW-m1 glutenin subunit - Aegilops longissima (Goatgrass).	3
Q5MFQ0	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	3

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Chymotryptischer Verdau <u>mit</u> Reduktion]		
Q0Q2J0	Low molecular weight glutenin subunit - <i>Triticum turgidum</i> (Poulard wheat) (Rivet wheat).	3
A2IBV5	Glutenin subunit - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	3
Q18NR2	Low molecular weight glutenin subunit - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	3
Q0Q5D2	X-type HMW glutenin - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	3-4
Q18MZ6	High-molecular-weight glutenin subunit Bx17 - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	3
Q6SLL6	HMW glutenin subunit x - <i>Aegilops comosa</i> (Goatgrass).	3
Q9FEG9	Gamma-gliadin (Fragment) - <i>Triticum aestivum</i> subsp. macha.	2
Q9FUA0	Gamma-gliadin (Fragment) - <i>Aegilops longissima</i> (Goatgrass).	
Q2YPK4	Gliadin, alpha/beta:ATP-binding region, ATPase-like:Bacterial sensor protein, C-terminal:Histidine kinase - <i>Brucella abortus</i> (strain 2308).	2
Q03872	High molecular weight glutenin subunit 1Ax1 - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	2-3
Q7X6V6	High-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	2
Q8H0L4	Glutenin high molecular weight subunit (Fragment) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
Q6DLC7	Omega gliadin - <i>Aegilops tauschii</i> (Tausch's goatgrass) (<i>Aegilops squarrosa</i>).	2
Q9FUW7	Omega gliadin storage protein - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
Q308Q7	Alpha-gliadin - <i>Triticum aestivum</i> subsp. spelta.	2
P04727	Alpha/beta-gliadin clone PW8142 - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	2
P04722	Alpha/beta-gliadin A-II - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
P04725	Alpha/beta-gliadin A-V - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	2-3
Q0GNG1	Low molecular weight glutenin - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	2
Q0QBR3	LMW-glutenin P3-5 - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
Q2V724	LMW glutenin subunit t128 - <i>Aegilops tauschii</i> (Tausch's goatgrass) (<i>Aegilops squarrosa</i>).	2
Q571Q5	Putative LMW-glutenin subunit - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	2
Q5MB97	Low-molecular-weight glutenin subunit - <i>Aegilops triuncialis</i> .	2
Q5MFP7	Low molecular weight glutenin - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
Q5MFP8	Low molecular weight glutenin - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
Q5MFQ5	Low molecular weight glutenin - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
Q5MGR3	Low molecular weight glutenin subunit - <i>Secale sylvestre</i> .	
Q5MB98	Low-molecular-weight glutenin subunit - <i>Aegilops tauschii</i> (Tausch's goatgrass)	
Q3LGB5	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	2
Q3LGB6	Low-molecular-weight glutenin subunit (Fragment) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
Q41550	Low molecular weight glutenin (Fragment) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat).	
P17990	Gamma-hordein-1 - <i>Hordeum vulgare</i> (Barley).	2
Q70IB4	Putative gamma 2 hordein (Fragment) - <i>Hordeum vulgare</i> (Barley).	

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Chymotryptischer Verdau <u>mit</u> Reduktion]		
Q5PU41	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Thinopyrum ponticum x Triticum aestivum.	2
P93790	Low-molecular-weight glutenin storage protein - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q7Y075	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum subsp. tibeticum.	
A2IBV5	Glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q75ZV9	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	
Q6QGV8	LMW glutenin pGM107 - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q75ZV9	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q9XGE9	Low molecular weight glutenin subunit (Fragment) - Triticum turgidum subsp. durum (durum wheat).	2
Q2QL54	Alpha-gliadin storage protein (Fragment) - Aegilops speltoides (Goatgrass).	2
Q0GNF9	Low molecular weight glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	2
A0MWD0	High molecular weight glutenin subunit - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass)	2
Q0Q5D2	X-type HMW glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	
Q6PMJ0	HMW glutenin subunit Dtx1.5+Dty10 - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) (Aegilops squarrosa).	
Q6IZ87	High molecular weight glutenin subunit 1Sx-2.5b - Aegilops bicornis (Spach goatgrass).	2
Q6IZ84	High molecular weight glutenin subunit 1Sy-2.5b - Aegilops bicornis (Spach goatgrass).	2
Q7XZT7	HMW y type glutenin (Fragment) - Taeniatherum caput-medusae var. crinitum.	2
Q0Q5D2	X-type HMW glutenin - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q1G7G3	X-type high-molecular-weight glutenin subunit - Thinopyrum junceum.	
Q38LF5	HMW glutenin protein Dx5 (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	
Q6PMI7	HMW glutenin subunit Dtx1.5 - Aegilops tauschii (Tausch's goatgrass) (Aegilops squarrosa).	
Q5RLZ0	HMW glutenin subunit (Fragment) - Crithopsis delileana.	2
Q6IZ90	High molecular weight glutenin subunit 1Ssy48586 - Aegilops searsii (Sears' goatgrass).	
Q2L990	Low molecular weight glutenin subunit LMW-M5 - Triticum monococcum (Einkorn wheat) (Small spelt).	2
Q84NE2	GLU-A3-2 - Triticum monococcum (Einkorn wheat) (Small spelt).	
Q2YKX5	Bacterial periplasmic spermidine/putrescine-binding protein:Gliadin,	2
Q2QL53	Alpha-gliadin storage protein (Fragment) - Aegilops speltoides (Goatgrass).	2
Q45R38	HMW glutenin x-type subunit Bx7 - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q6UJY5	HMW-glutenin Bx subunit - Triticum turgidum (Poulard wheat) (Rivet wheat).	
Q40055	C hordein - Hordeum vulgare (Barley).	2

Anhang-3

Repräsentativzugang der Cluster und Beschreibung, Zahl der Peptidtreffer [Chymotryptischer Verdau <u>ohne</u> Reduktion]		
Q9ZP09	Alpha-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum var. arduini.	2-3
P04725	Alpha/beta-gliadin A-V - Triticum aestivum (Wheat).	2
P18573	Alpha/beta-gliadin MM1 - Triticum aestivum (Wheat).	
P04722	Alpha/beta-gliadin A-II - Triticum aestivum (Wheat).	
Q9ZP09	Alpha-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum var. arduini.	
Q9M6P7	Gamma-gliadin (Fragment) - Triticum aestivum (Wheat).	2
Q75ZV9	Low molecular weight glutenin subunit - Triticum aestivum (Wheat).	2
P06659	Gamma-gliadin B - Triticum aestivum (Wheat).	2
A0S866	High-molecular-weight glutenin subunit - Thinopyrum intermedium.	2
Q1G7G2	Y-type high-molecular-weight glutenin subunit - Thinopyrum junceum.	
Q7Y0K3	Y-type HMW glutenin subunit Ee1.5 - Lophopyrum elongatum (Tall wheatgrass) (Argopyrum elongatum).	

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q6J161	8	LQPHQIAQL* PQQPPFSQHQQPVL+ PQQPPFSQQQQPQF+ PQQPPFSQQQQQPIL+ SQQQQPFPQQQQPLL+, PQQQQPL+ PQQQIPYVQPSIL+ PILPQQPPFSQQQQPQF+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q0QBR3 Q8W3X6	7	LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQPQF+ PQQPPFSQQQQQPIL+ SQQQQPFPQQQQPLL+ PQQQQPL+ PQQQIPYVQPSIL+ PILPQQPPFSQQQQPQF+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q6J6V0	7	LQPHQIAQL* PQQPPFSQHQQPVL+ PQQPPFSQQQQPQF+ SQQQQPFPQQQQPLL+ PQQQQPL+ PQQQIPYVQPSIL+ PILPQQPPFSQQQQPQF+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q41552	7	PQQPPFSQQQQPQF+ PQQPPFSQQQQQPIL+ SQQQQPFPQQQQPLL+ PQQQQPL+ PQQQIPYVQPSIL+ PILPQQPPFSQQQQPQF+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q18NR2 Q75ZV8	6	PQQPSF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQQPIL+ AQGTFLQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQQPILPQQPSF+ PQQQIPFVHPSIL+ SQQQLPPFSQQQPPFSQQQPVL+ VLPQQQIPFVHPSIL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q5MFN4	6	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQLFPQQPSF YRTTTSVPFGVGTGVGSY+ VQQQIPFVHPSIL SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q2V722	5	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVQPSIL+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+ YRTTTSVPFGVGTGVGSY+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q5MFM5	5	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* MKTCL PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q5PU41	5	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQMAHL PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL* SQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q6QGV8	5	PQQPSF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQQPVL+ AQGTFLQPHQIAQL* PQQQIPFVHPSIL+ SQQQLPPFSQQQPPFSQQQQPVL+ VLPQQQIPFVHPSIL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q8W3X3	5	PQQPSF* LQPHQIAQL* SQQQQQVLPQQQIPF PQQPPFSQQQLPPF+ AQGTFLQPHQIAQL* PQQQIPFVHPSIL+ VLPQQQIPFVHPSIL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q0GQX1	5	PQQSPF* LQPHQISQL+ PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL* QQLGQQPQQQQIPQGIF+ VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q0GNG1	5	LQPHQIAQL* PQQPPFSQHQQPVL+ SQQQQPFPQQQPLL+ PQQQQPL+ PQQQIPYVQPSIL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q5MFQ0	5	LQPHQIAQL* QQQPPFL+ AQGTFLQPHQIAQL* YRTTTSVPFVGVTGVGSY+ PQQQIPFVHPSIL+ VLPQQQIPFVHPSIL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q30DX5	4	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL* PQQQQPL+ AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQQLFPQQPSF+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
P10386 P93791 P93793 P94021 Q0GNG0	4	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQPPFSQQQPIL+
O22108	4	PQQPSF* PQQSPF* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* SQQQQQLFPQQPSF+ SQQQPPFWQQPPFSQQQPIL+ PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+
P93792	4	PQQPSF* PQQSPF* VQPQQQPQQSGQGL SQQPPFSQQQPVL+ PQQSPFSQQQLVL+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL*
Q0GQX0 Q2V723 Q5MF12 Q5MF16 Q5MF19 Q5MFJ0 Q5MFJ4 Q5MFJ5 Q5MFJ6 Q5MFK1 Q5MFK2 Q5MFK3 Q5MFK6 Q5MFK7 Q5MFK9 Q5MFL2 Q5MFL4 Q5MFL6 Q5MFL7 Q5MFM1 Q5MFM6 Q5MFM7 5MFM9 Q5MFN1 Q5MFN2 Q5MFN5 Q5MFN6 Q6J6U8 Q6WZC3 Q8H0J5 Q8W3V2	4	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQPPFSQQQPIL+
Q8W3W4	4	PQQPSF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQPVL+ AQGTFLQPHQIAQL* YRTTTSVFPFGVAGVGAY+ SQQQLPPFSQQQPPFSQQQPVL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
A2IBV3	4	PQQSPF* SQQPPFSQQQPVL+ PQQSPFSQQQLVL+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL* PQQQQPL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
A2IBV6	3	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPSFSQQQQPVL SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+
A2IBV7	3	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+
Q0PW08	3	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q2V725 Q6QGV9	3	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQLVL+ AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+
Q52NZ5 Q52NZ6 Q5PU43	3	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* SQQPPFSQQQQPVL+ PQQSPFSQQQQLVL+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL*
Q571Q5	3	PQQPSF* LQPHQISQL+ QLGQQPQQQIPQGIF+ QLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q5MFK8	3	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q5MFN3	3	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* SQQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q8W3W7	3	PQQPSF* PQQSPF* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* SQQQLFPQQPSF+ VQQQIPVVQPSIL+
Q3LGB7 Q3YB18	3	PQQPSF* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* VQQQIPVVQPSIL+ SQQQPPFWQQPPFSQQQPIL+
Q3YB17	3	PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPVVQPSIL+ SQQPLF+
Q41550	3	PQQSPF* FPQQQPPFQQQPPF+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL* PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+
Q52NZ3	3	PQQSPF* LQPHQIAQL* FPQQQPPFQQQPPF+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPVVQPSIL+
Q52NZ4	3	PQQSPF* FPQQQPPFQQQPPF+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL* PQQQIPVQPSVL
Q5MFH4	3	PQQSPF* LQPHQIAQL* WQQQPPFSHQQPIL PQQPPFSQQQLVL+ AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPVVQPSIL+
P04723 Q308Q7 Q9M4M3 Q9M4M6	3	QQHNIAHASSQVL+ QEIRNLAL+ QQQLIPCRDVL+
P04725 P04727 Q1WA40 Q2V5Z7 Q41529 Q41545 Q41546	3	QQHNIAHASSQVL+ AEIRNLAL+ QQQLIPCRDVL+
Q2QL53 Q2QL55	3	QQHNIAHASSQVL+ EEIRNLAL+ QQQLIPCRDVL+
Q6SPZ0	3	EVMNSIAL LQPHQIAQL* THGAF+ QQQCIPVAMQRCL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q5MB97 Q5MB98 Q5MFQ1 Q5MFQ2 Q5MFQ4 Q5MFQ6 Q84U20 Q8W3W0 Q8W3W1	3	LQPHQISQL+ LQQPPFSQQQPVL+ QQLGQQPQQQIPQGIF+
A2IBJ9 A2IBK1 O49958	3	LQPHQIAQL* LQQPPFSQHQQPVL+ PQQQPL+ QQLNPCKVFLQQCSPVAMPQSL+
Q2PQJ7	3	LQPHQIAQL* QQQPFL+ LYHPAAATAAATTTTGF QQQPLF+
Q6J162	3	LQPHQIAQL* AQGTFLQPHQIAQL* PQQQIPFVHPSIL+ VLPQQQIPFVHPSIL+ QQLNPCKVFLQQCSPVAMPQSL+
Q84NE2	3	LQPHQIAQL* QQQPFL+ QQQPLF+ AVLALAAASAVAQISQQQQPPF
Q84U12	3	LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQTVL PQQPPFSQQQLVLL+ PQQPPFSQQQLVL+
P04724 Q306F8 Q306F9	3	EEIRNLAL+ QQQLIPCRDVVL+ QPQNPSQQQPQKQVPL+
Q94G92	3	LIQTIL VQGQGIQPQQAQL+ VQGQGIQ+
P08453 A1EHE7 Q6EEW8 Q8L6B2 Q8L6B3 Q8L6B4 Q8L6B5 Q9FEA8 Q9FEG9 Q9FS56 Q9FS57 Q9FS61 Q9FS62 Q9FS69 Q9FS73 Q9FS74 Q9FS75 Q9FS76 Q9FS77 Q9FUA0 Q9FUA1 Q9SYX8	3	VQGQGIQPQQAQL+ VQGQGIQ+ EAIRSLVL+
Q1W676	3	VQGQGIQPQQAQL+ QLVQGQGIQPQQAQL+ VQGQGIQ+
Q3LGB3 Q5TLY9	3	PQQPPFSQHQQPVL+ PQQPPFSQQQPLL+ QQLNPCKVFLQQCSPVAMPQSL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q0ZCB0 Q41551 Q5TLY8	3	LQQPPFSQHQQPVL+ PQQQQPL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
A2IBJ7	2	PQQPSF* SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL* LQQQIPVHPSIL+
Q5MFJ9	2	PQQPSF* PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPVVQPSIL+
Q75ZV9 Q8W3X2 Q8W3X4 Q9ZNY0	2	PQQPSF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLPPF+ AQGTFLQPHQIAQL* QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q8GU18	2	PQQPSF* LQPHQIAQL* AQGTFLQPHQIAQL* PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+ QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q8W3V8 Q8W3V9	2	PQQPSF* PQQSPF* SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL* PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+
A2IBJ4	2	PQQSPF* PQQSPFSQQQLVL+ PQQQQPL+
A2IBK0	2	PQQSPF* PQQSPFSQQQLVL+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL*
Q1ZZT4	2	PQQSPF* LQPHQIAQL* SQQPPFSQQQPVL+ PQQSPFSQQQLVL+ AQGTFLQPHQIAQL*
Q3LGB6	2	PQQSPF* FPQQQPPFPQQPPF+ SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL*
Q7DM83	2	PQQSPF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPVVQPSIL+
Q6J6U9	2	LQPHQISQL+ LQQPPFSQQQPVL+
Q5XM79	2	LQPHQIARL+ SQQPLF+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q5MFP7 Q5MFP8 Q5MFQ5 Q5MGR3 Q84U13	2	LQPHQISQL+ QQLGQQPQQQQIPQGIF+
Q7Y075	2	LQPHQIARL+ LQQPPFSQQQPVVL+
Q0PW11 Q38L53 Q6SPZ1 Q6SPZ2 Q6SPZ3 Q8W3U9 Q8W3V0	2	LQPHQIAQL* QQQPPFL+ QQQCIPVAMQRCL+
Q2L990 Q2PQJ5	2	LQPHQIAQL* QQQPPFL+ QQQQPLF+
Q2PQJ6 Q2PQJ8 Q308Q5 Q8W3V1	2	LQPHQIAQL* THGAF+ QQQCIPVAMQRCL+
Q84U14	2	LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQQLVLL+ PQQPPFSQQQQLVL+
Q40021	2	LQPHQIAQL* LQLQIPYVQPSIL ALLAIAATSTIAQQQPF+
Q22116	2	LQPHKIAQL QQQCIPVAMQRCL+
Q9M4M4	2	EAIRNLAL+ QQQLIPCRDVVL+
P04722 P04726 P18573 Q1WA39 Q2QL42 Q2QL43 Q2QL44 Q2QL45 Q2QL46 Q2QL47 Q2QL48 Q2QL49 Q2QL50 Q2QL51 Q2QL52 Q41632 Q9M4L6	2	EEIRNLAL+ QQQLIPCRDVVL+
P10385 Q6SPY8	2	QQQPPFL+ QQQCIPVAMQRCL+
P06659 Q41543 Q6EEW3 Q6EEW4 Q6EEW5 Q6EEW6 Q6EEW7 Q9M4L5	2	VQGQGIIQPQPAQL+ VQGQGIIQ+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q6DLC7	2	QPQQPLPQQPQQPFQQPQQQL SHQQQPF
Q94G94	2	PQQQQPL+ VQQGGIIQ+
Q6SLL8	1	EQEQQQL QPGQQQQGYPTSL*
Q19A59	1	GQQQLSGHGQQPGQWL
A2IBV5 Q0Q2J1 Q8W3X1	1	PQQPSF* LQPHQIAQL* PQQPPFSQQQLPPF+ AQGTFLQPHQIAQL*
Q41603	1	PQQPSF* PQQSPF* SQQQPIL* PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+
Q8H0J4 Q9FEQ1	1	PQQPSF* PQQSPF* SQQQPPFSQQQPIL+ SQQQPIL*
Q8W3V7	1	PQQPSF* PQQSPF* PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+
Q8W3W9	1	PQQPSF* LQPHQIAQL* AQGTFLQPHQIAQL* QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q8W3X0	1	PQQPSF* QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q30DX7	1	PQQSPF* LQPHQIAQL* AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPVVQPSIL+
Q41547	1	PQQSPF* PQQSPFSQQQQLVL+
Q3LGB5	1	PQQSPF* FPQQQPFPPQQQPPF+ SQQQPIL*
Q5PU42	1	PQQSPF* LQPHQIAQL* SQQQPIL* AQGTFLQPHQIAQL* PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+
Q8W3V6	1	PQQSPF* SQQQPIL* PPQQQQQLPQQQISIVQPSVLQQL+
Q670S1	1	PQQSPF* LQPHQIAQL* LQQQISFVQPSVL
Q7M1M9	1	IFPQCSQAPIAIL
Q30DX6	1	LQPHQIAQL* PQQQQPL+ AQGTFLQPHQIAQL*
A2IBJ8	1	LQPHQIAQL* PQQQQPL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
A2TN61	1	LQPHQIAQL* QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
P93794 Q19MN2 Q19MN3 Q19N55 Q38L52 Q5MFG8 Q5MFH0 Q5MFH3 Q6QGW0 Q6SPY7 Q6SPY9	1	LQPHQIAQL* QQQCIPVAMQRCL+
Q3YB21 Q5PU39 Q5XY01 Q693B2 Q6PKM2	1	LQPHQIAQL* QQQPPFL+
Q84U16	1	LQPHQIAQL* LQQPPFSQQQQPVL+
Q8W3W5 Q8W3W8	1	LQPHQIAQL* AQGTFLQPHQIAQL* QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPQSL+
Q8W3X5	1	LQPHQIAQL* PQQQIPSVQPSILQQLNPCKLF
P06470 Q2XQF0 Q3LTR1	1	LQPHQIAQL* ALLAIAATSTIAQQQPF+
Q40026	1	LQPHQIAQL* LQQQCSPVRMPQLIARL
Q40045 Q40054 Q84LE9	1	TTAEREINGNNIFL+
Q94IJ7 Q94IL5	1	AAVVVSL+
Q3S4V8 Q8H739	1	EAIRNLAL+
Q40215 Q7M1M4	1	LSPRGKEL+
Q4JK87	1	QCERELQESSLEARRL QPGQQGQGYPTSL*
Q226E3	1	NIPINPYLQPSIQQLSIIQQQPIL
A2IBV2	1	PQQPPFSQQQQLVL+ SQQQPIL*
Q2QL54 Q2QL56 Q2QL57	1	QQQLIPCRDWWL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
P02863 Q0GK30 Q27HK6 Q27HK7 Q2QL58 Q2QL59 Q2QL60 Q2QL61 Q2QL62 Q2QL63 Q2QL64 Q2QL65 Q2QL66 Q2QL67 Q2QL68 Q2QL69 Q2QL70 Q2QL71 Q2QL72 Q306G0 Q3S4V7 Q3YFI0 Q3YFI1 Q3YFI2 Q41509 Q41528 Q41530 Q41531 Q41533 Q53WW7 Q5NDA5 Q9M4L7 Q9M4L8 Q9M4L9 Q9M4M0 Q9M4M1 Q9M4M2 Q9M4M5 Q9ZP09	1	EEIRNLAL+
P08489 P10388 Q0GLF2 Q0PW13 Q0PW14 Q0Q5D2 Q1KL96 Q2PQK0 Q2PQK1 Q599I0 Q6IZ87 Q6IZ90 Q6PMJ1 Q6R2V1 Q8GV12 Q8LKV6 Q8S3T2 Q8S3T3	1	QQSGQGQPGYYPTSL+ QPGQGQGGYYPTSL*
Q18MZ6 Q1KL95 Q38LF5 Q42451 Q45R38 Q5I6T0 Q5XZE4 Q6IZ89 Q6Q7J1 Q6SLL6 Q6SLL9 Q93XR4	1	QQSGQGQPGYYPTSL+
A2F2Y0	1	NQAVTTL
Q40053 Q40055 Q41210	1	QPQQPFPQQPQQPL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q4JK87	1	QCERELQESSLEARRL QPGQGQQGYPTSL*
Q226E3	1	NIPINPYLQPSQIQQLSQQQPIL
A2IBV2	1	PQQPPFSQQQLVL+ SQQQPIL*
Q2QL54 Q2QL56 Q2QL57	1	QQQLIPCRDVL+
Q94G98 Q9FS58 Q9FS59 A2IBJ5 A2IBJ6	1	PQQQQPL+
P21292 Q41602 Q84M19 Q94G90 Q94G93 Q94G95	1	AQGLGIQPQQPAQL+
Q2YPK4	1	RANIRTF
Q30DX2	1	QQPMCF
P08079 Q6EEW2 Q6EEX0 Q6EEX1	1	VQGQGIQ+
Q571R2	1	QPQQPFPQQPQQPFPL
Q4UIG0	1	YPRPGFKITLVNYRNEL
Q6EEY9 Q6EEZ0 Q6EEZ1	1	PQQQAQSF+
Q5MFH2 Q9FEQ2	1	QQQCIPVAMQRCL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (ohne Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q94G96 Q94G97	2	VQGGQIIQPQQPAQL+ ILTIIAVAL+
Q0GQX0 Q2V722 Q2V723 Q5MFI2 Q5MFI6 Q5MFI9 Q5MFJ0 Q5MFJ4 Q5MFJ5 Q5MFJ6 Q5MFK1 Q5MFK2 Q5MFK3 Q5MFK6 Q5MFK7 Q5MFK8 Q5MFK9 Q5MFL2 Q5MFL4 Q5MFL6 Q5MFL7 Q5MFM1 Q5MFM5 Q5MFM6 Q5MFM7 Q5MFM9 Q5MFN1 Q5MFN2 Q5MFN5 Q5MFN6 Q6J6U8 Q6WZC3 Q8H0J5 Q8W3V2	2	AQGTFLQPHQIAQL* SQQQLFPQQPSF+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q18NR2 Q6QGV8 Q75ZV8	2	AQGTFLQPHQIAQL* SQQQLPPFSQQQPPFSQQQPVL+ PQQQIPFVHPSIL+
Q5MFN4	2	AQGTFLQPHQIAQL* VQQQIPFVHPSIL SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
P04722	2	QPFPQPQL+ IPCRDVVLQQHNIAHGSSQVLQESTYQL+
P18573 Q1WA39 Q9M4L6	2	QPFPQPQL+ IPCRDVVLQQHSIAYGSSQVLQQSTYQL+
Q6DLC7 Q9FUW7	2	QPFPQPQL+ PQQPQQPFPLQPQQPFQPPQPPF+
Q5PU41	2	SQQQLFPQQPSF+ SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q2QL46 Q2QL48	2	PPQQPYQPQPPFSQQPYLQLRPF+ IPCRDVVLQQHNIAHGSSQVLQQSTYQL+
Q6IZ85	2	QQSGQGQSGYYPTSPKQPGQEQQPGQL GQQQQGYPTSLQQSGGQPGYYPTSPL
Q0GNG1	1	SQQQPPFSQQQPPFSQQELPVL
Q571R3 P17990	1	PQQPQQPFQSQQQCL+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (ohne Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
P08453 P06659 A1EHE7 Q1W676 Q41543 Q6EEW3 Q6EEW4 Q6EEW5 Q6EEW6 Q6EEW7 Q6EEW8 Q6EEW9 Q8L6B2 Q8L6B3 Q8L6B4 Q8L6B5 Q94G91 Q94G92 Q9FEA8 Q9FEG9 Q9FS56 Q9FS57 Q9FS61 Q9FS62 Q9FS69 Q9FS73 Q9FS74 Q9FS75 Q9FS76 Q9FS77 Q9FUA0 Q9FUA1 Q9M4L5 Q9M6P7 Q9SYX8	1	VQGGQIIPQQPAQL+
Q30DX5 P10386 P93791 P93793 P94021 Q0GNG0 Q0PW08	1	AQGTFLQPHQIAQL* SQQQPPFWQQQPPFSQQQPIL+
Q0GNF9 Q5MFQ0 Q6J160 Q6J162 Q8W3W3 8W3X3	1	AQGTFLQPHQIAQL* PQQQIPFVHPSIL+
Q2V725 Q5MFN3 Q6QGV9	1	AQGTFLQPHQIAQL* SQQQLFPQQPSF+
Q8W3W4	1	AQGTFLQPHQIAQL* SQQQLPPFSQQQPPFSQQQPVL+
A2F2Y0	1	NQAVTTL
Q9FS59	1	PQPQPFSSQQPRQAF
Q571R2 P17991	1	PQQPQQPFPLQPQQPFPPQQPQQPF+
Q4UIG0	1	YPRPGFKITLVNYRNNEL
Q09097	1	VQQQQPFVQQQEPF
Q8W3W7	1	SQQQLFPQQPSF+

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (ohne Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
P02863 P04724 Q0GK30 Q27HK6 Q27HK7 Q2QL42 Q2QL43 Q2QL44 Q2QL45 Q2QL47 Q2QL49 Q2QL50 Q2QL51 Q2QL52 Q2QL58 Q2QL59 Q2QL60 Q2QL61 Q2QL62 Q2QL63 Q2QL64 Q2QL65 Q2QL66 Q2QL67 Q2QL68 Q2QL69 Q2QL70 Q2QL71 Q2QL72 Q2V5Z6 Q306F8 Q306F9 Q306G0 Q3S4V7 Q3S4V8 Q3YFI0 Q3YFI1 Q3YFI2 Q41528 Q41531 Q41533 Q53WW7 Q5NDA5 Q9M4L7 Q9M4L8 Q9M4L9 Q9M4M0 Q9M4M1 Q9M4M2 Q9M4M5 Q9ZP09	1	QPFPQPQL+
O22108 Q0GQX1 Q3LGB7 Q3YB18	1	SQQQPPFWQQPPFSQQQPIL+
P93790 Q0PW10 Q5MFN7 Q5MFN8 Q670Q4 Q8W3V3 Q8W3V4	1	SQQQQTVLPQQPAFSQQQHQQQL+
Q226E3	1	AKLYKELNNNQGMVIDINAQPQF
Q30DX8 Q94G98	1	ILTIIAVAL+
Q8S3V8	1	AQGQQGQQPAQGQQGQQLGQQGQQQL
Q40053	1	FPQYQIPTPLQPQQPFPQQPQQPL

Anhang-4

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch peptischen Verdau (ohne Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q42465 Q8GVK5 Q8GVK7 Q8GVK9	1	ALLAIAACSATAQFDVL+
Q9M4M4	1	IPCRDVWLQQHNIAHGSSQVLQESTYQL+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q3YFI0	8	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ QTLPAMCNVYIPPYCSTTIAPSGIFGTNY QPQQLPQFEEIRNL+
Q27HK7 Q306G0 Q3S4V7 Q3YFI2 Q41533 Q9ZP09	7	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q9M4L6	7	GIFGTN+ IPPYCTIAPVGIFGTNYR LQLQPF+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q9M4L9	7	GIFGTN+ LQLQPF+ QPQDPSQQQPQEQVPL VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q9M4M0 Q9M4M1 Q9M4M2	7	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ LQLQPFPPQPQLSY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q94G96 Q94G97	6	EVIRSL+ ASIVADIGGQ+ VQGGGIIQPQQAQL+ EVIRSLVL+ NIQVDPGQVQW+ QLVQGGGIIQPQQAQL+
P18573 Q1WA39 Q9M4L7	6	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q3YFI1 Q5NDA5 Q9M4M5	6	GIFGTN+ LQLQPF+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q41509	6	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ QPQQLPQFEEIRNL+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q41528	6	GIFGTN+ LQLQPF+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFSQLPYL QPQQLPQFEEIRNL+
Q2QL42	6	LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ QPFPPQPQLPYTHPQLPYQPQP LQLQPFPPQPQLPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
P08453 Q94G91 Q9M6P7	5	EAIRSL+ ASIVAGIGGQ+ VQGQGIQPQQPAQL+ NIQVDPGSGVQW+ LQQQLVPLQQLPL+
Q94G94	5	EVIRSL+ ASIVAGISGQ VQGQGIQPQQPAQY EVIRSLVL+ RQPQQPF
P02863 Q27HK6 Q41531 Q53WW7 Q9M4L8	5	GIFGTN+ LQLQPF+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q0GK30	5	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+ LQLQPFPPQPQLPY+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+
Q2V5Z6	5	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+ LQLQPFPPQPQLPY+ IGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY
Q41530	5	GIFGTN+ LQLQPF+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q571R2	5	LLSQQPF SLQPQQPF+ HQQPEQIISQQPQQPF IIPQQPQQPF+ LSPSDQQL
P04721	5	LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q2QL43 Q2QL44 Q2QL45 Q2QL47 Q2QL49 Q2QL51 Q2QL52	5	LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ QPQQLPQFEEIRNL+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q2QL63	5	LQLQPF+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSPQPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q6EEW9	4	EAIRSL+ ASIVAGIGGQ+ VQGQGIQPQQPAQL+ LQQQLVPQLQQPL+
Q6UKZ5 Q8RVX0	4	EAYQQVVDQQL+ VVALMAL+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+ HVS AEYQAARLKVAKAQQQL+
P06659	4	EVIRSL+ ASIVASIGGQ VQGQGIQPQQPAQL+ EVIRSLVL+
Q1W676	4	EVIRSL+ VQGQGIQPQQPAQL+ EVIRSLVL+ QLVQGQGIQPQQPAQL+
Q6EEW3 Q6EEW4 Q6EEW5 Q6EEW6 Q6EEW7 Q94G92 Q9M4L5	4	EVIRSL+ ASIVAGIGGQ+ VQGQGIQPQQPAQL+ EVIRSLVL+
Q2QL46 Q2QL48	4	HQQQQQPL+ VRVPVPLQPQNPSQQQPQEQVPL+ VQPQQLPQFEEIRNL+ QPQQLPQFEEIRNL+
P04722	4	GIFGTN+ LQLQPF+ LQLQPFPPQPQLPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
P04726 Q41632	4	GIFGTN+ LQLQPF+ VQPQQLPQFEEIRNL+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q3S4V8	4	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVPLQPQNPSQQQPQEQVPL+ LQLQPFPPQPQLPY+
Q7Y0S6	4	YPTSPQQPGQEQQPGQW YYPTSPQQSGGQQQPGQW+ YLTPSQQLGGQQPRQW+ YPTSPQQPGQLQQP+
P08489 Q0PW13 Q59910 Q8GV12 Q8LKV6	4	YYPTSPQESGQQQPGQW+ YYPTSPQQSGGQQQPGQW+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+ QQPAQQQPGGQQGRQPGQQPGYYPTSSQL+
P10388	4	YYPTSPQESGQQQPGQW+ YYPTSPQQSGGQQQPGQW+ YPTSPQQPPGGQQL WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q2QL50 Q2QL58 Q2QL59 Q2QL60 Q2QL61 Q2QL62 Q2QL64 Q2QL65 Q2QL66 Q2QL67 Q2QL68 Q2QL69 Q2QL70 Q2QL71 Q2QL72	4	LQLQPF+ VQPQQLPQFEEIRNL+ LQLQPFPPQPQLPY+ QPQQLPQFEEIRNL+
A1EHE7 Q6EEW8 Q8L6B2 Q8L6B3 Q8L6B4 Q8L6B5 Q9SYX8	3	EAIRSL+ VQGQGIQPQQPAQL+ VPPECSIIKAPFSSVAGIGGQ+
Q9FEA8 Q9FUA1	3	EAIRSL+ TQQQPVPLPQQPF+ VQGQGIQPQQPAQL+
Q03872 Q41553 Q93XJ8	3	EGGDALL+ YYPTSPQQSGGQQPGQW+ YLTSPQQLGGGQQPRQW+ WGIPALL*
Q19AE4 Q8H0L1	3	EGGDALL+ YYPTSPQQSGGQQPGQW+ YLTSPQQLGGGQQPRQW+
Q6EEW2 Q6EEX0 Q6EEX1	3	EVIRSL+ ASIVAGIGGQ+ EVIRSLVL+
P04724 Q306F8 Q306F9	3	GIFGTN+ VQPQQLPQFEEIRNL+ QPQQLPQFEEIRNL+
Q1WA40 Q2V5Z7	3	GIFGTN+ LQLQPF+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+
Q5MFN8	3	GQCFF+ ARSQMW+ QQQCSPVAMPQHLARSQMW+
Q52NZ4	3	AVGTGVSAY SQQQPSF+ ARSQMW+
Q41543	3	ASIVAGIGGQ+ VQGQGIQPQQPAQL+ NIQVDPSPGQVQW+
A2IBJ7	3	QEHQQGF+ ARSQMW+ GQQPQQQVLQSTFL EAIRAIY*
Q5MFQ0	3	SQQQQIVL QQQPPFLQQQPSLPQQPPFSQQQQQL EAIRAIY* VLPQQQIPF+
Q0Q2J0	3	LQQQSVL SQQQLPPF+ SHIPGLERPSQQQPLPPQQL+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q0Q2J1	3	SQQQLPPF+ SHIPGLERPSQQQPLPPQQL+ SQQQLPPFLQQQQPPF+
Q18NR2 Q75ZV8	3	SQQQLPPF+ SHIPGLERPSQQQPLPPQQL+ EAIRAIY* VLPQQQIPF+
Q0PW14 Q1KL94 Q2PQK0 Q2PQK1 Q6PMJ1 Q6R2V1 Q8S3T2 Q8S3T3	3	YYPTSPQESGQQQPGQW+ YYPTSPQQSGQQQPGQW+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+
Q18MZ6	3	YYPTSPQQSGQQQPGQW+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+ HVSAEYQAARLKVAKAQQQL+
Q1KL96	3	YYPTSPQQSGQQQPGQW+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+ QQPAQQQQPGQQGQRQPGQQGQPGYYPTSSQL+
Q6SLL6	3	YYPTSPQQSGQQQPGQW+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+ QQQIVPKGGSFYGETTPPQQL
Q9FEG9 Q9FS56 Q9FS57 Q9FS61 Q9FS62 Q9FS69 Q9FS73 Q9FS74 Q9FS75 Q9FS76 Q9FS77 Q9FUA0	2	EAIRSL+ VQGQGIQPPAQL+
Q2YPK4	2	LNLTDL AIIPLIVAILTITAF
A0MZ38	2	EGGDALL+ YLTSPQQLGQQQPRQW+
Q7X6V6 Q7XAI0 Q7XAI1 Q8H0L4	2	EAYQQVVDQQL+ VVALMAL+ WGIPALL*
Q6DLC7 Q9FUW7	2	GSSLTSIGGQ+ QSPQQSF+
P04723 Q308Q7 Q9M4M3 Q9M4M6	2	GIFGTN+ VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+
P04727 Q41529 Q41546 Q9M4M4	2	GIFGTN+ LQLQPF+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q0GNG1 Q0QBR3	2	GQCFF+ QQILW+
Q5MFP1	2	GQCFF+ SQQQLVL* ARSQMW+ EAIRAIY*
Q571Q5	2	SIGTGVGGY+ SQQQLPPF+
Q5MB97 Q5MFP7 Q5MFP8 Q5MFQ1 Q5MFQ2 Q5MFQ5 Q5MFQ6 Q5MGR3 Q6J6U9 Q8W3W0 Q8W3W1 Q8W3W2	2	SIGTGVGGY+ ARSQMW+
Q3LGB5 Q3LGB6 Q41550	2	SQQQPSF+ ARSQMW+
Q571R3 P17990 Q70IB4	2	VGVTGVGGQ+ VQGGVVQPQLAQMEAIRTLVL+
Q5PU41	2	QEHQQGF+ SQQQLVL* ARSQMW+ EAIRAIY*
P93790 Q0PW10 Q5MFN7 Q5PU45 Q670Q4 Q7Y075 Q8W3V3 Q8W3V4	2	ARSQMW+ QQQCSPVAMPQHLARSQMW+
A2IBV5 Q75ZV9 Q8W3W9 Q8W3X0 Q8W3X1 Q8W3X4 Q9XGF0 Q9ZNY0	2	SQQQLPPF+ SHIPGLERPSQQQLPPQQL+
Q6QGV8	2	SQQQLPPF+ EAIRAIY* VLPQQQIPF+
Q8W3X3	2	SQQQLPPF+ VLPQQQIPF+
Q9XGE9	2	SQQQLPPF+ SQQQLPPFLQQQPPF+
Q2QL54	2	LAIVATTATTAVRVPMPQL+ IPCRDVLQQPNIHASSQVLQQSYQL
Q0GNF9	2	QQILW+ EAIRAIY* VLPQQQIPF+
A0MWD0 Q0Q5D2 Q6PMJ0	2	YYPTSPQESGQQQPGQW+ YYPTSPQQSGQQQPGQW+, WGIPALL*

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q6IZ87	2	YYPTSPQESGQQQPGQW+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+
Q6IZ84	2	YPGQASPQQPGQQQPGKW+ YPTSPQQLGQQQEPGQWQQSGGQQGHYPISL
Q7XZT7	2	YPGQASPQQPGQQQPGQW YYPTSPQQSGQQQPGQW+
Q0GLF2 Q1G7G3 Q38LF5 Q6PMI7	2	YYPTSPQQSGQQQPGQW+ WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+
Q5RLZ0 Q6IZ90	2	YYPTSPQQSGQQQPGQW+ YPTSPQQPGQLQQP+
P04725 Q41545	2	LQLQPF+ VRVPVPLQPNPSQQQPQEQVPL+
Q2PQJ5 Q84NE2	2	QIPEQSRHESIRAIVYSIIL+ YETTTSLPL+
Q2YKX5	2	DKEVGAVAN AKKQAESSGFRTVGVY
Q2QL53	2	VQPQQLPFEEIRNL+ QPQQLPFEEIRNL+
Q1KL95 Q42451 Q45R38 Q5I6T0 Q5XZE4 Q6Q7J1 Q6TC64 Q6UJY5	2	WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+ HVSAEYQAARLKVAKAQQQL+
Q40055	2	SWQPQQPF IIPQQPQQPF+
Q6CCF1	1	NSPSQQKGY
Q6Z8B6	1	QTQQQQQGY
Q5XY00	1	GASTSVPFVGTGVSAY
Q2QL55	1	QQSSYQPLQQL
P02861 Q94IK6 Q94IL0 Q94IL3 Q9SDM3	1	EGGDALL+
Q7XAH9	1	EAYQQVVDQQL+ WGIPALL*
Q7XYT9 Q7XYX4	1	VVALMAL+
P04728 Q8H739	1	GIFGTN+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q5MFH4	1	FAKQPSF SQQQQLVL* EAIRAIY*
P16315 Q5PU39 Q5XM79 Q5XY01 Q693B2 Q6PKM2	1	SQQQPSF+
Q52NZ3	1	SQQQPSF+ EAIRAIY*
Q226E3	1	DHNNSIL
P04729 Q41547 A2IBJ4 A2IBJ5 A2IBJ6 A2IBK0 A2IBV3 P93792 Q0PW09 Q2V724 Q3YB19 Q3YB20 Q52NZ2 Q52NZ5 Q52NZ6 Q5MFN9 Q5MFP0 Q5MFP3 Q5PU40 Q5PU43 Q6J6V1 Q8W3V5	1	SQQQQLVL* ARSQMW+ EAIRAIY*
O22108 Q0GQX1 Q1ZZT4	1	SQQQQLVL* ARSQMW+
Q0PW08	1	SQQQQLVL* VLPRQPPF
Q3YB17	1	SQQQQLVL* EAIRAIY* IALGGTSAIAQNGRLDASL
A2TN60 Q41603 Q5MB98 Q5MFQ4 Q7Y074 Q84U13 Q8H0J4 Q8W3V6 Q8W3V7 Q8W3V8 Q8W3V9 Q9FEQ1	1	ARSQMW+
Q5XXZ7	1	ARSQMW+ EAIRAIY*
A2GU98	1	SLFPQIDRF
Q6PNA3	1	SLQPQQPF+
Q8W3W4	1	SQQQLPPF+ EAIRAIY*
Q8W3X2	1	SQQQLPPF+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q2QL56 Q2QL57	1	LAIVATTATTAVRVPMPQL+
A0A211	1	TIPSNKW
A2IBJ8 A2IBJ9 A2IBK1 A2TN61 O49958 Q41549 Q41551 Q41552 Q68VI0 Q6J161 Q6J6V0 Q8W3X5 Q8W3X6	1	QQILW+
Q8S3W0	1	YYPTSPQESGQGQQPGQW+ WGIPALL*
P10387 P08488 Q03871 Q0Q5D8 Q0ZB33 Q1KL93 Q2PQJ9 Q38767 Q38LF4 Q52JL2 Q52JL3 Q5I202 Q5RLY8 Q670Q5 Q6IZ86 Q6PMI6 Q6PMI8 Q6RX92 Q6RX93 Q6TC11 Q6UJY7 Q7XYR6 Q7XZI1 Q7XZI3 Q7XZT6 Q7Y0S9 Q7Y1A2 Q84RC6 Q84TG6 Q8H0L6 Q8LKV7 Q8S3V7 Q93XR5 Q94IJ6 Q9M5N3	1	YPGQASPQQPGQGQQPGKW+
Q1KL92 Q6IZ85 Q8S3V8	1	YYPTSPQQSGQGQQPGQW+ WGIPALL*
Q93XR6 Q94IJ7	1	YYPTSPQQSGQGQQPGQW+
Q30DX8 Q7M1M5 Q94G98	1	NIQVDPSGQVQW+
Q8W3W5 Q8W3W8	1	SHIPGLERPSQQQLPPQQTL+
Q30DX4	1	LQQQLVPQLQQPL+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q2PQJ6 Q2PQJ8 Q38L54 Q6SPZ0 Q8W3U9 Q8W3V0 Q8W3V1 Q9FEQ2	1	QIPEQSRHESIRAIVYSIIL+
Q654C3	1	GQSQQQPF
Q7M1M6	1	VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+
Q6PMI9 Q6R502 Q6R506 Q6R507 Q6R510 Q93XR4	1	WGIPALL* YPTSPQQPGQLQQP+
Q9FTC4 Q9FTC5	1	SLPQQPF+
P20698	1	ASVYFDQSQAQAQAML
Q6J160 Q6J162 Q84U16 Q84U18 Q8W3W3	1	EAIRAIY* VLPQQQIPF+
Q8H0L3	1	SGQASPQQPGQQQAW
P06471 P17991 Q40037 Q41210	1	IIPQQPQQPF+
A2DPE7	1	MTTIL
Q5W6A5	1	LLQQQVFSPY
Q7X8G9 Q7XZB4	1	ASRLPW+
A1EHE8	1	YPISPQQPGQQQSGQGNQGY
Q4UIG0	1	QTNQPTQPNQQGY
A0S866	1	YPTSPQQPGQLQQP+
Q5MFH0	1	SQQQQPPFSHQQPPLSQQL
Q2L990 Q2PQJ7	1	YETTTSLPL+
A2F452	1	TYEYEESEVEEEEIEQEPQQQEQQSL
P80356	1	QPYPEQQQPILQQQML

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (mit Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
O24463	1	VGPQQDNKAIMKSSNNNGVSL
P15839 Q2R363 Q40618 Q40619 Q40620 Q40623	1	LIALSASATTAITTMQY+
Q19A59 Q7Y0K2	1	YPSSPQQPGQLQQPTQGQQGY+
Q84U17	1	QQLNPCKVFLQQQCSPVAMPY
Q7XZH8	1	HVSAEYQAARLKVAKAQQQL+
Q09095	1	QPYPEQQQPF
Q09114 Q09097	1	QPYPEQQEPF+

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (ohne Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
P04721 Q0GK30 Q27HK7 Q306G0 Q3S4V7 Q3YFI0 Q3YFI2 Q41509 Q41533 Q9M4M0 Q9M4M1 Q9M4M2 Q9ZP09	3	LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+
Q2V5Z6	3	LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+ IGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY
P04725 P18573 Q1WA39 Q1WA40 Q2QL42 Q2QL43 Q2QL44 Q2QL45 Q2QL47 Q2QL49 Q2QL51 Q2QL52 Q2V5Z7 Q3S4V8 Q41545 Q9M4L6 Q9M4L7	2	LQLQPF+ VRVPVPLQLPQNPSQQQPQEQVPL+
Q2QL63 Q3YFI1 Q41530 Q5NDA5 Q9M4L9 Q9M4M5	2	LQLQPF+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY+
Q41528	2	LQLQPF+ LGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQLPYL
P08453 Q94G91 Q9M6P7	2	NIQVDPSGQVQW+ LQQQLVPQLQQPL+
Q9XGF0	2	SHIPGLERPSQQQPLPPQQTL+ SQQQPPFPSSQLPPF
Q6EEW4	2	VPQPQQPL+ QGQVILVPLSQQQVGGQILVQGGQIIPQPPAQL+
A0S866 Q1G7G2 Q1G7G4 Q7XYT8 Q7XYU0 Q7Y0K3 Q84LW6	2	HQGY+ QPGQQQPQGGQQGY+
Q5XY00	1	GASTSVFPGVGTGVSAY
Q30DX8 Q41543 Q7M1M5 Q94G96 Q94G97 Q94G98	1	NIQVDPSGQVQW+
Q30DX4 Q6EEW9	1	LQQQLVPQLQQPL+
Q7RB64	1	IDPPPIVLKNTQVLPQLY

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (ohne Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
P02863 P04722 P04726 P04727 Q27HK6 Q2QL50 Q2QL58 Q2QL59 Q2QL60 Q2QL61 Q2QL62 Q2QL64 Q2QL65 Q2QL66 Q2QL67 Q2QL68 Q2QL69 Q2QL70 Q2QL71 Q2QL72 Q41529 Q41531 Q41546 Q41632 Q53WW7 Q9M4L8 Q9M4M4	1	LQLQPF+
A2IBV5 Q0Q2J0 Q0Q2J1 Q18NR2 Q75ZV8 Q75ZV9 Q8W3W5 Q8W3W8 Q8W3W9 Q8W3X0 Q8W3X1 Q8W3X4 Q9ZNY0	1	SHIPGLERPSQQQPLPPQQL+
P04723 Q2QL46 Q2QL48 Q308Q7 Q7M1M6 Q9M4M3 Q9M4M6	1	VRVPVQLQPQNPSQQQPQEQVPL+
A0MZ38	1	QQSGQQQQYYPTSSQQSGQQQPGQW
Q30DX3	1	VPQPQQPL+
Q1LZV2 Q4G3S1 Q4G3S3 Q4G3S5 Q4G3S6 Q4G3S7 Q4G3S8 Q4G3T0 Q4G3T9	1	LQQQCSPVMPQRIARSQML+
Q4UIG0 Q7XZT7	1	HQGY+
A1YQF8 A1YQF9 A1YQG2 Q2QU96	1	ALNLPsicGIYPSY+
Q93XJ8	1	LQPGY

Anhang-5

Identifizierte Peptide von Gliadinextrakt durch chymotrypt. Verdau (ohne Reduktion)

Zuordnungscode der Proteine	Hit	Identifizierte Aminosäuresequenzen
Q1G7F4 Q1G7F8 Q1G7G3 Q20CR1 Q2MCJ8 Q45R38 Q5I6T0 Q5XZE4 Q6Q7J1 Q6TC64 Q6UJY5 Q6UKZ5 Q7XYT7 Q7XYT9 Q7XYX4 Q7XZH8 Q84P15 Q8RVX0 Q93WF0 Q93WM1 Q94IJ7 Q94IJ8 Q94IJ9 Q94IK6 Q94IK7 Q94IK8 Q94IK9 Q94IL0 Q94IL1 Q94IL2 Q94IL3 Q94IL4 Q94IL5 Q94IL6 Q9SDM2 Q9SDM3	1	QPGQGQQPGQGQQGY+
Q7XZB4	1	QQGIFGETSSQTVQGY
Q09097	1	VQQQQPFVQQQEPF
Q84U13 Q84U15	1	VFALLAVAATSTIAQQQQLPQPY+
P06659 Q6EEW3 Q6EEW5 Q6EEW6	1	QGVQILVPLSQQQVGGILVQQGGIIQPQQPAQL+