

# Massenspektrometrische Identifizierung und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen bei pathologischen freien Antikörperleichtketten



Dissertation  
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katja Heinig

aus Sömmerda

Würzburg 2014

Eingereicht am

.....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

# Danksagung

Ich möchte allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Frau Dr. Petra Kapková sowie dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg für die Bereitstellung der interessanten und herausfordernden Aufgabenstellung. Frau Dr. Petra Kapková möchte ich meinen besonderen Dank für die persönliche Betreuung, Unterstützung bei fachlichen Fragen und technischen Problemen sowie für die Freiheit zum selbstständigen Arbeiten aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Jens Vanselow und Prof. Dr. Andreas Schlosser vom Rudolf-Virchow-Zentrum für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Messungen und hilfreichen Ratschlägen bei analytischen Problemen. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou vom Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg für die Bereitstellung des Probenmaterials.

Frau Prof. Dr. Catherine E. Costello danke ich für die Möglichkeit einen Teil meiner Messungen an der School of Medicine an der Boston University durchführen zu können. Meinen besonderen Dank möchte ich dabei Frau Dr. Deborah Francoleon aussprechen für ihre Hilfe bei den massenspektrometrischen Messungen sowie der freundlichen Aufnahme in den Arbeitskreis. Mein Dank gilt ebenso der Bayrischen Forschungsallianz, deren finanzielle Unterstützung den Gastforschungsaufenthalt ermöglichte.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Eva Englberger für ihre Hilfe bei der Durchführung der PCR danken. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Michael Büchner für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Messungen. Herrn Prof. Dr. Christoph Sottriffer und Herrn Benjamin Merget gilt mein Dank für die Anregungen bei der Varianzanalyse.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Theoretischer Hintergrund . . . . .	1
1.1.1	Krankheitsbilder . . . . .	1
1.1.1.1	Monoklonale Gammopathien . . . . .	1
1.1.1.2	Multiples Myelom . . . . .	2
1.1.1.2.1	Epidemiologie . . . . .	2
1.1.1.2.2	Symptome . . . . .	3
1.1.1.2.3	Diagnose . . . . .	3
1.1.1.2.4	Therapie . . . . .	3
1.1.1.3	AL-Amyloidose . . . . .	4
1.1.1.3.1	Epidemiologie . . . . .	5
1.1.1.3.2	Symptome . . . . .	5
1.1.1.3.3	Diagnose . . . . .	5
1.1.1.3.4	Therapie . . . . .	6
1.1.2	Antikörper . . . . .	7
1.1.2.1	Aufbau . . . . .	7
1.1.2.2	Molekulare Genetik von Immunglobulinen . . . . .	9
1.2	Motivation . . . . .	10
1.3	Posttranslationale Modifikationen . . . . .	12
1.3.1	Sulfonierung . . . . .	13
1.3.2	Phosphorylierung . . . . .	14
1.3.3	Methylierung . . . . .	14
1.3.4	O-GlcNAc-Glykosylierung . . . . .	15
1.3.5	Acetylierung . . . . .	15

1.3.6	Prozessbedingte Modifikationen . . . . .	16
1.3.6.1	Carbamidomethylierung . . . . .	16
1.3.6.2	Oxidation . . . . .	17
1.4	Zielsetzung . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Massenspektrometrie</b>	<b>19</b>
2.1	Allgemeines Prinzip . . . . .	19
2.2	Ionenquellen . . . . .	20
2.2.1	ESI . . . . .	20
2.3	Massenanalytoren . . . . .	21
2.3.1	Quadrupol . . . . .	22
2.3.2	Ionenfalle . . . . .	23
2.3.3	Orbitrap . . . . .	25
2.4	Fragmentierung . . . . .	26
2.4.1	Kollisionsinduzierte Fragmentierung von Peptiden . . . . .	26
2.4.2	ECD/ETD . . . . .	28
2.5	PTM-spezifisches Fragmentierungsverhalten . . . . .	29
2.5.1	Sulfonierung . . . . .	29
2.5.2	Phosphorylierung . . . . .	29
2.5.3	O-GlcNAc-Glykosylierungen . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1	Allgemeines Vorgehen . . . . .	33
3.2	Geräte und Materialien . . . . .	34
3.2.1	Probenisolierung . . . . .	34
3.2.2	Enzymverdau . . . . .	35
3.2.3	PCR . . . . .	36
3.2.4	Massenspektrometrische Messung . . . . .	37
3.3	Patienten . . . . .	38
3.4	Probenvorbereitung . . . . .	39
3.4.1	Isolierung der FLCs mittels Affinitätschromatographie . . . . .	39
3.4.1.1	Antikörperkopplung an Affinitätschromatographiesäulen . . . . .	39

---

3.4.1.2	Affinitätschromatographie . . . . .	40
3.4.2	Präparative SDS-PAGE . . . . .	41
3.4.3	Enzymverdau . . . . .	42
3.5	Ermittlung der FLC-Aminosäuresequenzen . . . . .	43
3.5.1	PCR zur Bestimmung der Aminosäuresequenzen . . . . .	43
3.5.2	Homologievergleich mit Sequenzen aus Proteindatenbanken . . . . .	45
3.6	Massenspektrometrische Analyse . . . . .	46
3.6.1	HCD-MS-Messung . . . . .	46
3.6.2	ETD-MS-Messung . . . . .	47
3.7	Identifizierung von PTMs . . . . .	48
3.7.1	HCD-MS-Spektren . . . . .	48
3.7.2	ETD-MS-Spektren . . . . .	49
3.7.3	Manuelle Suche . . . . .	51
3.7.3.1	Sulfonierung . . . . .	51
3.7.3.2	Methylierung . . . . .	52
3.7.4	PEAKS-Analyse . . . . .	53
3.8	Varianzanalyse . . . . .	54
3.8.1	<i>AL-Base</i> -Datenbank . . . . .	54
3.8.2	Isolation und Vorbereitung der Aminosäuresequenzen . . . . .	55
3.8.3	Ermittlung der häufigsten Aminosäuren . . . . .	55
3.8.4	Ermittlung der relativen Häufigkeiten . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Probenvorbereitung: FLC-Isolierung . . . . .	59
4.2	Ermittlung der FLC-Aminosäuresequenzen . . . . .	61
4.2.1	Ermittlung der Aminosäuresequenzen mittels PCR . . . . .	61
4.2.1.1	PCR-Ergebnisse . . . . .	61
4.2.1.2	Aminosäuresequenzen der sechs Patientenproben . . . . .	61
4.2.1.3	Überprüfung der konstanten Region . . . . .	64
4.2.2	Massenspektrometrische Verifizierung der Sequenzen . . . . .	65
4.2.3	Sequenzhomologien zwischen den sechs Patientenproben . . . . .	69

4.2.4	Homologie mit Sequenzen aus Proteindatenbanken . . . . .	69
4.3	Copräzipitation . . . . .	71
4.4	Posttranslationale Modifikationen . . . . .	72
4.4.1	Sulfonierung . . . . .	72
4.4.1.1	Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194 . . . . .	73
4.4.1.2	Mögliche weitere Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194 . . . . .	89
4.4.1.3	Mögliche Sulfonierung im Bereich des Cysteins C23 . . . . .	93
4.4.1.4	Mögliche Sulfonierung im Bereich des Cysteins C134 . . . . .	99
4.4.2	Methylierung am Cystein . . . . .	102
4.4.3	Glykosylierung . . . . .	110
4.4.4	Prozessbedingte Modifikationen . . . . .	112
4.4.4.1	Acetylierung . . . . .	112
4.4.4.2	Oxidation . . . . .	115
4.5	Varianzanalyse . . . . .	118
4.5.1	<i>AL-Base</i> -Datenbank . . . . .	118
4.5.1.1	Anzahl Spektren . . . . .	118
4.5.1.2	Auftreten des $V_{\kappa}I$ -Subtypen . . . . .	119
4.5.2	Multiples Sequenzalignment . . . . .	120
4.5.3	Häufigste Aminosäuren . . . . .	121
4.5.4	Relative Häufigkeiten der Aminosäuren . . . . .	122
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>141</b>
7.1	Allgemein . . . . .	141
7.2	Aminosäuren . . . . .	146
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
A.1	SDS-PAGE-Gele . . . . .	II

A.2	Spektren . . . . .	III
A.2.1	Sulfonierungen . . . . .	III
A.2.1.1	Sulfonierung am Cystein C194 . . . . .	III
A.2.1.2	Sulfonierung am Cystein C23 . . . . .	XXIII
A.2.2	Methylierungen . . . . .	XXIV
A.2.3	Glykosylierung . . . . .	XXXI
A.3	Varianzanalyse . . . . .	XXXIII
A.4	Python-Skripte . . . . .	XXXVI
A.4.1	Ermitteln der häufigsten Aminosäure . . . . .	XXXVI
A.4.2	Bestimmen der relativen Häufigkeiten . . . . .	XL



# 1 Einleitung

## 1.1 Theoretischer Hintergrund

### 1.1.1 Krankheitsbilder

#### 1.1.1.1 Monoklonale Gammopathien

Bei einer monoklonalen Gammopathie handelt es sich um eine Erkrankung, die mit einer monoklonalen Vermehrung einer Plasmazelle verbunden ist [1]. Dadurch kommt es zu einer übermäßigen Produktion von Immunglobulinen, die auch als Paraproteine bzw. M (Myelom)-Proteine bezeichnet werden. Paraproteinämie, Dysproteinämie oder Immunglobulinopathie sind Synonyme für die monoklonale Gammopathie. Von der Überproduktion der Paraproteine können alle Klassen von Immunglobulinen bzw. den leichten Ketten der Immunglobuline betroffen sein. So gibt es monoklonale Gammopathien vom Typen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE sowie  $\lambda$ - und  $\kappa$ -Subtypen.

Treten bei den Patienten weniger als 30 g/l M-Protein im Serum und weniger als 10 % monoklonale Plasmazellen im Knochenmark auf, spricht man von der Monoklonalen Gammopathie Unklarer Signifikanz (MGUS) [1]. Außerdem dürfen zur Diagnose der MGUS noch keine Endorganschäden bei den Patienten vorhanden sein. Patienten mit MGUS benötigen noch keine Behandlung, allerdings sollten diese regelmäßig auf die Weiterentwicklung zu malignen Erkrankungen untersucht werden. Die MGUS tritt bei ca. 1 % der Personen über 50 Jahren und bei 3 % der Menschen über 70 Jahren auf [1–4]. Bei 8,5 % der Patienten entwickelt sich die MGUS innerhalb von fünf Jahren in eine maligne Krankheit weiter, während dies in 10 Jahren bei 19,2 % der MGUS-Patienten geschieht [1, 5]. Bei 1 % der Patienten entsteht jährlich aus der MGUS das Multiple Myelom [1].

Das Asymptomatische Myelom (auch: *Smoldering Myeloma*) wird diagnostiziert, nachdem die Konzentration des Paraproteins im Serum 30 g/l und die Anzahl der monoklonalen Plasmazellen 10 % überstiegen haben [1,6]. Analog zur MGUS treten bei dem Asymptomatischen Myelom keine Endorganschäden bei den Patienten auf. Allerdings zeigen diese Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko, das behandlungswürdige Multiple Myelom zu entwickeln.

### **1.1.1.2 Multiples Myelom**

Nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie [7] handelt es sich bei dem Multiplen Myelom um eine maligne monoklonale Plasmazellerkrankung, bei der übermäßig produzierte Immunglobuline im Serum und/oder Urin vorhanden und Endorganschäden bei den Patienten aufgetreten sind. Die Ursache für das Multiple Myelom konnte bis jetzt noch nicht erklärt werden. Es wird allerdings vermutet, dass die Exposition von ionischer Strahlung, Pestiziden, Produkten der Petrochemie, Adipositas bzw. chronische Infektionen einen Einfluss bei der Entstehung des Multiplen Myeloms haben können. Wie gesagt, entwickelt sich das Multiple Myelom meist aus einer MGUS. Allerdings existiert auch das nicht-sekretierende Myelom, bei dem zwar eine Plasmazelldyskrasie, aber keine Überproduktion von monoklonalen Immunglobulinen vorhanden ist.

**1.1.1.2.1 Epidemiologie** In Deutschland erkranken jährlich 3000 Männer und 2700 Frauen [7] am Multiplen Myelom. Damit handelt es sich nach der Leukämie und dem Non-Hodgkins-Lymphom um die dritthäufigste Neoplasie und ist für ca. 1 % der Krebsfälle in Deutschland verantwortlich [7]. Bei dem Multiplen Myelom handelt es sich um eine Erkrankung des höheren Lebensalters, da die Inzidenz ab 50 Jahren stark zunimmt, wobei der Median des Erkrankungsalters bei Männern 71 Jahre und bei Frauen 73 Jahre beträgt. Zwischen 2005 und 2009 waren in Deutschland 5,4 Erkrankungen je 100.000 männlichen Einwohnern bzw. 3,7 Erkrankungen je 100.000 weiblichen Einwohner bekannt [8]. Außerdem konnte beobachtet werden, dass afrikanisch-stämmige Personen etwa doppelt so häufig vom Multiplen Myelom betroffen sind als kaukasische Menschen.

**1.1.1.2.2 Symptome** Bei dem Multiplen Myelom treten vielseitige und unspezifische Symptome wie Erschöpfung, Knochenschmerzen oder auch eine erhöhte Infektanfälligkeit auf. Durch die Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark kommt es bei Multiplen-Myelom-Patienten zur Verdrängung von Knochensubstanz sowie anderer Zellen im Knochenmark. Die Verdrängung der Knochensubstanz verursacht lytische Läsionen, Osteolysen und Frakturen bei den Patienten. Der Abbau der Knochensubstanz erzeugt außerdem eine Hyperkalzämie, die wiederum zu einer Niereninsuffizienz führen kann. Die Verdrängung der blutbildenden Zellen im Knochenmark verursacht meist eine Anämie bei den Patienten, die sich häufig in chronischer Müdigkeit äußert. Eine Abnahme der Lymphozyten erhöht die Infektanfälligkeit der Patienten.

**1.1.1.2.3 Diagnose** Für die Diagnose des Multiplen Myeloms wird im Serum und im Urin der Patienten die Konzentration an Paraprotein bestimmt sowie das Knochenmark auf das Auftreten von monoklonalen Plasmazellen analysiert. Die Konzentrationsbestimmung des M-Proteins kann durch eine Immunofixation erfolgen, während die Plasmazellkonzentration meist durch eine Knochenmarksbiopsie mit anschließender Zellfärbung bestimmt wird. Außerdem werden die Patienten auf Myelom-typische Endorganschäden untersucht. Überschreiten die monoklonalen Plasmazellen 10 % der kernhaltigen Zellen im Knochenmark und sind typische Endorganschäden vorhanden, wird von einer Multiplen-Myelom-Erkrankung ausgegangen.

**1.1.1.2.4 Therapie** Nach der Leitlinie zum Multiplen Myelom bezweckt die Therapie das Erreichen einer bestmöglichen Remission mit rascher Systemkontrolle. In Abhängigkeit des Gesundheitszustandes werden die Patienten mit einer Hochdosis-Melphalantherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation behandelt. Zur Verbesserung der Ansprechrate wird häufig vor der Hochdosis-Therapie eine Induktionstherapie mit den Substanzen Thalidomid, Bortezomib und Lenalidomid durchgeführt. Dabei kann die Chemotherapie mit Einzel- oder Tandemtransplantation erfolgen. Bei der Tandemtransplantation kommt es zu einer zweiten autologen Stammzelltransplantation im zeitlichen Abstand von <12 Monaten und vor dem Eintritt eines Rezidivs.

Neben der autologen Stammzelltransplantation können Patienten auch mit einer allogenen Stammzelltransplantation behandelt werden. Sie stellt zurzeit den einzigen verfügbaren kurativen Ansatz zur Behandlung des Multiplen Myeloms dar [1, 9]. Allerdings müssen diese Patienten lebenslang immunsupprimierende Medikamente einnehmen.

Patienten, die aufgrund ihres Alters oder anderen Erkrankungen nicht mit der Hochdosis-Therapie behandelt werden können, können mit einer geringeren dosierten Melphalan-, Thalidomid-, Bortezomib- und/oder Lenalidomidtherapie versorgt werden.

Die vorgestellten Therapieoptionen werden durch die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie empfohlen. Zurzeit werden randomisierte klinische Studien durchgeführt, die die Wirksamkeit der Behandlungen bewerten sollen. Aussagen über die Lebenswartung der behandelten Patienten in Abhängigkeit der Therapieform können daher noch nicht eindeutig getroffen werden [7].

### **1.1.1.3 AL-Amyloidose**

Bei einer Amyloidose handelt es sich um eine „*Protein misfolding*“-Krankheit, bei der zuvor lösliche Proteine zu hoch geordneten nicht verzweigten Fibrillen selbstaggregieren [10] und extrazellulär in Organen und Geweben abgelagert werden. Die Fibrillen zeigen eine typische  $\beta$ -Faltblattstruktur, welche unter dem Mikroskop nach Kongorotfärbung und bei polarisiertem Licht apfelgrün erscheint. Die Fibrillen können sich in verschiedenen Organen ablagern und durch Zersetzen des Organgewebes zum Organversagen führen. Es wird vermutet, dass die Selbstaggregation durch Mutationen in der Proteingensequenz, durch proteolytische Spaltung des Proteins oder durch Veränderungen in dessen posttranslationalen Modifikationen herbeigeführt werden kann. Allerdings konnte bis jetzt noch keine eindeutige Ursache für eine Amyloidose ermittelt werden.

Die Klassifizierung einer Amyloidose erfolgt nach der Bezeichnung der betroffenen Proteine [11]. Bei der AL-Amyloidose aggregieren ganze monoklonale freie Immunglobulinleichtketten (FLC: *Free Light Chain*) bzw. deren Fragmente [12] und lagern sich im Herzen, den Nieren, den Blutgefäßwänden, der Leber, der Milz oder im Knochenmark sowie im autonomen und

peripheren Nervensystem ab [13]. Die amyloiden FLCs werden von klonalen Plasmazellen im Knochenmark gebildet. Dabei sind FLCs vom  $\lambda$ -Subtypen dreimal häufiger vertreten als  $\kappa$ -FLCs. Im gesunden Knochenmark hingegen werden mehr FLCs vom  $\kappa$ -Subtypen produziert [14]. Untersuchungen konnten zeigen, dass die AL-amyloiden Ablagerungen häufiger aus Fragmenten der variablen als der konstanten Region der FLCs bestehen [10].

Die AL-Amyloidose tritt meist in Form einer Plasmazelldyskrasie sowie dem Vorhandensein von FLCs in Knochenmark, Serum und Urin auf [10]. Ca. 10-15 % der AL-Amyloidose-Patienten sind auch am Multiplen Myelom erkrankt [14].

**1.1.1.3.1 Epidemiologie** Die AL-Amyloidose ist eine Krankheit, die mit jährlich 5 bis 12 Millionen Neuerkrankungen in der nordamerikanischen Bevölkerung ähnlich oft auftritt wie das Hodgkin's Lymphom oder die chronische myeloische Leukämie [14–16]. Für Deutschland liegen keine verlässlichen Zahlen vor, da AL-Amyloidose-Fälle nicht in Registern erfasst werden [15]. Die AL-Amyloidose ist dabei eine Krankheit des höheren Lebensalters, da 60 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 50 und 70 Jahre alt sind. Nur 10 % der Betroffenen sind jünger als 50 Jahre [13].

**1.1.1.3.2 Symptome** Die AL-Amyloidose zeichnet sich zunächst durch ein unklares unspezifisches Krankheitsbild aus. Häufig klagen die Patienten über Knochenschmerzen, Müdigkeit sowie ungewollten Gewichtsverlust. Darüber hinaus neigen AL-Amyloidose-Patienten zu erhöhter Infektanfälligkeit. Bei dem unerklärten Auftreten von Proteinurie, Kardiomyopathie, Neuropathie, Hepatomegalie und bei Patienten mit Multiplem Myelom sollte die Diagnose AL-Amyloidose in Erwägung gezogen werden.

**1.1.1.3.3 Diagnose** Die Diagnose der AL-Amyloidose beinhaltet den Nachweis von amyloiden Ablagerungen im Gewebe und den Nachweis einer Plasmazelldyskrasie. Die amyloiden Ablagerungen können durch eine Biopsie der betroffenen Gewebe und anschließender Kongorotfärbung und Betrachtung im Mikroskop unter polarisiertem Licht nachgewiesen werden. Für die Biopsie eignen sich das Unterleibfettgewebe, da bei 70 % der AL-Amyloidose-Patienten im Unterleibfettgewebe amyloide Ablagerungen auftreten [14, 17, 18]. Auch Speicheldrüse, Zahnfleisch, Rektum und Haut sind aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit für die

Biopsie geeignet. Für die Biopsie können auch Proben von Organen verwendet werden, bei denen ein Verdacht auf amyloidogene Ablagerungen besteht.

Der Nachweis der Plasmazell Dyskrasie kann durch eine Knochenmarksbiopsie mit anschließender Zellfärbung oder durch die Bestätigung von erhöhten  $\lambda$ - oder  $\kappa$ -FLC-Werten im Blut oder Urin erfolgen. Dazu kann eine Immunofixationselektrophorese von Serum, Urin oder Knochenmarksüberstand durchgeführt werden.

**1.1.1.3.4 Therapie** Die Behandlung der AL-Amyloidose erfolgt aufgrund von unspezifischen Krankheitssymptomen meist erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, weshalb eine vollständige Heilung schwierig und eine Verbesserung das Hauptziel der Behandlung darstellt. Die Behandlung teilt sich in zwei Hauptwege auf: Unterstützende Therapie und Reduktion der AL-Amyloidose-produzierenden Plasmazellen. Die supportive Therapie ist abhängig von den mit amyloiden Ablagerungen betroffenen Organen. So ist bei einer Nierenbeteiligung meist eine Diurese-fördernde Therapie oder eine Dialyse notwendig. Bei einer Involvierung des Herzens können Calcium-Kanal-Blocker,  $\beta$ -Blocker oder auch ein Herzschrittmacher helfen [12].

Die Reduktion der AL-Amyloid-produzierenden Plasmazellen erfolgt mit Hilfe einer Chemotherapie in Kombination mit autologer Blutstammzelltransplantation bzw. allogener Knochenmarkstransplantation und dient der Verbesserung der Organfunktion und der Verlängerung der Überlebenszeit. Als Hauptchemotherapeutikum dient Melphalan, welches als Niedrig- und Hochdosis-Gabe zur Anwendung kommt, wobei die Hochdosis-Verordnung höhere Erfolgsraten zeigt. Allerdings befinden sich viele AL-Amyloidose-Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung mit Herzbeteiligung, was sich negativ auf die Überlebensrate der Chemotherapie auswirkt. [14]

Die mediane Überlebenszeit von AL-Amyloidose-Patienten beträgt ohne Behandlung 10 bis 14 Monate nach der Diagnose, wobei die Prognose stark von den betroffenen Organen abhängt. Patienten mit symptomatischen Herzbefall zeigen eine mediane Überlebenszeit von weniger als fünf Monaten [19, 20]. Die systemische Chemotherapie ist eine pro-

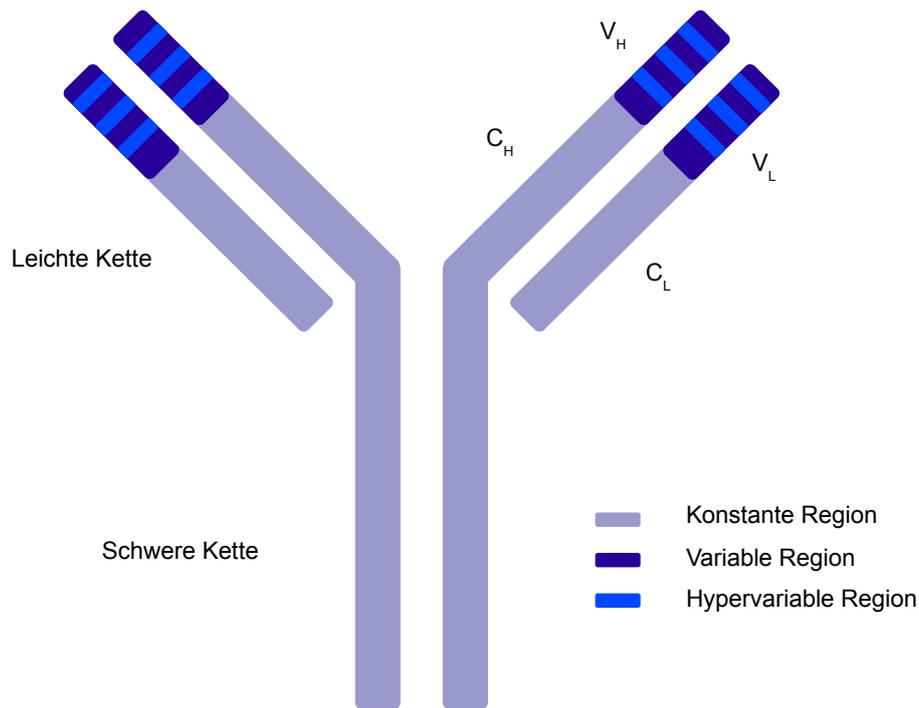
gnoseverbessernde Therapie. Dabei konnten Phase-2-Studien zeigen, dass eine Hochdosis-Melphalan-Therapie und anschließender autologer Stammzelltransplantation bei 50 % der Patienten eine komplette Remission und damit einen signifikanten Überlebensvorteil bewirkt haben [19, 21]. Randomisierte Phase-3-Studien zum Vergleich der konventionellen mit einer Hochdosis-Melphalan-Therapie fehlen bisher, allerdings haben retrospektive Matched-pair-Analysen einen signifikanten Vorteil für AL-Amyloidose-Patienten nach der Hochdosis-Behandlung gefunden [22].

## **1.1.2 Antikörper**

### **1.1.2.1 Aufbau**

Bei den FLCs der Multiplen-Myelom- und AL-Amyloidose-Patienten handelt es sich um die leichten Ketten von Immunglobulinen, welche ohne die schweren Ketten bei den Patienten zu finden sind. Im menschlichen Körper existieren eine Vielzahl von Immunglobulinen, die strukturell sehr unterschiedlich aufgebaut sein können. Dennoch lassen sich alle Immunglobuline auf eine gemeinsame Grundstruktur zurückführen. Sie bestehen aus zwei schweren und zwei leichten jeweils identischen Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die schweren Ketten zeigen ein Molekulargewicht von ca. 50-70 kDa, während die leichte Kette etwa 23 kDa wiegt. Zusätzliche Disulfidbrücken innerhalb der einzelnen Ketten verleihen dem Antikörper Struktur. Der Aufbau eines typischen Immunglobulins ist in der Abbildung 1.1 dargestellt. Jede schwere Kette wird durch eine konstante und eine variable Region  $C_H$  bzw.  $V_H$  gebildet, welche ca. 330-400 bzw. 110 Aminosäuren umfassen. Die leichte Kette besteht ebenfalls aus einer konstanten und einer variablen Region  $C_L$  bzw.  $V_L$ , welche jeweils aus etwa 110 Aminosäuren zusammengesetzt sind. Die *N*-terminalen variablen Regionen der schweren und leichten Kette bilden das Epitop eines Antiköpers und ermöglichen dadurch eine große Antikörpervielfalt und eine hoch spezifische Wirkungsweise des Immunglobulins.

Die Spezifität eines Epitops wird durch die Vielfalt der Aminosäuresequenz in der variablen Region hervorgerufen. Dabei konzentriert sich die Sequenzvariabilität auf bestimmte Abschnitte in den variablen Regionen, den sogenannten hypervariablen Regionen (HVR).



**Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers.** Ein IgG-Antikörper besteht aus jeweils zwei identischen leichten und schweren Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Sowohl die schwere als auch leichte Kette bestehen aus einer konstanten C- und einer variablen V-Region. Die variablen Bereiche sind jeweils aus hypervariablen und Gerüstregionen aufgebaut. Modifiziert nach Janeway [23]

Die HVR befinden sich an der Spitze der Antigenbindestelle eines Antikörpers, weshalb sie auch als komplementaritätsbestimmende Region (CDR: *Complementarity Determining Regions*) bezeichnet werden. Sowohl bei der variablen Domäne der schweren als auch der leichten Kette existieren drei hypervariable Regionen. Diese sind durch die Gerüstregionen, den *Framework Regions* (FR), FR1, FR2, FR3 und FR4 voneinander getrennt.

Bei den meisten Immunglobulinen lässt sich in der konstanten Region der schweren Kette eine Glykosylierungsstelle finden. So weist das IgG bei der Aminosäure 292 eine potentielle *N*-Glykosylierungsstelle auf. Das Vorhandensein eines Glykans an dieser Stelle trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung der Antikörperstruktur bei. Des Weiteren können Glykosylierungsstellen in den variablen Regionen der schweren und leichten Ketten auftreten.

Die humanen Immunglobuline kann man aufgrund ihrer schweren Ketten in die fünf Hauptklassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE unterteilen. Diese besitzen die schweren Ketten  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$

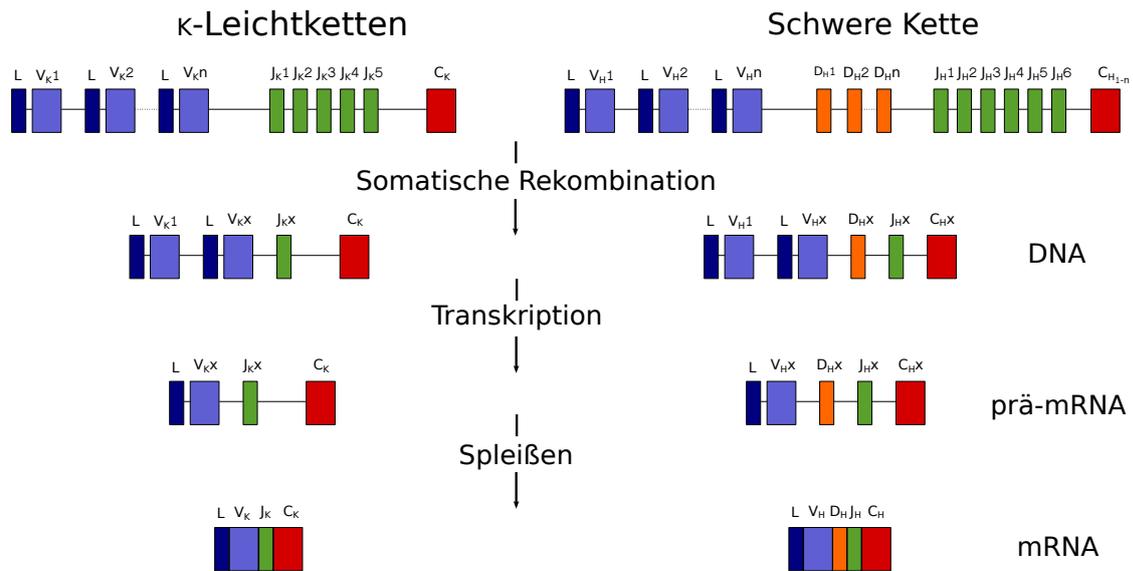
bzw.  $\epsilon$ . Die leichten Ketten können als  $\lambda$ - oder  $\kappa$ -Subtypen auftreten. Die  $\lambda$ - und  $\kappa$ -Subtypen unterscheiden sich in den konstanten Regionen und werden durch unterschiedliche Gencluster im Genom codiert. In dieser Arbeit wurden FLCs vom  $\kappa$ -Subtypen analysiert, weshalb sich die folgenden Erklärungen auf diesen Subtypen konzentrieren. Die  $\kappa$ -FLCs werden weiter je nach Sequenz der ersten Aminosäuren in der variablen Region in die Gruppen V-I (Variabel 1) bis V-V (Variabel 5) unterteilt.

### 1.1.2.2 Molekulare Genetik von Immunglobulinen

Die Gene für die schweren und leichten Ketten eines Antiköpers liegen auf unterschiedlichen Chromosomen verteilt [24]. Die Ketten der Immunglobuline werden dabei aus einer unterschiedlichen Anzahl von miteinander verbundenen Domänen hergestellt. Eine leichte Kette besteht aus zwei Domänen, die für den konstanten und variablen Teil der leichten Kette codieren. Im Gegensatz dazu ist die schwere Kette aus vier Domänen zusammengesetzt, wobei eine Domäne die variable Region und drei Domänen die konstante Region repräsentieren.

Die Gene für den variablen Teil einer Immunglobulinkette setzen sich aus einem Cluster von Segmenten zusammen. Das Gencluster für die schwere Kette besteht aus ca. 65 V (*Variable*)-, 27 D (*Diversity*)- und sechs J (*Joining*)-Segmenten, während die  $\kappa$ -Kette aus rund 40 V- und fünf J- und die  $\lambda$ -Kette aus etwa 30 V- und vier J-Segmenten aufgebaut sind [23]. Jedem V-Segment geht ein kurzes L (*Leader*)-Segment voran. Das D-Segment tritt spezifisch in den Genen der schweren Kette auf. Der typische Aufbau eines Immunglobulingenes ist in der Abbildung 1.2 dargestellt. Die anschließenden C (*Constant*)-Segmente sind spezifisch für die Subtypen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline.

Bei der Reifung der B-Plasmazellen kommt es zu einer Neuordnung der Gene. Dabei werden nahezu zufällig aus allen Segmenten ein C-, ein J-, ein D- (bei den schweren Ketten) und ein V-Segment ausgewählt, mittels Rekombination miteinander kombiniert und das dadurch entstehende Genprodukt für die Antikörperproduktion genutzt [24]. Durch die sehr große Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten der C-, J-, D- und V-Segmente ist eine hohe Antikörpervielfalt gewährleistet.



**Abbildung 1.2: Aufbau eines Immunglobulin-Gens.** Das Gencluster für die schwere Kette besteht aus V (Variable)-, D (Diversity)-, J (Joining)- und C (Constant)-Segmenten, während die κ-Kette aus V-, J- und C -Segmenten aufgebaut ist. Jedem V-Segment geht ein kurzes L (Leader)-Segment voran. Das D-Segment tritt spezifisch in den Genen der schweren Kette auf, während die C (Constant)-Segmente spezifisch für die Subtypen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline sind. Bei der Reifung der Plasmazellen kommt es zu einer somatischen Rekombination, sodass schließlich jeweils ein L-, V-, (D-), J- und C-Segment miteinander verbunden sind. Diese werden transkribiert, die mRNA prozessiert und anschließend translatiert.

Modifiziert nach Janeway [23]

## 1.2 Motivation

Bei der AL-Amyloidose kommt es zu einer Überproduktion von freien Antikörperleichtketten (FLC) infolge einer unkontrollierten Plasmazellvermehrung. Die FLCs akkumulieren miteinander zu unlöslichen Fibrillen und lagern sich in den Organen der Patienten ab, was zum Organversagen und damit zum Tod der Patienten führt. Auch bei Patienten mit Multiplen Myelom kommt es zu einer unkontrollierten Plasmazellvermehrung, die eine Überproduktion von Antikörpern oder deren Fragmente bewirkt. Allerdings zeigen die FLCs von Multiplen-Myelom-Patienten normalerweise keine Tendenz zur Selbstaggregation, da nur wenige Multiple-Myelom-Patienten zusätzlich eine AL-Amyloidose entwickeln, bei der sich die FLCs akkumulieren und ablagern.

Der Vergleich der FLCs von AL-Amyloidose-Patienten mit denen von Multiplen-Myelom-Patienten kann dazu beitragen, einen Einblick in die Ursachen der Proteinselbstaggregation

zu erhalten. Allerdings stellen die Aminosäuresequenzen ein großes Problem bei der Analyse von FLCs dar, da sich diese analog zu den Antikörpern durch eine sehr große Variabilität auszeichnen. Die Variabilität eines Antikörpers soll ein möglichst großes Abwehrpotential von Krankheitserregern gewährleisten, indem für jeden Krankheitserreger ein individueller Antikörper zur Bekämpfung vorhanden ist. Ein breites Repertoire an Antikörpern wird durch eine Vielfalt an Genen für die Antikörper sowie durch somatische Mutationen erreicht. Das Gencluster für die Aminosäuresequenz eines Antikörpers besteht dabei aus drei bzw. vier Segmenten bei der leichten bzw. schweren Kette. Für jedes Segment stehen mehrere verschiedene Gene zur Verfügung, deren Kombination individuelle Antikörper ermöglicht. Bei der Analyse von FLCs erschwert diese Varianz allerdings die Unterscheidung zwischen natürlicher Vielfalt und krankhaften Veränderungen.

Als Ursachen für die Aggregation der FLCs werden Unregelmäßigkeiten in den Aminosäuresequenzen und das Auftreten von posttranslationalen Modifikationen diskutiert. Allerdings konnte keine eindeutige Erklärung für die Selbstaggregation der bis jetzt untersuchten und in der Literatur beschriebenen FLCs gefunden werden [10]. Da die untersuchten FLCs keine eindeutigen Ursachen erkennen ließen, lässt sich vermuten, dass die Neigung zur Aggregation multifaktoriell ist. Darüber hinaus konzentrierten sich die Analysen auf eine sehr begrenzte Anzahl an unterschiedlichen FLCs aus Urinproben, wodurch eine begrenzte Aussagekraft der Ergebnisse erwartet wird. Allerdings ist die FLC-Analyse derart aufwendig, dass Hochdurchsatzuntersuchungen bis jetzt nicht durchführbar sind.

Die Suche nach Auffälligkeiten in den Aminosäuresequenzen wurde u. a. von Stevens *et al.* [25, 26] und Hurle *et al.* [27, 28] durchgeführt. Stevens *et al.* identifizierten die Stellen 27b, 31 und 61 als kritisch für die Ausbildung von amyloidogenen Strukturen: So erhöht der Verlust eines Isoleucins an der Stelle 27b sowie des Arginins an der Stelle 61 die Neigung zur Aggregation. Die Stelle 61 wurde auch von Hurle *et al.* als kritisch betrachtet. Als Erklärung führten diese den Verlust einer stabilisierenden Salzbrücke von dem Arginin 61 zur Asparaginsäure 82 auf. Zusätzlich erhöht nach Stevens *et al.* das Auftreten einer Asparaginsäure an der Stelle 31 die Tendenz zu amyloidogenen Ablagerungen.

Andere Gruppen konnten bei der Suche nach posttranslationalen Modifikationen Dimerisierungen, Fragmentierungen, *N*-Glykosylierungen, *S*-Cysteinylierung und *S*-Sulfonierungen bei AL-Amyloidose-Patienten identifizieren [10, 29–31]. U. a. zeigte Connors *et al.* [10] das Auftreten einer Sulfonierung am Cystein C214. Für FLCs von Multiplen-Myelom-Patienten wurden bis jetzt keine posttranslationalen Modifikationen beschrieben, da die meisten Gruppen sich bei der Ursachensuche für die Selbstaggregation auf AL-Amyloidose-Patienten beschränkten.

Für die FLC-Analysen nutzen nahezu ausnahmslos alle Gruppen die FLCs aus dem Urin von Patienten, da diese im Urin angereichert vorliegen und dadurch leichter isoliert werden können. Die Analyse von FLCs aus dem Knochenmarksüberstand wurde bis jetzt nicht beschrieben, da diese aus einer komplexeren Matrix aufgereinigt werden müssen, in der sie nicht die Hauptkomponente bilden. Deren Analyse erscheint aber gerade interessant, da diese im Knochenmark produziert wurden und daher weniger dem möglicherweise modifizierenden Einfluss des Körpers ausgesetzt waren.

### 1.3 Posttranslationale Modifikationen

Bei einer posttranslationalen Modifikation (PTM) handelt es sich um eine kovalente Veränderung von Proteinen, die co- oder posttranslational erfolgen kann und nicht im Genom codiert ist. Die Modifikation der Proteine kann dabei protein-, spezie- und gewebespezifisch sein. Eine PTM kann in Form einer Addition oder Abspaltung von chemischen Resten an einer Aminosäure, durch proteolytisches Prozessieren oder durch die Einführung einer Quervernetzung innerhalb des Polypeptides oder zwischen Peptidomänen erfolgen [32].

Die PTMs eines Proteins haben unter anderem Einfluss auf die Proteinstruktur, Halbwertszeit, Stabilität, Faltung, Proteinlokalisierung, Zell-Zell-Erkennung- und -Interaktion. Außerdem spielen sie eine große Rolle bei der Signaltransduktion und haben dadurch eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation von zellulären Prozessen, wie der Zellteilung, dem Wachstum, der Zelldifferenzierung und Apoptose. Eine PTM kann dabei reversibel oder irreversibel erfolgen. Posttranslationale Modifikationen sind bei eukaryotischen Zellen weit

verbreitet. Diese zeichnen sich mit über 300 bekannten Modifikationen durch eine enorme Vielfalt aus [33]. Die häufigsten PTMs stellen dabei die Disulfidbrücken, die Phosphorylierungen, die Sulfonierungen, die Acetylierungen sowie Glykosylierungen dar.

Die Detektion von PTMs kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Es existieren enzymatische, radioaktive, immunchemische und fluoreszenzbasierte Methoden zur Analyse von posttranslationalen Modifikationen. Darüber hinaus bietet sich die massenspektrometrische Analyse zur Charakterisierung an, bei der die Veränderung des Molekulargewichtes durch die PTM gemessen wird. Eine MS/MS-Analyse kann außerdem durch das Auftreten von charakteristischen Massedifferenzen Aussagen über die Lokalisation der PTM treffen.

### 1.3.1 Sulfonierung

Bei einer Sulfonierung handelt sich um eine PTM, bei der eine  $-SO_3$ -Gruppe auf das Peptid übertragen wurde. Eine Sulfonierung ist eine der bekanntesten enzymatischen Modifikationen bei endogenen Substanzen, z. B. bei Proteinen, Kohlenhydraten, Katecholaminen und Östrogensteroiden [34, 35]. Dabei wird die Sulfongruppe durch eine Sulfotransferase von dem Sulfongruppendonor 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf einen passenden Akzeptor übertragen. In der Gruppe der Sulfotransferasen sind sowohl cytosolische als auch GOLGI-gebundene Transferasen bekannt, die intrazelluläre Komponenten bzw. extrazelluläre Proteine sulfonieren. Die Sulfonierung tritt dabei als *O*-, *N*- oder *S*-Sulfonierung auf, wobei die *O*-Sulfonierung die am weitesten verbreitete darstellt [35].

Eine Sulfonierung hat eine monoisotopische Masse von  $79.9568 \text{ Da}^1$  und kann nach der *Unimod*-Datenbank [36] an einem Serin, Threonin, Tyrosin oder Cystein als posttranslationale Modifikation vorkommen. Die *Unimod*-Datenbank bietet eine Übersicht über bekannte Modifikationen. Neben den monoisotopischen Massen sind u. a. die Aminosäuren aufgeführt, an denen die Modifikation vorhanden sein kann. Alle sulfonierten Aminosäuren sind in dieser Arbeit als sX gekennzeichnet, wobei X die Aminosäure darstellt.

<sup>1</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=40](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=40)

### 1.3.2 Phosphorylierung

Eine Phosphorylierung stellt eine reversible Modifikation dar, bei der es zu der Übertragung einer  $\text{HPO}_3$ -Gruppe kam. Die Phosphorylierung eines Proteins gilt als eine der wichtigsten Mechanismen zur Regulation der intrazellulären Signaltransduktion, subzellulärer Lokalisation sowie dem Abbau von Proteinen [37,38], da diese zur Aktivierung oder Deaktivierung der Proteine führen kann. Man schätzt, dass bis zu 30 % aller eukaryotischen Proteine phosphoryliert vorliegen können [33].

Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung erfolgt dabei mit Hilfe von Kinasen bzw. Phosphatasen. Die Kinasen übertragen die  $\gamma$ -Phospho-Gruppe von einem ATP oder einem anderen Nukleosidtriphosphat auf das Protein. Die Übertragung kann als *O*-, *N*- und *S*-Phosphorylierung stattfinden, wobei die *O*-Phosphorylierung am weitesten verbreitet ist [37].

Die monoisotopische Masse einer Phosphorylierung beträgt 79.9663 Da und unterscheidet sich dadurch nur minimal von einer Sulfonierung. Ähnlich wie die Sulfonierung kommt eine Phosphorylierung hauptsächlich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin vor [38], allerdings können nach der *Unimod*-Datenbank in Ausnahmefällen auch die Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin, Cystein und Arginin phosphoryliert als posttranslationale Modifikation vorhanden sein<sup>2</sup>. Phosphorylierte Aminosäuren sind in dieser Arbeit als pX gekennzeichnet.

### 1.3.3 Methylierung

Bei einer Methylierung wird eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe von dem Methylgruppendonor *S*-Adenosylmethionin (SAM) durch Methyltransferasen auf die Peptidkette übertragen. Dabei kann die Übertragung auf alle nukleophilen *N*-, *O*-, *S*- und *C*-Gruppen an Aminosäuren erfolgen. Nach der *Unimod*-Datenbank kann eine Methylierung an einem Lysin, Arginin, Cystein, Histidin, Asparagin und Glutamin stattfinden. Die Methylierung am Lysin und Arginin stellt aber die bekannteste Methylierung dar. Die Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei der RNA-Prozessierung, der Regulation der Genexpression, der Signaltransduktion und der DNA-Reparatur sowie bei dem Zellwachstum und -differenzierung. Insbesondere die Methylierung

---

<sup>2</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=21](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=21)

von Histonen wurde in zahlreichen Veröffentlichungen als das Anwendungsbeispiel für eine Methylierung beschrieben. [39–44]

Die monoisotopische Masse einer Methylierung beträgt  $14.0157 \text{ Da}^3$ . Bei dieser handelt es sich um eine stabile Modifikation, die mittels Massenspektrometer und HCD-Fragmentierung analysiert werden kann. Methylierte Aminosäuren sind in dieser Arbeit als mX dargestellt.

### 1.3.4 O-GlcNAc-Glykosylierung

Bei einer O-GlcNAc-Glykosylierung kommt es zur Addition von einem N-Acetylglucosamin an ein Serin oder Threonin. Die Masse des Peptids erhöht sich dadurch um  $203.0794 \text{ Da}^4$ . Die O-GlcNAc-Glykosylierung stellt eine weitverbreitete Modifikation bei zytosolischen Proteinen sowie Kernproteinen dar und reguliert dabei biologische Prozesse wie die Transkription, die Translation, die Stressantwort von Zellen, die Apoptose sowie die Signaltransduktion. Außerdem gibt es Hinweise, dass die O-GlcNAc-Glykosylierung bei der Entstehung von Diabetes mellitus, bei neurodegenerativen sowie bei kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

Die O-GlcNAc-Modifikation ist eine reversible PTM, die durch O-GlcNAc-Transferasen erfolgt, während die Abspaltung der O-GlcNAc-Gruppe durch die O-GlcNAcase durchgeführt wird. Durch die Möglichkeit der reversiblen PTM dient die O-GlcNAc-Glykosylierung der Regulation der Proteinaktivität. [45–50]

### 1.3.5 Acetylierung

Bei einer Acetylierung kommt es zu einer Übertragung einer Acetylgruppe ( $\text{CH}_3\text{CO}-$ ) an den N-Terminus des Proteins oder an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins in der Peptidsequenz. Die Acetylierung ist dabei eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen. So schätzen u. a. Glozak *et al.* [51], dass 85 % der eukaryotischen Proteine eine Acetylierung tragen. Eine Acetylierung kann ähnlich der Phosphorylierung eine regulatorische Wirkung für die Zelle ha-

<sup>3</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=34](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=34)

<sup>4</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=43](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=43)

ben. So hat eine Acetylierung u. a. bei der Genexpression, der Translation, dem Cytoskelett, der Proteinstabilität, der Qualitätskontrolle bei Proteinen sowie bei dem Kern-Cytoplasma-Transport einen regulierenden Einfluss. Insbesondere die Acetylierung von Histonen zur Genregulation ist seit langem als Beispiel bekannt [37, 52–56].

Die irreversible *N*-terminale Acetylierung erfolgt durch das Enzym *N*-Acetyltransferase (NAT), während die Lysine durch die Lysin-Acetyltransferasen (KAT) reversibel acetyliert bzw. durch die Lysin-Deacetylasen (KDAC) deacetyliert werden. Da Histone die ersten bekannten Lysin-acetylierten Proteine darstellten, werden die KATs und KDACs häufig auch als Histon-Acetyltransferasen (HAT) bzw. Histon-Deacetylasen (HDAC) bezeichnet. Diese übertragen die Acetylgruppe vom Acetyl-Coenzym auf das Protein.

Die monoisotopische Masse einer Acetylierung beträgt 42.0106 Da<sup>5</sup>. Die *Unimod*-Datenbank beschreibt neben der *N*-terminalen und Lysin-Acetylierung zusätzlich die Möglichkeit der Acetylierung als PTM am Cystein, Serin und Threonin, allerdings werden in nahezu allen Veröffentlichungen nur die *N*-Terminale Acetylierung und die Acetylierung am Lysin erwähnt. Eine Acetylierung bleibt während einer CID-Fragmentierung stabil, weshalb die massenspektrometrische Analyse zur Identifikation und Lokalisation möglich ist [33]. Acetylierte Aminosäuren werden in dieser Arbeit als aX dargestellt.

### 1.3.6 Prozessbedingte Modifikationen

#### 1.3.6.1 Carbamidomethylierung

Zur Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse werden Proteine meist reduziert und alkyliert, um eventuell vorhandene Disulfidbrücken aufzulösen. Bei der Verwendung des Alkylierungsreagenzes Iodacetamid entsteht an den Cysteinresten die 57.0215 Da schwere Modifikation der Carbamidomethylierung<sup>6</sup>. Diese Modifikation wurde in dieser Arbeit als cX gekennzeichnet.

---

<sup>5</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=1](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=1)

<sup>6</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=4](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=4)

### 1.3.6.2 Oxidation

Eine Oxidation von Aminosäuren tritt meist als Addition eines Sauerstoffs auf, sodass nach einer Oxidation eine Massedifferenz von 15.9949 Da beobachtet werden kann. Nach der *Unimod*-Datenbank tritt eine Oxidation bei einer Asparaginsäure, Lysin, Asparagin, Prolin, Tyrosin, Arginin, Cystein und Glycin als posttranslationale Modifikation auf, während die Oxidation am Phenylalanin, Methionin, Histidin und Tryptophan ein Artefakt darstellt<sup>7</sup>. Oxidierte Aminosäuren werden in dieser Arbeit als oX markiert. In biologischen Systemen dient die Oxidation von bestimmten Aminosäuren als Antioxidant, um so die Auswirkungen von oxidativen Stress für die Zelle zu reduzieren [57–59].

## 1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die freien Antikörperleichtketten (FLC) aus dem Knochenmarksüberstand von Patienten mit Multiplen Myelom bzw. mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose-Beteiligung hinsichtlich des Auftretens von posttranslationalen Modifikationen (PTM) analysiert werden. Es gilt dabei sowohl die Identität als auch die Lokalisation der PTMs zu ermitteln. Für die Analysen stehen jeweils drei Patientenproben von jeder Gruppe zur Verfügung, welche dem  $\kappa$ -Subtypen angehören. FLCs vom  $\lambda$ -Subtypen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Für die Bereitstellung der FLCs für die massenspektrometrischen Messungen soll eine Aufreinigungsmethode etabliert werden. Diese soll die Isolierung der FLCs aus der komplexen Probenmatrix Knochenmarksüberstand gewährleisten, bei der die FLCs nicht das Hauptprotein bilden. Des Weiteren gilt es mit dieser Methode eine Reinheit der isolierten FLCs sicherzustellen, die eine massenspektrometrische Analyse ermöglicht.

In der Vorbereitung der massenspektrometrischen Messungen müssen die Aminosäuresequenzen der FLCs ermittelt werden, da sich die freien Antikörperleichtketten analog zu einem Antikörper durch eine große Variabilität in der Sequenz auszeichnen. Die Aminosäuresequenz

---

<sup>7</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=35](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=35)

einer FLC ist daher individuell für jeden Patienten, sodass diese nicht einer Datenbank entnommen werden können.

Die aufgereinigten FLCs sollen hinsichtlich des Auftretens von posttranslationalen Modifikationen mit Hilfe von MS/MS-Spektren analysiert werden. Die Spektren gilt es hinsichtlich Sulfonierungen, Methylierungen, Acetylierungen und Glykosylierungen zu untersuchen.

Außerdem sollen die FLC-Aminosäuresequenzen statistisch auf die Verteilung der Aminosäuren an jeder Stelle in der FLC-Sequenz analysiert werden. Es gilt Unterschiede in den relativen Häufigkeiten von einzelnen Aminosäuren zu identifizieren, die spezifisch den Patientengruppen Multiples Myelom, AL-Amyloidose oder Multiples Myelom mit AL-Amyloidose-Beteiligung bzw. einer Kontrollgruppe zugeordnet werden können. Zur Erhöhung der statistischen Signifikanz sollen neben den Sequenzen aus dieser Arbeit die FLC-Sequenzen aus der *AL-Base*-Datenbank [60] verwendet werden, die einer der vier Subgruppen zugeordnet werden können.

## 2 Massenspektrometrie

### 2.1 Allgemeines Prinzip

Die Massenspektrometrie entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Instrument in der Proteom-Forschung, die unter anderem die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen in komplexen Gemischen sowie die Ermittlung einer Proteinsequenz oder auch die Erforschung von posttranslationalen Modifikationen ermöglicht [61]. Ein Massenspektrometer ist dabei ein hochpräzises und sensitives Instrument zur qualitativen und quantitativen Analyse, bei dem Ionen nach deren Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt werden [62].

Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Für die Ionisation werden unter anderem das *Fast Atom Bombardment* (FAB), die Elektronenstoß (EI)-, die chemische (CI) bzw. die Elektrosprayionisation (ESI) sowie die matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) genutzt. Bei der Elektrosprayionisation und der MALDI handelt es sich um sehr sanfte Ionisierungsmethoden, die die Ionisierung von großen Biomolekülen ermöglichen und dadurch in der Proteomics weit verbreitet sind. Als Massenanalysatoren können Quadrupols, Ionenfallen, Flugzeitanalysatoren (ToF) sowie magnetische und elektrische Sektorfelder eingesetzt werden. Im Bereich des *Life Sciences* hat sich insbesondere die Verwendung der Orbitrap, der Ionenfalle, des Quadrupols und des Flugzeitanalysators durchgesetzt [63–65].

Ein wichtiger Bestandteil der massenspektrometrischen Analyse ist die Anwendung der Tandem-Massenspektrometrie, welche auch als MS<sub>n</sub> bezeichnet wird. Bei dieser werden mehrere Massenanalysatoren miteinander kombiniert, sodass eine mehrstufige massenspektrometrische Analyse von Ionen möglich ist. Bei der Tandem-Massenspektrometrie können

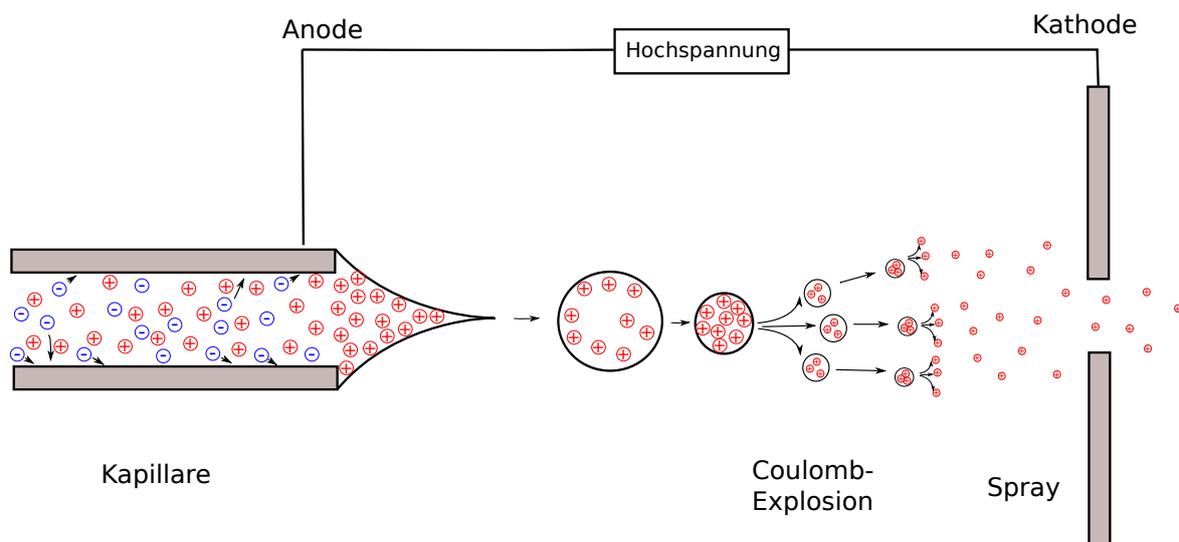
Ionen in einem ersten Massenanalysator isoliert werden, anschließend können ausgewählte Ionen fragmentiert und die entstandenen Fragment-Ionen in einem weiteren Massenanalysator untersucht werden. Bei der *Tandem-In-Time*-MSn-Analyse werden sowohl die MS- als auch die MSn-Analysen zeitlich versetzt in einem Massenanalysator durchgeführt. Insbesondere die Ionenfalle ist dafür geeignet. Die Tandem-Massenspektrometrie erlaubt die Strukturaufklärung von Molekülen, eine *De-novo*-Sequenzierung von Peptiden sowie die Identifikation und Lokalisation von posttranslationalen Modifikationen. Bei der Tandem-Massenspektrometrie können und werden unterschiedliche Massenanalysatoren miteinander kombiniert. Im Bereich der Proteomics haben sich insbesondere die Verbindung eines Quadrupols mit einem Flugzeitanalysator zum sogenannten QToF, die Kombination aus drei Quadrupols zum Triple Quad (TQ) sowie die Verwendung einer linearen Ionenfalle zusammen mit einer Orbitrap (LTQ Orbitrap) bewährt.

## 2.2 Ionenquellen

Die Aufgabe einer Ionisierungsquelle ist die Ionisierung und Überführung von Molekülen in die Gasphase. Je nach Ausgangsaggregatzustand und Empfindlichkeit der Probe haben sich hierfür unterschiedliche Ionisierungsmethoden etabliert.

### 2.2.1 ESI

Die Elektrosprayionisation kann als Infusion, Nanospray oder in Kombination mit einer Flüssigchromatographie angewendet werden. Bei der ESI können geladene Moleküle, thermisch labile und große Biomoleküle aus einer Analyselösung desolvatisiert und dadurch in die Gasphase überführt werden. Für den Desolvatisierungsvorgang wird die Analytlösung mit Hilfe einer dünnen leitfähigen Kapillare versprüht. Des Weiteren wird zwischen der Kapillare und dem Massenspektrometer eine elektrische Spannung angelegt, deren Polung je nach Messmodus variiert. Eine schematische Darstellung der Elektrosprayionisation für Kationen ist in der Abbildung 2.1 demonstriert. Bei der Analyse von Kationen stellt die Kapillare die Anode und das Massenspektrometer die Kathode dar, zu denen die Kationen der Lösung beschleunigt werden. Die Anionen der Analytlösung werden an der positiv geladenen Kapillare oxidiert und damit neutralisiert, wodurch eine kationische Analyselösung entsteht. Die

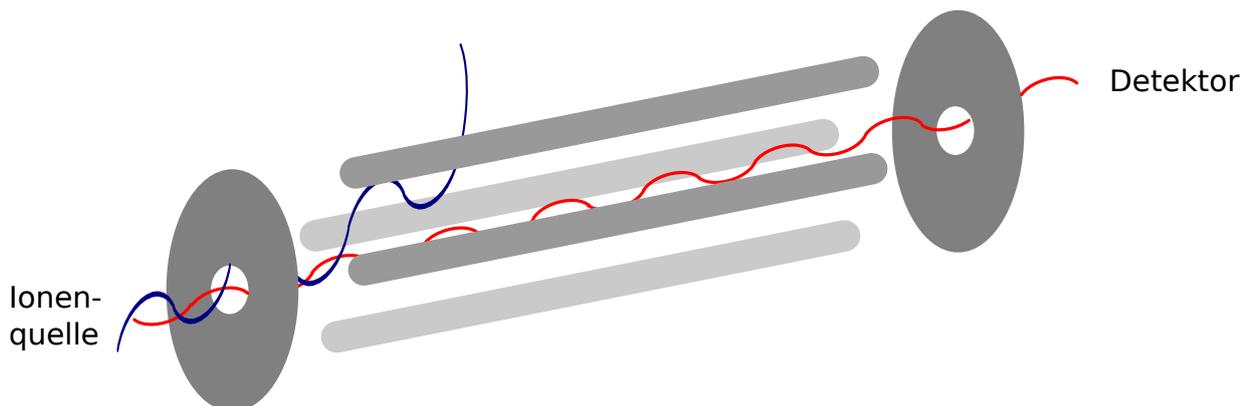


**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation (ESI) für den Positiv-Modus zur Detektion von Kationen.** Die Kationen werden durch das elektrische Feld aus der Kapillare zu der Elektrode im Massenspektrometer gezogen. Das Flüssigkeitsfilament zerfällt mit zunehmendem Abstand zur Kapillare in kleine Tröpfchen, die durch Evaporation des Lösungsmittels kleiner werden und schließlich bei der Coulomb-Explosion in kleinere Tröpfchen zerspringen. Dieser Vorgang wiederholt sich bis einzelne Ionen in die Gasphase übergegangen sind. Modifiziert nach Lottspeich [37]

Kationen werden durch das elektrische Feld aus der Kapillare zu der Elektrode im Massenspektrometer gezogen und bilden dabei den sogenannten Taylor-Konus, der in einem dünnen Filament mündet. Das Flüssigkeitsfilament zerfällt mit zunehmendem Abstand zur Kapillare in kleine Tröpfchen, die durch Evaporation des Lösungsmittels kleiner werden, was zu einer Vergrößerung der Ladungsdichte führt. Übersteigen die abstoßenden Coulomb-Kräfte die Oberflächenspannung der Tröpfchen, zerspringen diese in kleinere Tröpfchen in der sogenannten Coulomb-Explosion. Dieser Vorgang wiederholt sich bis einzelne Ionen in die Gasphase übergegangen sind. Die Evaporation des Lösungsmittels kann zusätzlich durch die Zufuhr von Wärme und durch die Verwendung eines Vernebelungsgases beschleunigt werden.

## 2.3 Massenanalytoren

Alle Massenanalytoren trennen die Ionen nach deren  $m/z$ -Verhältnis. Dazu separieren sie die Ionen aufgrund von unterschiedlichen Flugzeiten, unterschiedlichem Verhalten im elektrischen bzw. magnetischen Feld oder durch die selektive Ejektion von Ionen aus einem

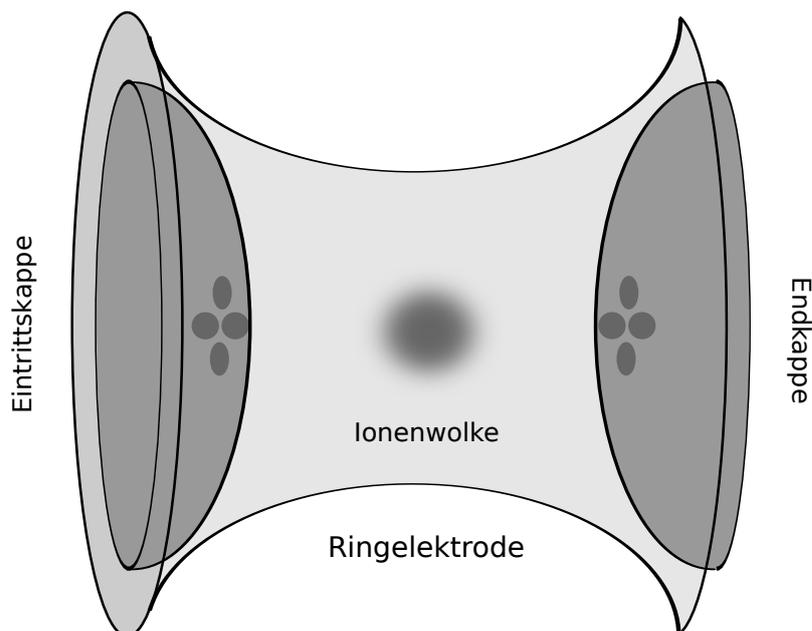


**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Quadrupols.** Ein Quadrupol besteht aus vier parallelen hyperbolisch geformten stabähnlichen Elektroden, an denen sowohl eine Wechsel- als auch Gleichspannung anliegt. Dabei weisen gegenüberliegende Elektoden die gleiche Polung und Phase auf, während nebeneinanderliegende Elektroden die entgegengesetzte Polung und eine um  $180^\circ$  verschobene Phase zeigen. Gelangen Ionen von der Ionenquelle in den Quadrupol, bewegen sie sich aufgrund der elektrischen Wechselwirkungen auf Trajektorien durch den Quadrupol. In Abhängigkeit der gewählten Gleich- und Wechselspannung gelangen nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$  auf stabilen Bahnen durch den Quadrupol (roter Ionenstrahl). Andere berühren eine Elektrode, werden dadurch neutralisiert und durch ein Vakuum abgezogen (blauer Ionenstrahl).  
Modifiziert nach El-Aneed [62]

dreidimensionalen Einfangfeld [61]. Die verschiedenen Massenanalysatoren arbeiten ähnlich wie die Ionisierungsquellen im kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Modus, weshalb klassischerweise die beliebige Kombination von Ionisierungsquellen und Massenanalysatoren nur eingeschränkt möglich war. So wurden und werden die MALDI typischerweise mit Flugzeitanalysatoren und ESI mit Ionenfallen und Quadrupolen kombiniert. Neuere technische Entwicklungen ermöglichen jedoch nahezu jede Kombination aus Ionisierungsquelle und Massenanalysator [61].

### 2.3.1 Quadrupol

Der Quadrupol ist ein Massenfilter, der aus vier parallelen hyperbolisch geformten stabähnlichen Elektroden besteht, wie sie in der Abbildung 2.2 dargestellt sind. An den Elektroden liegt sowohl ein Gleich- als auch ein Wechselspannungsfeld an, wobei gegenüberliegende Elektroden die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung aufweisen. Nebeneinanderliegende Elektroden haben eine entgegengesetzte Polarität und eine um  $180^\circ$  verschobene Phase der Wechselspannung.



**Abbildung 2.3: Aufbau einer Ionenfalle.** Diese besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, in denen sich kleine Öffnungen zum Ein- und Auslass der Ionen befinden. Im Inneren der Ionenfalle bewegen sich die Ionen in Abhängigkeit des  $m/z$ -Verhältnisses auf stabilen Kreisbahnen. Modifiziert nach Lottspeich [37]

Ionen aus der Ionisierungsquelle interagieren mit dem elektrischen Feld des Quadrupols und bewegen sich auf komplexen Oszillationen durch den Quadrupol. Dabei gelangen bei einer bestimmten Kombination aus Gleich- und Wechselspannung nur Ionen mit einem spezifischen  $m/z$  auf stabilen Bahnen durch den Quadrupol zu dem Detektor, an welchem sie registriert werden können. Andere Ionen berühren die Elektroden, werden an diesen neutralisiert und im anliegenden Vakuum abgezogen. Durch das Scannen von verschiedenen Gleich- und Wechselspannungskombinationen kann der Ionenstrahl auf sämtliche  $m/z$  nacheinander abgesucht werden.

### 2.3.2 Ionenfalle

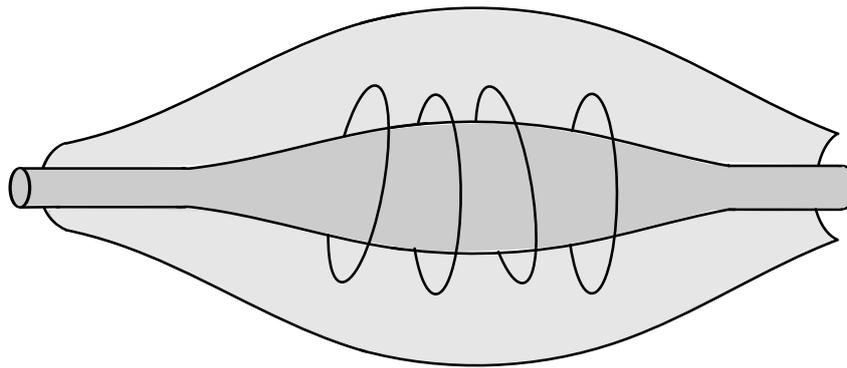
Eine Ionenfalle dient dem Einfangen von Ionen und deren massenspektrometrischen Analyse. Dabei arbeitet sie nach einem ähnlichen Prinzip wie der Quadrupol. Eine Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an die eine elektrische Wechselspannung angelegt wird. In den Endkappen existieren kleine Öffnungen zum Ein- bzw. Auslass der Ionen. Eine bildliche Darstellung einer Ionenfalle befindet sich in der Abbildung 2.3. Aufgrund des

elektrischen Feldes bewegen sich die Ionen in der Ionenfalle auf stabilen Bahnen. Im Gegensatz zum selektiven Quadrupol wird der Betrag der Gleich- und Wechselspannung so gewählt, dass sich möglichst viele Ionen auf stabilen Bahnen bewegen können. Nach dem Stabilitätsdiagramm der Mathieuschen Gleichung ist dies im Wechselspannungsmodus (*rf-only*-Modus) besonders gut möglich. Durch die Variation der angelegten Wechselspannung verlassen einzelne Ionen  $m/z$ -spezifisch die stabilen Bahnen und damit die Ionenfalle und können im Anschluss daran detektiert werden. Durch einen kontrollierten Wechsel der angelegten Spannung können die Ionen nach deren  $m/z$ -Verhältnis gescannt werden.

Die Ionenfalle existiert auch als lineare Ionenfalle. Dabei handelt es sich um einen Quadrupol, an dessen Enden eine zusätzliche Spannung anliegt, wodurch die Ionen den Quadrupol nicht verlassen können. Eine lineare Ionenfalle wird häufig als Speicherzelle zur Lagerung und Anreicherung von Ionen genutzt.

Mit der Ionenfalle ist eine MS<sub>n</sub>-Analyse möglich, bei der theoretisch unendlich viele MS-Stufen eines Vorläuferions untersucht werden können. Dazu werden alle Ionen mit Ausnahme des Vorläuferions aus der Falle entfernt, ein Kollisionsgas eingeleitet und die entstandenen Fragment-Ionen mit der Ionenfalle analog zur MS<sub>1</sub>-Messung analysiert. Dieser Vorgang kann beliebig wiederholt werden. Allerdings stehen aufgrund der Selektion der Vorläuferionen für jeden weiteren Vorgang weniger Ionen zur Verfügung, sodass irgendwann die Sensitivität der Ionenfalle nicht mehr ausreichend ist.

Ein Problem der Ionenfalle stellt der *low mass cut-off* dar. Bei der Fragmentierung eines Vorläuferions in einer Ionenfalle wird eine Wechselspannung gewählt, die ausreichend Energie für den Fragmentierungsschritt zur Verfügung stellt. Bei einer ausreichend großen Wechselspannung bewegen sich Ionen mit einem kleineren  $m/z$  als  $1/3$  des  $m/z$  des Vorläuferions nicht auf stabilen Bahnen und können dadurch nicht detektiert werden [66]. In der Peptid- und PTM-Analytik kann dieser *low mass cut-off* zum Problem werden, da Fragment-Ionen und Immonium-Ionen mit kleinen  $m/z$  zur Identifizierung und Lokalisierung von posttranslationalen Modifikation notwendig sein können.



**Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau einer Orbitrap.** Eine Orbitrap besteht aus einer Zentralelektrode, die von zwei Außenelektroden umschlossen wird. Die Ionen in einer Orbitrap bewegen sich aufgrund des Gleichgewichtes aus anziehenden elektrostatischen Kräften und der Zentrifugalkraft auf elliptischen Trajektorien um die Zentralelektrode. Modifiziert nach Hu [67]

### 2.3.3 Orbitrap

Eine Orbitrap ist eine Ionenfalle, bei der die Ionen durch ein elektrostatisches Feld auf Bahnen gehalten werden. Sie besteht aus einer Zentralelektrode, die von zwei Außenelektroden umschlossen wird. Eine schematische Darstellung einer Orbitrap ist in der Abbildung 2.4 dargestellt. Die Ionen in einer Orbitrap bewegen sich aufgrund des Gleichgewichtes aus anziehenden elektrostatischen Kräften und der Zentrifugalkraft auf elliptischen Trajektorien um die Zentralelektrode.

Für die massenspektrometrische Analyse von Ionen nutzt die Orbitrap die axialen Oszillationen der Ionen, deren Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  abhängig vom  $m/z$ -Verhältnis ist. Der Zusammenhang ist in der Gleichung 2.1 beschrieben, wobei  $k$  eine gerätespezifische Konstante ist.

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \quad (2.1)$$

Die axialen Oszillationen werden detektiert und mit Hilfe der Fourier-Transformation den einzelnen  $m/z$  zugeordnet, wodurch Rückschlüsse auf vorhandene Ionen in der Analyselösung möglich sind.

Die Injektion der Ionen in die Orbitrap erfolgt mit Hilfe der *C-Trap*, welche die Ionen sammelt, abkühlt und diese stoßweise in die Orbitrap überführt. Bei der *C-Trap* handelt es sich um einen Quadrupol, der im *rf-only*-Modus betrieben wird. Prinzipiell ist in der Orbitrap eine Fragmentierung der Ionen möglich. Allerdings wird diese meist in der *C-Trap* durchgeführt, da diese auch eine HCD-Fragmentierung ermöglicht. Bei neueren Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometern findet die Fragmentierung in einer separaten HCD-Zelle statt und die *C-Trap* wird nur als Ionenanreicherungsstelle vor der MS-Messung verwendet.

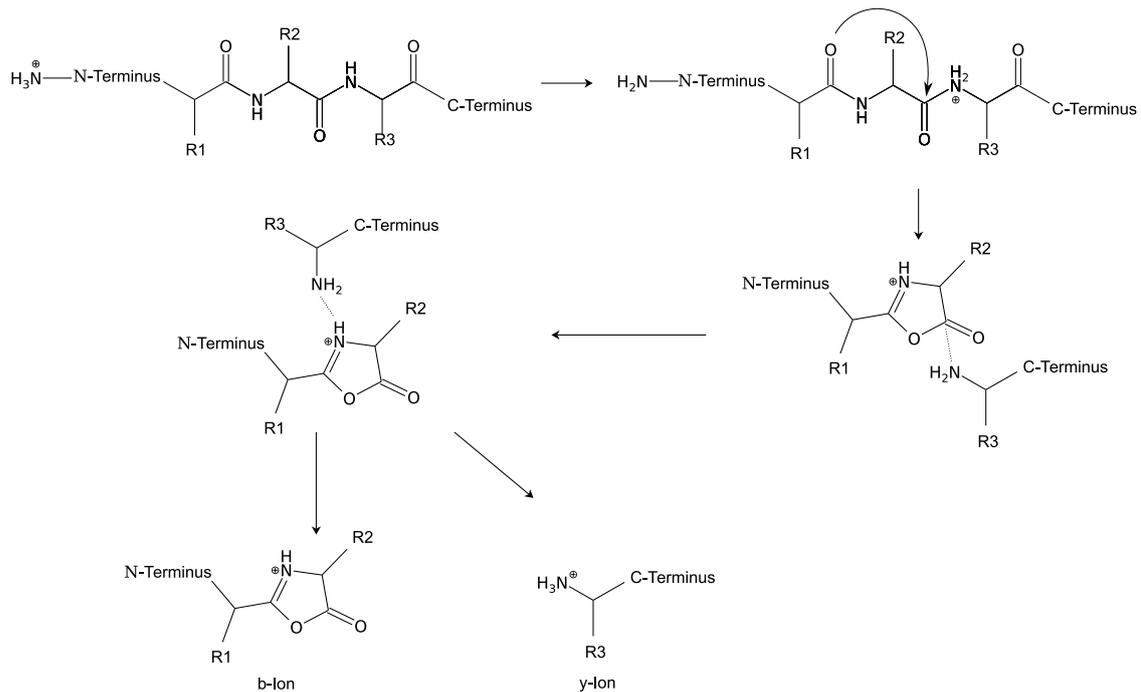
## 2.4 Fragmentierung

Bei der MS/MS-Analyse werden Vorläufer-Moleküle ausgewählt, fragmentiert und erneut massenspektrometrisch vermessen. Die Dissoziation der Vorläufer-Moleküle erfolgt meist durch Zugabe von Energie, welche u. a. in Form einer Kollision mit einem Gas, durch Kollision mit einer Oberfläche oder durch Photonenadsorption möglich ist [68].

### 2.4.1 Kollisionsinduzierte Fragmentierung von Peptiden

In der Peptid- und Proteinanalytik kommt am häufigsten die CID-Fragmentierung zur Anwendung [69]. Die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) wird auch als kollisionsaktivierte Dissoziation (CAD) bezeichnet. Dabei werden protonierte Vorläuferionen mit der Hilfe eines elektrischen Feldes beschleunigt und kollidieren im Anschluss daran mit einem neutralen inerten Gas. Am häufigsten wird hierfür Stickstoff verwendet. Die Translationsenergie wird bei dem Aufprall in Vibrationsenergie umgewandelt, welche sich gleichmäßig auf das Vorläufer-Molekül verteilt. Bei dem Übersteigen der Bindungsenergie kommt es zum Bruch der Bindung, wobei die schwächste Bindung als erstes bricht. Bei einem Peptid ist die Amidbindung häufig die schwächste Bindung, wodurch bei einer CID-Peptidfragmentierung  $\gamma$ - und  $b$ -Ionen entstehen. Der Mechanismus für den Bindungsbruch ist in der Abbildung 2.5 schematisch dargestellt. [70–72]

Die Position des Bindungsbruches wird häufig anhand des Mobilien-Proton-Modells erklärt [73]. Dies besagt, dass sich Protonen zufällig über das Molekül des Vorläuferions verteilen und der Bindungsbruch an dem Aufenthaltsort des Protons stattfindet. Bei dem Vorhanden-

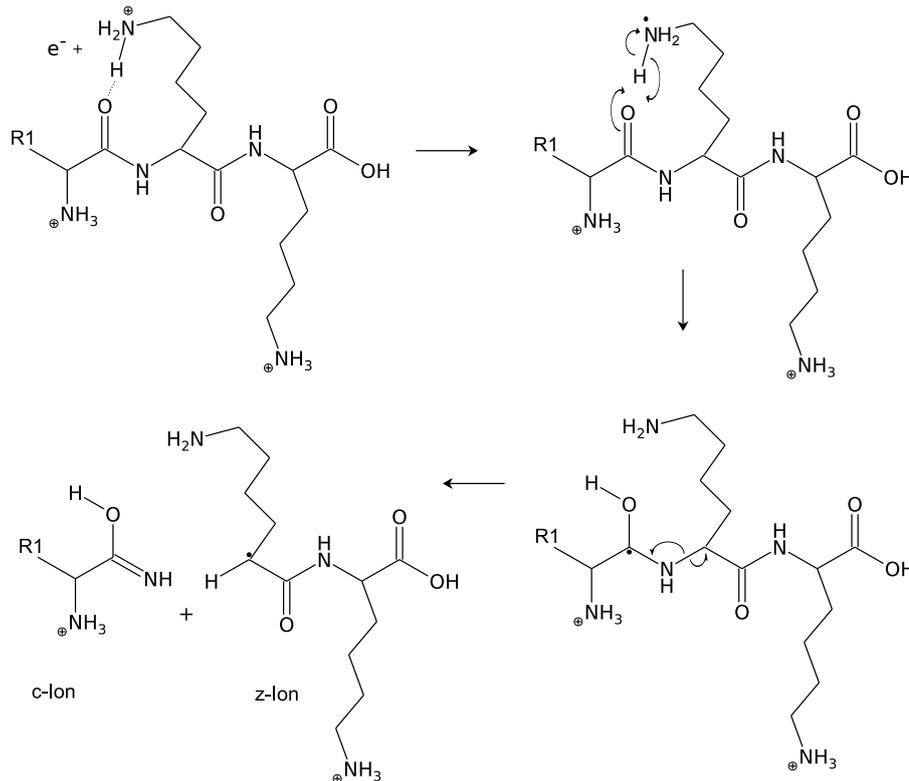


**Abbildung 2.5: Fragmentierungsmechanismus CID.** Bei der CID von Peptiden entstehen b- und y- Ionen. Die Position des Bindungsbruches wird häufig anhand des Mobilen-Proton-Modells erklärt, nach der sich Protonen zufällig über das Vorläufer-Molekül verteilen und der Bindungsbruch an dem Aufenthaltsort des Protons stattfindet. Modifiziert nach Paizs *et al.* [72]

sein von basischen Aminosäuren kommt es zur Akkumulation der Protonen an den basischen Aminosäuren, sodass es an diesen Stellen zum vermehrten Bindungsbruch kommt. In Folge dessen sind lückenhafte y- und b-Serien vorhanden.

Bei dem Vorhandensein von PTMs an dem Peptid konkurrieren die PTM-Peptid-Bindungen mit den Amidbindungen um das Proton. Bei besonders elektronegativen PTMs, wie der Sulfonierung oder der Phosphorylierung, ist der Bindungsbruch an der PTM-Peptid-Bindung wahrscheinlicher als an der Amidbindung, sodass diese CID-Spektren häufig nur das Vorläuferion ohne PTM sowie vereinzelte y- und b-Ionen enthalten [74].

Eine Sonderform der CID stellt die HCD-Fragmentierung (*Higher-energy Collisional Dissociation*) dar. Bei dieser wird eine höhere Wechsellspannung an die Kollisionszelle angelegt, wodurch die Ionen auf höhere Energien beschleunigt werden. Aufgrund der höheren Aktivierungsenergie zeigen die Ionen bei der HCD nach der Kollision häufiger ein besseres Fragmentierungsmuster als nach der CID.



**Abbildung 2.6: Fragmentierungsmechanismus ECD.** Bei der ECD-Fragmentierung reagiert ein Elektron mit niedriger Energie mit dem Vorläuferion unter Bildung von  $z$ -,  $z+1$ - und  $c$ -Ionen durch den Bruch der  $C_\alpha$ -N-Bindung. Modifiziert nach Syka [74]

## 2.4.2 ECD/ETD

Bei der Elektroneneinfangdissoziation (ECD: *Electron Capture Dissociation*) reagiert ein Elektron mit niedriger Energie (*near thermal electron*) mit dem Vorläuferion unter Bildung von  $z$ -,  $z+1$ - und  $c$ -Ionen durch Bruch der  $C_\alpha$ -N-Bindung [70,71,75,76]. Bei dem  $z+1$ -Ion kam es im Vergleich zum  $z$ -Ion zu einer Umlagerung eines H-Atoms. Da beide den C-terminalen Teil des Peptides abbilden, werden diese im Ergebnisteil als  $z/z+1$ -Ionen zusammengefasst.

Der ECD-Fragmentierungsmechanismus ist in der Abbildung 2.6 dargestellt. Dieser ist unabhängig von der Rückgratprotonierung, wodurch es zu keiner Konkurrenz mit einer posttranslationalen Modifikation kommt. ECD-Spektren zeichnen sich deshalb durch bessere  $z/z+1$ - und  $c$ -Ionen-Serien aus, dessen Ionen meist auch eine labile PTM wie die Sulfonierung beinhalten [74].

Bei der ETD-Fragmentierung (*Electron Transfer Dissociation*) werden radikalische Anionen verwendet, die ein Elektron auf das Vorläuferion übertragen. Insbesondere die Anionen Anthrazen und Azobenzen kommen hierbei zur Anwendung. Der Reaktionsmechanismus ist analog zur ECD-Fragmentierung, wodurch auch bei der ETD-Fragmentierung  $z^-$ ,  $z+1^-$  und  $c^-$ -Ionen erwartet werden.

## 2.5 PTM-spezifisches Fragmentierungsverhalten

### 2.5.1 Sulfonierung

Die massenspektrometrische Analyse von Sulfonierungen kann sowohl im CID- als auch ETD-Modus durchgeführt werden. Dabei kann ein charakteristisches Verhalten in Abhängigkeit der gewählten Fragmentierungsmethode beobachtet werden. Bei der Sulfonierung handelt es sich um eine labile posttranslationale Modifikation, die bei einer CID-Fragmentierung abgespalten wird. Ein CID-Spektrum eines sulfonierten Peptids zeichnet sich deshalb durch das Vorhandensein des Vorläuferions mit einem Neutralverlust von 79.9568 Da ( $-\text{SO}_3$ , im folgenden 80 Da genannt) sowie durch  $y^-$ - und  $b^-$ -Ionen aus, die ebenfalls einen Neutralverlust von 80 Da aufweisen [35].

Bei der sanfteren ETD-Fragmentierung bleibt eine Sulfonierung erhalten und in den Spektren befinden sich sulfonierte  $z/z+1^-$ - und  $c^-$ -Ionen [77]. Durch den Verlust der Sulfonierung während der CID-Fragmentierung kann in diesem die Position der Sulfonierung nicht bestimmt werden. Da sie aber ein von der gleich schweren Phosphorylierung abweichendes Verhalten zeigt, kann mit Hilfe der CID-Spektren zwischen diesen beiden Modifikationen unterschieden werden. Eine Lokalisation der PTM ist dann mit Hilfe der ETD-Spektren möglich, da in diesen sulfonierte Ionen zu finden sind.

### 2.5.2 Phosphorylierung

In der massenspektrometrischen Analyse zeigt die Phosphorylierung sowohl für die CID- als auch die ETD-Messung ein charakteristisches Verhalten. Analog zur Sulfonierung handelt es sich bei der Phosphorylierung um eine labile Modifikation, die häufig bei einer CID-Frag-

mentierung abgespalten wird. Dabei kommt es durch eine  $\beta$ -Eliminierung zum Verlust der  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Gruppe (98 Da). CID-Spektren mit phosphoryliertem Threonin oder Serin zeichnen sich deshalb häufig durch einen Hauptpeak aus, der dem Vorläuferion mit einem Neutralverlust von 98 Da entspricht. In seltenen Fällen tritt auch das Vorläuferion ohne Neutralverlust auf. Bei einem phosphorylierten Tyrosin kann es aufgrund des aromatischen Ringes zu keiner  $\beta$ -Eliminierung kommen, weshalb in dessen CID-Spektren meist das Vorläuferion ohne Neutralverlust vorhanden ist. Es kann allerdings auch zum Auftreten des Vorläuferions mit einem Neutralverlust von 80 Da ( $\text{HPO}_3$ ) kommen. Die y- und b-Ionen bei einer Phosphorylierung existieren unabhängig von der phosphorylierten Aminosäure in einem CID-Spektrum entweder mit der PTM oder mit einem Neutralverlust von 98 Da. Im Gegensatz dazu kommen in einem ETD-Spektrum die z/z+1- bzw. c-Ionen ohne Neutralverlust inklusive der PTM vor, wodurch eine Lokalisierung der posttranslationalen Modifikation erfolgen kann [38, 78–82].

Eine Abgrenzung zwischen der Sulfonierung und der fast gleich schweren Phosphorylierung kann mit Hilfe der CID-Spektren anhand der Vorläuferionen sowie y- und b-Ionen erfolgen, die einen charakteristischen Neutralverlust zeigen. So kommen bei einer Sulfonierung die Vorläuferionen mit einem Neutralverlust von 80 Da vor, während bei der Phosphorylierung diese mit der PTM oder mit einem Neutralverlust von 98 Da auftreten. Eine Ausnahme bildet hier das phosphorylierte Tyrosin, das sich ähnlich zu einer Sulfonierung in einem Neutralverlust von 80 Da äußern kann. Allerdings kann anhand der y- und b-Ionen eindeutig zwischen den beiden Modifikationen unterschieden werden, da diese bei der Sulfonierung mit einem Neutralverlust von 80 Da und bei der Phosphorylierung von 98 Da auftreten. Zusätzlich kann die Abgrenzung bei einem Tyrosin durch das diagnostische Ion von 216.04 Da stattfinden, welches nur bei einer Phosphorylierung zu finden ist [32] und dem Immonium-Ion des phosphorylierten Tyrosins entspricht.

### 2.5.3 O-GlcNAc-Glykosylierungen

Die O-GlcNAc-Glykosylierung stellt ähnlich der Sulfonierung eine labile posttranslationale Modifikation dar, welche bei einer kollisionsinduzierten Fragmentierung während einer massenspektrometrischen Messung abgespalten wird. Die Identifizierung der O-GlcNAc-

PTM kann jedoch neben der Erhöhung der Vorläufermasse um 203.0794 Da durch das Auftreten der spezifischen diagnostischen Ionen 204.0872, 186.0766, 168.0661, 144.0661, 138.0555 sowie 126.0555 erfolgen. Durch den Verlust der GlcNAc-Gruppe während der CID-Fragmentierung kann die PTM nicht lokalisiert werden. Die Position der Glykosylierung kann jedoch mit Hilfe einer ETD-MS-Messung erfolgen, da die GlcNAc-Gruppe während der ETD-Fragmentierung erhalten bleibt. [45]



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Allgemeines Vorgehen

Zur Charakterisierung von freien Leichtketten und zur Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen bei Patienten mit Multiplen Myelom bzw. bei Patienten mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose-Beteiligung wurden sechs Patienten ausgewählt, von denen jeweils drei der jeweiligen Gruppe zugeordnet werden können. Von den Patienten wurde das Material einer Knochenmarkbiopsie verwendet, welches durch Zentrifugation in zellfreien Überstand und zellhaltigen Bodensatz getrennt wurde. Aus den jeweiligen Bodensätzen wurden die Myelomzellen isoliert, aus diesen die mRNA extrahiert und von dieser mittels PCR die Gensequenz der übermäßig produzierten FLC mit Hilfe von FLC-spezifischen Primern abgeleitet. Die resultierenden Gensequenzen wurden in die Aminosäuresequenzen umgewandelt und die erhaltenden Sequenzen mittels massenspektrometrischer Messung verifiziert.

Die zellfreien FLC-haltigen Überstände wurden für die Analyse von posttranslationalen Modifikationen genutzt. Dazu wurden die FLCs mittels Affinitätschromatographie isoliert, diese mit Trypsin und Chymotrypsin verdaut und anschließend mittels Orbitrap massenspektrometrisch auf das Auftreten von PTMs untersucht. Für die Sequenzverifizierung und die Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen wurde die HCD-Fragmentierung gewählt. Zusätzlich wurde von den trypsinverdauten Peptidproben eine ETD-Messung zur Lokalisation von PTMs durchgeführt.

## 3.2 Geräte und Materialien

### 3.2.1 Probenisolierung

#### Affinitätschromatographie

##### Geräte

Thermomixer:	<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf
Zentrifuge:	<i>EBA 12</i>	Hettich
UV/Vis-Spektrometer:	<i>UV/Vis-Spektrometer Lambda EZ 210</i>	PerkinElmer
Vakuumentrifuge1:	<i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf

##### Materialien

Kopplungskit:	<i>MicroLink™-Protein-Coupling-Kit</i>	Thermo Scientific
Affinitätschromatographiesäulen:	<i>AminoLink®-Plus-Coupling-Resin-Spin-Säulen</i>	aus Kopplungskit
<i>Coupling</i> -Puffer:	0.1 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 0.15 M NaCl, pH 7.2	aus Kopplungskit
<i>Quenching</i> -Puffer:	1 M Tris-HCl, 0.05 % NaN <sub>3</sub> , pH 7.4	aus Kopplungskit
Natriumborhydrid-Lösung:	5 M Natriumborhydrid-Lösung gelöst in 0.01 M NaOH	aus Kopplungskit
Waschpuffer1:	1 M NaCl, 0.05 % NaN <sub>3</sub>	aus Kopplungskit
Waschpuffer2:	0.5 M NaCl, 0.025 % NaN <sub>3</sub>	1:1 Waschpuffer1: H <sub>2</sub> O
Elutionspuffer:	Enthält primäre Amine, pH 2.8	aus Kopplungskit
Tris-HCl-Lösung:	1 M Tris-HCl	Sigma
Anti-κ-Antikörper-Lösung:	<i>Sheep-Anti-Human-κ-Antikörper</i> (1.0 mg/ml)	The Binding Site, Birmingham, UK
BCA-Protein-Test:	<i>Pierce®-BCA-Protein-Assay-Kit</i>	Thermo Scientific
BCA-Reagenz A:	enthält Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , Bicinchoninsäure ((HO <sub>2</sub> CC <sub>9</sub> H <sub>5</sub> N) <sub>2</sub> ), Natriumtartrat (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> ) in 0.1 M NaOH	aus BCA-Test-Kit
BCA Reagent B:	enthält 4 % CuSO <sub>4</sub>	aus BCA-Test-Kit
BSA-Lösung:	Bovines Serumalbumin (0.125 mg/ml)	Thermo Scientific

**SDS-PAGE****Geräte**

Elektrophorese-System:	<i>XCell-SureLock™-Mini-Cell</i> -Elektrophorese-System	Invitrogen
Spannungsgeber:	<i>EPS301 Electrophoresis Power Supply</i>	Pharmacia

**Materialien**

Ladepuffer:	<i>NuPAGE®-LDS-(4X)</i> -Ladepuffer (enthält SDS)	Invitrogen
DTT-Lösung:	0.5 M DL-Dithiotreitol	Fluka Analytical
IAA-Lösung:	1 M Iodacetamid	Sigma
κ-Standard:	κ-FLC, <i>Human-κ-light-chain</i> , 1 mg/ml	Bethyl Laboratories
Größenmarker:	<i>Novex®-Sharp-Pre-stained-Protein-Standard</i>	Invitrogen
Gele:	<i>NuPAGE®-4-12 %-Bis-Tris-Mini-Gele</i>	Invitrogen
Laufpuffer:	<i>NuPAGE®-MOPS-SDS-Running-Puffer</i> (50 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure), 50 mM Tris, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7)	Invitrogen
Färbereagenz für Gele:	<i>SimplyBlue™-SafeStain-Lösung</i>	Invitrogen
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> :	Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka Analytical
ACN:	Acetonitril (HPLC-Gradient-Grade)	Sigma

**3.2.2 Enzymverdau****Geräte**

Thermomixer:	<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf
--------------	----------------------------	-----------

**Materialien**

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> :	Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka Analytical
HCOOH:	Ameisensäure	Fluka Analytical

Trypsin:	modifiziertes Trypsin <sup>1</sup> ( <i>Sequencing grade</i> )	Promega
Chymotrypsin:	$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Sequencing grade</i> , aus dem Rinderpankreas)	Sigma
Thermolysin:	Thermolysin	Promega

### 3.2.3 PCR

#### PCR

PCR-Mix:	PCR-Master-Mix (2X) (0.05 U/ $\mu$ L Taq-DNA-Polymerase, Re- aktionspuffer, 4 mM MgCl <sub>2</sub> , je 0.4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))	Fermentas
Primer:	Primer	Sigma
H <sub>2</sub> O:	Reinstwasser	Millipore

#### Aufreinigung PCR-Produkte

Ladepuffer <sup>2</sup> :	50 % Glycerin, 15 % Ficoll <sup>®</sup> , 10 mM EDTA, 0.25 % Bromphenolblau	jeweils von Sigma
Agarosegel:	1 % Agarose mit 15 $\mu$ l/l Ethidiumbro- mid	jeweils von Sigma
TAE-Laufpuffer:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7.5-8.0	jeweils von Sigma
Extraktionskit:	<i>GeneJET<sup>TM</sup>-Gel-Extraction-Kit</i>	Fermentas

---

<sup>1</sup>Das Trypsin wurde zur Vermeidung der Autolysis selektiv an den Lysinen methyliert

### 3.2.4 Massenspektrometrische Messung

#### Probenvorbereitung Massenspektrometrie

##### Geräte

Vakuumentrifuge2: *SpeedVac-SC-110A* Savant

##### Materialien

ZipTips:	ZipTip <sup>®</sup> $\mu$ -C18-Pipetten-Spitzen	Merck Millipore
Äquilibrierungspuffer:	95 % H <sub>2</sub> O (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	5 % ACN (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	0.1 % Ameisensäure (MS-Grade)	Fluka Analytical
Elutionspuffer:	40 % H <sub>2</sub> O (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	60 % ACN (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	0.1 % Ameisensäure (MS-Grade)	Fluka Analytical

#### HCD-Messung

##### Geräte

Massenspektrometer:	<i>Orbitrap Velos Pro<sup>TM</sup>Hybrid LTQ</i>	Thermo Scientific
Chromatographische Trennung:	<i>EASY-nLC-1000-Flüssigchromato- graphie-System</i>	Thermo Scientific

##### Materialien

Vorsäule:	<i>Acclaim<sup>TM</sup>-3 <math>\mu</math>m PepMap<sup>TM</sup>-100-Nano- C18-LC-Säule (5 <math>\mu</math>m Partikelgröße, Säulenabmessung: 75 <math>\mu</math>m x 20 mm, mit <i>nanoViper<sup>TM</sup></i>-Fittings)</i>	Thermo Scientific
Analytische Säule:	<i>EASY-Spray-PepMap-RSLC-C18- Säule (2 <math>\mu</math>m Partikelgröße, Säulenab- messung: 50 <math>\mu</math>m x 150 mm)</i>	Thermo Scientific
Fließmittel A:	100 % H <sub>2</sub> O (Reinstwasser)	PURELAB Ultra
	0.1 % Ameisensäure (LC-MS-Grade)	Sigma

Fließmittel B:	100 % Acetonitril (LC-MS-Grade)	Sigma
	0.1 % Ameisensäure (LC-MS-Grade)	Sigma

## ETD-Messung

### Geräte

Massenspektrometer:	<i>LTQ-Orbitrap-XL™</i>	Thermo Scientific
Chromatographische Trennung:	<i>nanoACQUITY-UPLC®</i>	Waters®

### Materialien

Vorsäule:	<i>C<sub>18</sub>-Symmetry®</i> (5 µm Partikelgröße, Säulenabmessung: 180 µm x 20 mm)	Waters®
Analytische Säule:	<i>ACQUITY-UPLC®-BEH130</i> -Säule (1.7 µm Partikelgröße, Säulenabmessung: 150 µm x 100 mm)	Waters®
Fließmittel A:	99 % H <sub>2</sub> O (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	1 % ACN (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	0.1 % Ameisensäure (MS Grade)	Fluka Analytical
Fließmittel B:	1 % H <sub>2</sub> O (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	99 % ACN (LC-MS-Grade)	Fisher Scientific
	0.1 % Ameisensäure (MS Grade)	Fluka Analytical

## 3.3 Patienten

Sämtliche Analysen in dieser Arbeit wurden mit Proben von den oben genannten sechs Patienten durchgeführt, welche an einer monoklonalen Gammopathie leiden. Für die Verwendung der Patientenproben wurde die Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg eingeholt. Die Proben für die Analysen wurden vom Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou zur Verfügung gestellt. Die Patienten GI 1206, SC 1211 und WS 1199 sind am Multiplen Myelom erkrankt, während die Patienten EW 1046, SP 1070

**Tabelle 3.8: Übersicht der Krankheitsparameter der Patienten.** Aufgeführt sind für jeden Patienten, dessen Proben für diese Arbeit verwendet wurden, die Zugehörigkeit zur Multiplen Myelom (MM)- bzw. Multiplen Myelom mit AL-Amyloidose (MM/AL)-Beteiligung-Subgruppe, das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme, die Konzentration der FLCs im Knochenmark, das Verhältnis aus den  $\kappa$ - und  $\lambda$ -FLCs sowie in welchen Organen bei den AL-Amyloidose-Patienten Ablagerungen zu finden waren.

Patient	Subgruppe	Alter	$\kappa$ -FLC	$\kappa/\lambda$	Ablagerungen
GI 1206	MM	46 Jahre	18600 mg/l	2580	-
SC 1211	MM	76 Jahre	83 mg/l	68	-
WS 1199	MM	48 Jahre	4550 mg/l	542	-
EW 1046	MM/AL	61 Jahre	910 mg/l	87	Niere
SP 1070	MM/AL	55 Jahre	2560 mg/l	1292	Niere
KR 1159	MM/AL	59 Jahre	4040 mg/l	3673	Niere

und KR 1159 ebenfalls am Multiplen Myelom leiden, darüber hinaus aber auch eine AL-Amyloidose ausgebildet haben. Bei allen sechs Patienten werden freie Leichtketten (FLC) vom  $\kappa$ -Subtypen übermäßig produziert. Eine Liste mit wichtigen Krankheitsparametern ist in der Tabelle 3.8 zusammengefasst.

## 3.4 Probenvorbereitung

### 3.4.1 Isolierung der FLCs mittels Affinitätschromatographie

#### 3.4.1.1 Antikörperkopplung an Affinitätschromatographiesäulen

Für die Isolation der FLCs wurden monoklonale Antikörper gegen  $\kappa$ -FLCs kovalent an Affinitätschromatographiesäulen gebunden. Die Kopplung erfolgte mit dem *MicroLink™-Protein-Coupling-Kit* und mit *Sheep-Anti-Human- $\kappa$ -Antikörpern*. Alle Kopplungs- und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für jeden Patienten wurde zur Vermeidung von Kontaminationen zwischen den Proben eine individuelle Affinitätschromatographiesäule hergestellt.

Zur Vorbereitung der Kopplung wurden die Affinitätschromatographiesäulen dreimal mit 300  $\mu$ l *Coupling-Puffer* gewaschen, anschließend je 200  $\mu$ l Anti- $\kappa$ -Antikörperlösung mit 2  $\mu$ l

Natriumborhydrid-Lösung aufgetragen und 4 Stunden bei 21 °C und 350 rpm im Thermomixer sowie weitere 18 Stunden (über Nacht) bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Säulen erneut je dreimal mit 300 µl *Coupling*-Puffer und dreimal mit 300 µl *Quenching*-Puffer gewaschen. Das Blockieren der freien Stellen am Säulenmaterial erfolgte im Anschluss durch Zugabe von 200 µl *Quenching*-Puffer und 4 µl Natriumborhydrid-Lösung während einer 30-minütigen Inkubation. Danach wurden die Säulen dreimal mit 300 µl Waschpuffer<sup>1</sup> und dreimal mit 300 µl *Coupling*-Puffer gewaschen. Alle Lösungen wurden stets durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 1000g von den Säulen entfernt. Die Lagerung der Säulen erfolgte bei 4 °C.

Der Erfolg der Antikörperkopplung wurde mit dem *Pierce*<sup>®</sup>-*BCA-Protein-Assay-Kit* überprüft, welches die Gesamtproteinmenge in einer Lösung bestimmt. Der *BCA*<sup>2</sup>-Test basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine im alkalischen Medium, welches mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bildet. Für die Überprüfung des Kopplungserfolges wurde die verbliebene Proteinmenge in der aufgetragenen Antikörperlösung nach der Kopplungsreaktion gemessen. Dafür wurden 2 ml Reagenz A mit 40 µl Reagenz B sowie 100 µl der verbliebenen Antikörperlösung gemischt, die Mischung bei 37 °C 30 Minuten inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte photometrisch bei 562 nm, wobei  $\text{H}_2\text{O}$  als Referenz und zum Nullabgleich verwendet wurde. Die Kalibrierung erfolgte als Ein-Punkt-Kalibrierung mit einer BSA-Lösung (0.125 mg/ml), deren Proteinkonzentration ebenfalls mittels *BCA*-Test nach dem gleichen Protokoll bestimmt wurde. Die photometrischen Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

### 3.4.1.2 Affinitätschromatographie

Mit den selbstgekoppelten Affinitätschromatographiesäulen wurden für alle Patienten die FLCs aus je 200 µl Knochenmarksüberstand isoliert. Die Aufarbeitung wurde mit den Reagenzien des *MicroLink*<sup>TM</sup>-*Protein-Coupling-Kit* durchgeführt. Dazu wurde der Knochenmarksüberstand auf die Affinitätschromatographiesäulen aufgetragen und zwei Stunden bei 21 °C und 350 rpm im Thermomixer inkubiert, wobei die Proben zusätzlich alle 15 Minuten zehnmal manuell invertiert wurden. Im Anschluss daran wurden sie dreimal mit 300 µl

---

<sup>2</sup>Bicinchoninsäure

Waschpuffer<sup>2</sup> und dreimal mit 300 µl *Coupling*-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit zweimal 100 µl Elutionspuffer und jeweils 15-minütigem Inkubieren bei 21 °C und 350 rpm im Thermomixer. Die Eluate wurden im Anschluss mit 10 µl 1 M Tris-HCl neutralisiert und auf ca. 10 µl in der Vakuumzentrifuge<sup>1</sup> ohne Temperaturregelung bei 1400 rpm eingedampft.

### 3.4.2 Präparative SDS-PAGE

Im nächsten Schritt wurden die isolierten FLCs in einem präparativen SDS-PAGE von anderen co-eluierten Proteinen getrennt. Dazu wurden die Eluate der Affinitätschromatographie zunächst nach dem Protokoll des *Zentrums für Biosystemanalyse* (zbsa, Freiburg<sup>3</sup>) reduziert und alkyliert. Für die Reduktion und Alkylierung wurden die Proben mit 3 µl *NuPAGE*<sup>®</sup>-*LDS*-(4X)-Ladepuffer und 1.5 µl 0.5 M DL-Dithiothreitol (DTT) gemischt, zehn Minuten bei 70 °C und 350 rpm im Thermomixer inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde zu den Proben 2 µl 1 M Iodacetamid (IAA) gegeben und diese 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 1.5 µl DTT wurden die Proben erneut bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Als Größenreferenz wurden 3 µl κ-FLC-Standard mit 7 µl H<sub>2</sub>O gemischt und nach dem gleichen Protokoll behandelt. Alle Proben wurden in einem SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Als Größensmarker dienten 10 µl *Novex*<sup>®</sup>-*Sharp-Pre-stained-Protein-Standard*.

Die SDS-PAGE wurde in dem *XCell-SureLock*<sup>™</sup>-*Mini-Cell*-Elektrophorese-System mit den *NuPAGE*<sup>®</sup>-4-12 %-*Bis-Tris-Mini*-Gelen durchgeführt. Je nach vorhandenem Probenmaterial wurden 9-, 10- oder 11-Kammer-Gele verwendet. Es wurde stets der *NuPAGE*<sup>®</sup>-*MOPS-SDS-Running*-Puffer genutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für 50 Minuten. Nach der SDS-PAGE wurden die Gele zweimal für zehn Minuten in H<sub>2</sub>O gespült und anschließend zum Anfärben 90 Minuten in der *SimplyBlue*<sup>™</sup>-*SafeStain*-Lösung inkubiert.

Aus den Gelen wurden die 23 kDa-FLC-Banden ausgeschnitten und mit Hilfe eines Skalpell in möglichst kleine Stücke zerschnitten. Das Entfärben der Gelstücke erfolgte durch Inkubation in zunächst 100 µl 70 : 30 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> : ACN und anschließend in 100 µl

<sup>3</sup>[http://www.zbsa.uni-freiburg.de/files/proteomics\\_protocol\\_for\\_reduction\\_and\\_alkylation\\_invitrogen](http://www.zbsa.uni-freiburg.de/files/proteomics_protocol_for_reduction_and_alkylation_invitrogen)

100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Diese beiden Entfärbungsschritte wurden einmal wiederholt und die Gelstücke im Anschluss daran fünf Minuten in ACN dehydriert. Danach wurden den Gelstücken in der Vakuumzentrifuge<sup>1</sup> ohne Temperaturregelung bei 1400 rpm Reste von Lösungsmitteln entzogen und diese bis zum Enzymverdau bei 4 °C gelagert.

### 3.4.3 Enzymverdau

Für den enzymatischen Verdau zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Messung wurden den Gelstücken 10  $\mu\text{l}$  0.01 mg/ml Enzymlösung sowie 40  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  hinzugefügt und diese über Nacht bei 350 rpm im Thermomixer inkubiert. Der peptidhaltige Überstand wurde in ein 0.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und das Gelstück erneut 30 Minuten in 5 %-iger Ameisensäure bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die beiden Überstände vereinigt und die Lösung direkt für die massenspektrometrische HCD-Messung eingesetzt.

Für alle sechs Patientenproben wurde ein Trypsin- und Chymotrypsinverdau zur Verifizierung der mittels PCR ermittelten Aminosäuresequenzen sowie zur Analyse von posttranslationalen Modifikationen durchgeführt. Der Trypsinverdau wurde mit modifiziertem Trypsin<sup>4</sup> bei 37 °C durchgeführt, während für den Chymotrypsinverdau  $\alpha$ -Chymotrypsin aus dem Rinderpankreas eingesetzt wurde. Dieser Verdau erfolgte bei Raumtemperatur. Die Proben EW 1046 und SP 1070 wurden zusätzlich mit Thermolysin bei 70 °C verdaut.

Für die ETD-Messungen wurden die Proben zusätzlich mit ZipTip<sup>®</sup>  $\mu$ -C18-Pipetten-Spitzen aufgereinigt. Dazu wurden den Proben nach dem Enzymverdau zunächst das Lösungsmittel in der Vakuumzentrifuge<sup>2</sup> bei 1400 rpm und ohne Temperaturregelung entzogen und anschließend in 20  $\mu\text{l}$  Äquilibrierungspuffer resuspendiert. Die Pipettenspitzen wurden zur Vorbereitung zweimal mit 10  $\mu\text{l}$  100 % ACN aktiviert und anschließend 10-mal mit 10  $\mu\text{l}$  Äquilibrierungspuffer äquilibriert. Die Bindung der Peptide erfolgte durch 20-maliges Ansaugen und Ablassen der Probe in den ZipTip<sup>®</sup>  $\mu$ -C18-Pipetten-Spitzen. Anschließend wurden

---

<sup>4</sup>Das Trypsin wurde zur Vermeidung der Autolysis durch den Hersteller selektiv an den Lysinen methyliert

die Proben zweimal mit 10 µl Äquilierungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 µl Elutionspuffer. Im Anschluss daran wurde der Elutionspuffer in der Vakuumentrifuge<sup>2</sup> bei 1400 rpm und ohne Temperaturregelung entfernt und die Proben in 12 µl ETD-Fließmittel A aufgenommen und für die massenspektrometrischen Analysen eingesetzt.

## 3.5 Ermittlung der FLC-Aminosäuresequenzen

### 3.5.1 PCR zur Bestimmung der Aminosäuresequenzen

Für die massenspektrometrische Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen an den FLCs werden die FLC-Peptidsequenzen benötigt, um aus der Differenz zwischen den gemessenen Massen der FLCs und den theoretischen Massen das Auftreten von posttranslationalen Modifikationen erkennen zu können. Die Peptidsequenz wurde von der mRNA-Sequenz der FLCs abgeleitet. Dafür wurden Myelomzellen aus einer Knochenmarksprobe isoliert, aus den Zellen die Gesamt-mRNA extrahiert und diese mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgewandelt, die die Gesamt-mRNA repräsentiert. Diese drei Einzelschritte wurden am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou durchgeführt, welches die cDNA für alle sechs Patienten zur Verfügung stellte.

Die gezielte Amplifizierung der FLC-cDNA erfolgte bei allen sechs Patienten durch eine PCR mit FLC-spezifischen Primern. Die Primer wurden so gewählt, dass der Primer I (*forward*-Primer) vor der variablen Region in der *leader*-Region und der Primer II (*backward*-Primer) nach der variablen Region in der konstanten Region bindet, sodass die variable Region der FLCs amplifiziert wird. Die Sequenz des *forward*-Primers<sup>5</sup> wurde anhand der *κ*-*leader*-Sequenzen aus der *V-BASE*-Datenbank<sup>6</sup> abgeleitet, während die des *backward*-Primers<sup>7</sup> aus der Veröffentlichung [83] von Welschhof *et al.* entnommen wurde. Für die PCR wurde der *PCR-Master-Mix (2X)* verwendet. Je PCR-Ansatz wurden 25 µl *PCR-Master-*

<sup>5</sup>ATGGACATGAGGGTCCCCGCT (entspricht der Aminosäuresequenz: MDMRVPA)

<sup>6</sup>V-BASE - The database of human antibody genes, MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK):

<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>

<sup>7</sup>GAAGACAGATGGTGACGCCACAGT (entspricht der Aminosäuresequenz: TVAAPSVF)

*Mix* (2x) mit 19  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  2  $\mu\text{l}$  20 mM Primer I, 2  $\mu\text{l}$  20 mM Primer II und 2  $\mu\text{l}$  cDNA gemischt. Bei der Negativkontrolle wurden die 2  $\mu\text{l}$  cDNA durch 2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  ersetzt. Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1. 3 Minuten bei 95 °C
2. 30 Sekunden bei 95 °C
3. 30 Sekunden bei 55 °C
4. 1 Minute bei 72 °C
5. 39 x 2.-4.
6. 7 Minuten bei 72 °C

Je 25  $\mu\text{l}$  der PCR-Ansätze wurden mit 5  $\mu\text{l}$  Ladebuffer<sup>2</sup> versetzt, in einem 1 %-igem präparativen Agarosegel mit 15  $\mu\text{l/l}$  Ethidiumbromid aufgetragen und bei 80 V 60 Minuten in TAE-Laufpuffer aufgetrennt. Aus dem Gel wurden die PCR-Produkte für die Sequenzierung mit dem *GeneJET<sup>TM</sup>-Gel-Extraction-Kit* nach vorgegebenem Protokoll aufgereinigt. Die DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte außer Haus durch die Firma *LGC-Genomics-GmbH* (Berlin). Dabei wurden die PCR-Produkte sowohl in vorwärts- als auch rückwärts-Richtung mit den *forward*- bzw. *backward*-Primern sequenziert, um durch die Doppelsequenzierung aus zwei Richtungen eine höhere Zuverlässigkeit der Sequenzierergergebnisse zu erreichen.

Die erhaltenen Gensequenzen wurden mit dem *ExpASy-Translate-Tool*<sup>8</sup> [84] in die Aminosäuresequenzen übersetzt, wobei stets der offene Leserahmen (*Open Reading Frame*) gewählt wurde, welcher weder Start- noch Stopp-Codons in der Proteinsequenz erzeugte. Von diesen Aminosäuresequenzen wurden die Aminosäuren der *leader*-Region entfernt und die Sequenz der konstanten Region ergänzt, sodass die vollständigen Aminosäuresequenzen der FLCs vorlagen. Die Sequenz der konstanten Region wurde der *UniProtKB*-Datenbank

---

<sup>8</sup>*ExpASy-Translate-Tool*: Software zur Übersetzung einer Nukleotidsequenz in die Proteinsequenz, SIB Swiss Institute of Bioinformatics (Stand Februar 2012): <http://web.expasy.org/translate/>

[85], Eintrag P01834, entnommen. Zur Überprüfung der Aminosäuresequenz der konstanten Region wurde nach Sequenzen der konstanten Region (Suchwort: kappa light chain C region) und nach Aminosäuresequenzen der Gesamt-FLC (Suchwort: kappa light chain) in der *UniProtKB*-Datenbank gesucht. Darüber hinaus wurden alle  $\kappa$ -FLC-Sequenzen aus der *AL-Base*-Datenbank<sup>9</sup> extrahiert und für die ersten 100 Einträge die Aminosäuresequenzen der konstanten Region manuell miteinander verglichen. Die *AL-Base*-Datenbank stellt eine Sammlung von FLC-Sequenzen dar, sodass deren Einträge für die Überprüfung der konstanten Region geeignet ist.

### 3.5.2 Homologievergleich mit Sequenzen aus Proteindatenbanken

Die durch PCR ermittelten Aminosäuresequenzen wurden zur Bestätigung einer  $\kappa$ -FLC-spezifischen Sequenz und zur Identifizierung der FLC-Subtypen auf Homologie mit anderen Proteinsequenzen aus der *UniProtKB/SwissProt*- bzw. *IMGT/GENE*-Datenbank [86] mit der *Protein-blastp*-<sup>10</sup> bzw. *IgBlast*-Software<sup>11</sup> verglichen. Die *UniProtKB/SwissProt*-Datenbank stellt die größte Sammlung von Gen- und Proteinsequenzen aller Lebewesen und Viren dar, während sich die *IMGT/GENE*-Datenbank auf Gen- und Proteinsequenzen von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren konzentriert. Die Suche mit der *UniProtKB/SwissProt*-Datenbank diente dem Identifizieren des Immunglobulinsubtypen. Die zusätzliche Suche mit der Immunglobulin-spezifischen *IMGT/GENE*-Datenbank sollte die Zuverlässigkeit der Ergebnisse erhöhen, da diese über einen größeren Umfang an Immunglobulinsequenzen verfügt.

Als Parameter wurden bei der Durchführung der Datenbanksuche der *Protein-blastp*-Suche die *UniProtKB/SwissProt*-Datenbank und als Organismus „human“ gewählt, während bei der *IgBlast*-Suche die *default*-Einstellungen genutzt wurden, welche die Suche mit der *IMGT/GENE*-Datenbank durchführen.

<sup>9</sup>*Amyloid-Light-Chain*-Datenbank, *Amyloid Treatment and Research Center Boston University School of Medicine* (Stand: Juni 2013): <http://albase.bumc.bu.edu/aldb>

<sup>10</sup>Programm zum Datenbankvergleich von Proteinsequenzen, NCBI National Center for Biotechnology Information (Stand: Juni 2013): [//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins)

<sup>11</sup>Programm zum Datenbankabgleich von Immunglobulinproteinsequenzen, NCBI National Center for Biotechnology Information (Stand: Juni 2013): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>

**Tabelle 3.9: Zusammensetzung des Gradienten für die chromatographische Trennung bei der HCD-MS-Messung.**

Zeit [min]	Dauer [min]	% A	% B
0	0	97	3
2	2	97	3
47	45	70	30
50	3	20	80
60	10	20	80

## 3.6 Massenspektrometrische Analyse

Alle sechs Proben wurden im HCD- und im ETD-Modus massenspektrometrisch vermessen. Für die HCD-MS-Messung wurde der Trypsin- und der Chymotrypsinverdau der jeweiligen Probe eingesetzt, während die ETD-MS-Messung mit dem Trypsinverdau der Proben durchgeführt wurde.

### 3.6.1 HCD-MS-Messung

Die HCD-MS-Messung wurde an einem *Orbitrap Velos Pro<sup>TM</sup>Hybrid LTQ*-Massenspektrometer durchgeführt. Für die MS1-Analyse wurde ein Messbereich von 250 bis 1700 m/z verwendet. Die Fragmentierung erfolgte mittels HCD-Aktivierung und einer Kollisionsenergie von 30 eV. Für die Fragmentierung wurden die fünf größten Peaks (Top 5 Modus) ausgewählt. Die nachfolgende MS2-Messung startete bei einem m/z von 150 und endete bei der Masse des Vorläuferions. Die Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Messungen erfolgte mit der *Xcalibur<sup>TM</sup>*-Software (Thermo Scientific, Version 2.2). Für die Bereitstellung des Massenspektrometers und die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Messungen danke ich Herrn Dr. Jens Vanselow und Herrn Prof. Dr. Andreas Schlosser vom Rudolf-Virchow-Zentrum.

Für die chromatographische Trennung wurde das *EASY-nLC-1000*-Flüssigchromatographie-System mit einer RP18-Vorsäule (*Acclaim<sup>TM</sup>-3 µmPepMap<sup>TM</sup>-100-Nano-C18-LC*) und einer RP18-Säule (*EASY-Spray-PepMap-RSLC-C18*) bei einem Fluss von 300 nl/min verwendet.

**Tabelle 3.10: Zusammensetzung des Gradienten für die chromatographische Trennung bei der ETD-MS-Messung.**

Zeit [min]	Dauer [min]	% A	% B
0	0	98	2
1	1	98	2
3	2	95	5
43	40	60	40
52	9	60	40
53	1	2	98
57	4	2	98
60	3	98	2
75	15	98	2

Die Vorsäule wurde mit 10  $\mu\text{l}$  und die analytische Säule mit 4  $\mu\text{l}$  der Fließmittelkombination A : B = 97 % : 3 % äquilibriert. Die Trennung erfolgte mit dem in der Tabelle 3.9 beschriebenen Gradienten, bei dem 0.1 % Ameisensäure in 100 %  $\text{H}_2\text{O}$  als Fließmittel A und 0.1 % Ameisensäure in 100 % Acetonitril als Fließmittel B eingesetzt wurden. Von jeder Probe wurden 5  $\mu\text{l}$  injiziert und schließend mit 7  $\mu\text{l}$  des Fließmittels A auf die Vorsäule geladen.

### 3.6.2 ETD-MS-Messung

Für die ETD-MS-Messung wurde das *LTQ Orbitrap XL<sup>TM</sup>*-Massenspektrometer genutzt. Die MS1-Analyse wurde im m/z-Bereich von 300 bis 2000 durchgeführt, während die MS2-Messung bei 50 begann und bei der Masse des Vorläuferions endete. Für die Fragmentierung wurde der ETD-Modus mit Fluoranthen als Reagenz-Anion und einer Kollisionsenergie von 35 eV gewählt. Diese wurde mit den drei intensivsten Peaks (Top 3-Modus) durchgeführt. Für die Bereitstellung des Massenspektrometers und der Hilfe bei den massenspektrometrischen Messungen möchte ich mich bei Frau Dr. Deborah Francoleon und Frau Prof. Dr. Catherine E. Costello an der School of Medicine an der Boston University bedanken.

Die chromatographische Trennung erfolgte am *nanoACQUITY UPLC*<sup>®</sup>-System mit einer PR18-Vorsäule (*C<sub>18</sub>-Symmetry*<sup>®</sup>) und einer RP18-Säule (*ACQUITY UPLC*<sup>®</sup> *BEH130*). Der für die Trennung verwendete Gradient ist in der Tabelle 3.10 zusammengefasst, wobei 99 % H<sub>2</sub>O mit 1 % ACN und 0.1 % Ameisensäure als Fließmittel A und 1 % H<sub>2</sub>O mit 99 % ACN und 0.1 % Ameisensäure als Fließmittel B dienen. Von jeder Probe wurden 5 µl injiziert, welche zunächst für 4 Minuten bei einem Fluss von 4 µl/min mit einer Fließmittelkombination (A : B = 98 % : 2 %) auf die Vorsäule geladen wurden.

## 3.7 Identifizierung von PTMs

### 3.7.1 HCD-MS-Spektren

Zur Identifikation der posttranslationalen Modifikationen wurden die HCD-MS-Spektren mittels Mascot- [87] und Sequest-Algorithmus [88] analysiert. Der Mascot-Algorithmus gleicht die m/z der Vorläufer- und Fragmentationen mit Peptiden einer Datenbank ab, um im Anschluss für die Bewertung der Ergebnisse einen wahrscheinlichkeitsbasierten Algorithmus zu nutzen. Der dadurch ermittelte Mascot-Score beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass der Treffer signifikant und nicht zufällig ist. Der Sequest-Algorithmus identifiziert anhand des m/z-Verhältnisses des Vorläuferions durch einen Datenbankabgleich Peptide mit dem gleichen m/z. Die theoretisch ermittelten Fragmentationen der Peptide aus der Datenbank werden mit den gemessenen Ionen des MS/MS-Spektrums verglichen und anhand einer Kreuzkorrelation das beste Ergebnis bestimmt.

Für die Mascot-Analysen wurden die Daten mittels *Mascot Distiller* (Matrix Science, Version 2.4.3) prozessiert und anschließend über den *Mascot-Server* (Matrix Science, Version 2.5) der Datenbankabgleich vorgenommen. Ich danke Herrn Dr. Jens Vanselow sowie Herrn Prof. Dr. Andreas Schlosser vom Rudolf-Virchow-Zentrum für die Bereitstellung der Software und die Unterstützung bei der Durchführung. Die Sequest-Analyse wurde mit dem *Proteome Discoverer*<sup>TM</sup>-Programm (Thermo Scientific, Version 1.3.0.339) durchgeführt. Für die Bereitstellung der Software möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Catherine E. Costello von der School of Medicine an der Boston University bedanken.

Die folgenden Parameter wurden für die Analysen gewählt:

Peptidtoleranz:	5 ppm
MS/MS-Toleranz:	0.02 Da
<i>Miscleavage</i> -Rate:	3
Variable Modifikationen:	
Sulfonierung:	Serin, Threonin, Tyrosin
Phosphorylierung:	Serin, Threonin, Tyrosin
Oxidation:	Methionin, Tryptophan, Histidin
Carbamidomethylierung:	Cystein
Acetylierung:	<i>N</i> -Terminus Protein, <i>N</i> -Terminus Peptid, Lysin
Methylierung:	Asparaginsäure, Glutaminsäure
Datenbank:	SwissProt, FLCs von den sechs Patienten aus dieser Arbeit, Kontaminationen
Enzyme:	Semitrypsin (Trypsinverdaue) bzw. Chymotrypsin (Chymotrypsinverdaue)

Die so ausgewählten Spektren wurden im Anschluss manuell überprüft und auf Plausibilität der identifizierten posttranslationalen Modifikationen untersucht. Die theoretischen *m/z* der *y*- und *b*-Ionen wurden dazu mittels *Protein Prospector*<sup>12</sup> (University of California, San Francisco, Version 5.12.2) bestimmt.

### 3.7.2 ETD-MS-Spektren

Die ETD-MS-Spektren wurden mittels Mascot-Algorithmus analysiert und dafür der öffentlich verfügbare Mascot-Server<sup>13</sup> genutzt, bei dem die folgenden Parameter gewählt wurden:

<sup>12</sup>Programm zur Zuordnung von Proteinen aus Datenbankeinträgen zu MS/MS-Messungen. U. a. können die theoretischen *m/z* von Fragmentionen eines Peptides ermittelt werden: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>

<sup>13</sup>[http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS)

Peptidtoleranz:	1.2 Da
MS/MS-Toleranz:	0.3 Da
<i>Miscleavage</i> -Rate:	3
Variable Modifikationen:	
Sulfonierung:	Serin, Threonin, Tyrosin
Phosphorylierung:	Serin, Threonin, Tyrosin
Carbamidomethylierung:	Cystein
Datenbank:	SwissProt
Enzyme:	Semitrypsin

Die ETD-MS-Messungen der FLC-Proben dienten der Lokalisation der Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194, welche mittels HCD-MS-Analyse identifiziert wurde. Da sich diese Sulfonierung in der konstanten Region der FLCs befindet, war die spezifische Suche bei den in dieser Arbeit beschriebenen FLCs nicht notwendig. Es konnte auf die öffentliche Datenbank *SwissProt* zurückgegriffen werden, die die Sequenz der konstanten Region enthält.

Die ETD-MS-Messung wurde an der *LTQ-Orbitrap* durchgeführt, deren Spektren eine schlechtere Auflösung und größere Fehler (*accuracy*) aufwiesen als die HCD-MS-Spektren der *Orbitrap Velos Pro*, weshalb die Fehlertoleranzen für die Mascot-Suche bei der ETD-Auswertung erhöht wurden. Durch die Erhöhung der Fehlertoleranzen können leicht falsch-positive Ergebnisse erzielt werden, weshalb die Spektren im Anschluss an die Mascot-Analyse manuell auf Richtigkeit und dem Vorhandensein von z-, z+1- und c-Ionenserien überprüft wurden. Um falsch-positive Treffer zu minimieren, wurden nur Peaks beachtet, die sich deutlich vom Hintergrundrauschen mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von >3 abhoben. Die theoretischen Werte für die z-, z+1- und c-Ionen wurden analog zu den HCD-MS-Spektren per *Protein Prospector*<sup>14</sup> (University of California, San Francisco, Version 5.12.2) ermittelt.

---

<sup>14</sup>Programm zur Zuordnung von Proteinen aus Datenbankeinträgen zu MS/MS-Messungen. U. a. können die theoretischen m/z von Fragmentionen eines Peptides ermittelt werden: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>

**Tabelle 3.12: Übersicht über Peptide mit einer Sulfonierung im Bereich ITCQASQDISDYL<sub>32</sub>SWYQQKPGKAPKL.** Dargestellt sind die Peptide, nach denen manuell in den HCD-MS-Spektren der Probe SP 1070 gesucht wurde. Es sind jeweils die theoretischen monoisotopischen Massen und die Durchschnittsmassen (in Klammern) aufgeführt.

Peptid	[M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	[M+2H <sup>+</sup> ] <sup>2+</sup>	[M+3H <sup>+</sup> ] <sup>3+</sup>	[M+4H <sup>+</sup> ] <sup>4+</sup>
<sub>21</sub> ITsCQASQDISDYL <sub>32</sub> -	3048.44	1524.73	1016.82	762.87
WYQQKPGKAPKL <sub>46</sub>	(3050.46)	(1525.73)	(1017.49)	(763.37)
<sub>21</sub> ITsCQASQDISDY <sub>32</sub>	1423.54	712.27	475.18	356.64
	(1424.51)	(712.76)	(475.51)	(356.88)
<sub>19</sub> VTITsCQASQDISDY-	2839.29	1420.15	947.10	710.58
LSWYQQKPGK <sub>42</sub>	(2841.17)	(1421.09)	(947.73)	(711.05)
<sub>19</sub> VTITsCQASQDISDY-	3135.48	1568.24	1045.83	784.62
LSWYQQKPGKAPK <sub>45</sub>	(3137.54)	(1569.27)	(1046.52)	(785.14)
<sub>12</sub> SASVGDRVTITsCQ-	2295.97	1148.49	766.00	574.75
ASQDISDY <sub>32</sub>	(2297.45)	(1149.23)	(766.49)	(575.12)
<sub>12</sub> SASVGDRVTITsCQ-	2409.05	1205.03	803.69	603.02
ASQDISDYL <sub>33</sub>	(2410.61)	(1205.81)	(804.21)	(603.41)
<sub>1</sub> DIQMTQSPSSLSASVG-	3483.52	1742.26	1161.84	871.64
DRVTITsCQASQDISDY <sub>32</sub>	(3485.78)	(1743.39)	(1162.60)	(872.20)

### 3.7.3 Manuelle Suche

Die Ergebnisse der Mascot-Suche ließen weitere Spektren vermuten, die mit der Mascot-Suche selber nicht identifiziert werden konnten. Um auszuschließen, dass die entsprechenden Spektren übersehen wurden, wurden sämtliche Spektren auf das Vorhandensein von passenden Vorläuferionen sowie y- und b-Ionen manuell analysiert.

#### 3.7.3.1 Sulfonierung

**Sulfonierung ITCQASQDISDYL<sub>32</sub>SWYQQKPGKAPKL** Bei dem Patienten SP 1070 konnten bei einem Vorversuch mit einem Thermolysin-Verdau die Peptide <sub>21</sub>ITCQASQDISDYL<sub>32</sub>SWYQQKPGKAPKL<sub>46</sub> und <sub>21</sub>ITCQASQDISDY<sub>32</sub> mit einer Sulfonierung gefunden werden. Die Mascot-Analyse der Trypsin- und chymotrypsinverdauten HCD-MS-Spektren konn-

**Tabelle 3.13: Übersicht der Peptide mit einer Sulfonierung und Carbamidomethylierung am Cystein C194 beim Peptid YACEVTHQGLSSPVTK.** Es sind jeweils die theoretischen monoisotopischen Massen und die Durchschnittsmassen (in Klammern) aufgeführt.

Peptid	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$	$[M+4H]^{4+}$
$_{192}YAc_sCEVTHQGLSS-$	1856.82	928.91	619.61	464.94
$PVTK_{207}$	(1858.07)	(929.54)	(620.03)	(465.27)

te eine Sulfonierung an dieser Stelle jedoch nicht identifizieren. Um möglicherweise unerkannte Spektren dennoch isolieren zu können, wurden die HCD-MS-Spektren nach diesen Peptiden sowie nach trypsin- und chymotrypsinverdauten Peptiden mit einer Sulfonierung manuell durchsucht. Die verwendeten Werte sind in der Tabelle 3.12 zusammengefasst. Die Spektren wurden nach den 2-, 3- und 4-fachgeladenen Peptiden analysiert, da im Vorversuch das 4-fachgeladene Peptid identifiziert werden konnte.

**Sulfonierung und Carbamidomethylierung am Cystein C194** Die Mascot-Analyse der ETD-MS-Spektren isolierte für das Peptid  $_{191}YACEVTHQGLSSPVTK_{297}$  Spektren, die sowohl eine Carbamidomethylierung als auch eine Sulfonierung am Cystein C194 darstellen könnten. Da ein entsprechendes Spektrum in den HCD-MS-Messungen mittels Mascot nicht gefunden werden konnte, wurde manuell nach diesem Peptid gesucht. Die dazu verwendeten m/z-Werte sind in der Tabelle 3.13 aufgeführt.

### 3.7.3.2 Methylierung

**Methylierung am Cystein C194** Bei der Mascot-Suche nach Methylierungen konnten nur Spektren identifiziert werden, die am Cystein C194 eine Methylierung neben einer Carbamidomethylierung zeigten, während die entsprechenden Carbamidomethylierungs-freien Spektren fehlten. Zur Unterstützung der Methylierung-PTM-Hypothese und Widerlegung der Methylierung-Artefakt-Hypothese wurden die Spektren manuell nach Peptiden mit einer Methylierung am Cystein C194 ohne gleichzeitige Carbamidomethylierung durchsucht. Dabei wurden die Peptide ausgewählt, die am häufigsten bei der Mascot-Suche identifiziert werden konnten. Eine Übersicht der untersuchten Peptide mit den entsprechenden m/z-Verhältnissen ist in der Tabelle 3.14 dargestellt, wobei die verwendeten m/z-Werte mittels

**Tabelle 3.14: Übersicht der Peptide mit Methylierung am Cystein C194, ohne eine Carbamidomethylierung am selbigen Cystein.** Es sind jeweils die theoretischen monoisotopischen Massen und die Durchschnittsmassen (in Klammern) aufgeführt.

Peptid	[M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	[M+2H <sup>+</sup> ] <sup>2+</sup>	[M+3H <sup>+</sup> ] <sup>3+</sup>	[M+4H <sup>+</sup> ] <sup>4+</sup>
<sup>191</sup> VYAmCEVTHQGL-	1832.92	916.96	611.64	458.99
SSPVTK <sub>207</sub>	(1834.11)	(917.56)	(612.04)	(459.28)
<sup>189</sup> HKVYAmCEVTHQ-	2098.08	1049.54	700.03	525.27
GLSSPVTK <sub>207</sub>	(2099.43)	(1050.22)	(700.48)	(525.61)
<sup>193</sup> AmCEVTHQGLSS-	1570.79	785.90	524.27	393.45
PVTK <sub>207</sub>	(1571.80)	(786.41)	(524.61)	(393.71)
<sup>193</sup> AmCEVTHQGLSS-	1804.89	902.95	602.30	451.98
PVTKSF <sub>209</sub>	(1806.06)	(903.53)	(602.69)	(452.27)

*Protein Prospector*<sup>15</sup> (University of California, San Francisco, Version 5.12.2) ermittelt wurden. Die Spektren wurden nach den 2- und 3-fachgeladenen Peptiden gescannt.

### 3.7.4 PEAKS-Analyse

In einem weiteren Schritt wurden die HCD-MS-Spektren mit dem Auswertungsprogramm *PEAKS* analysiert, welches die Peptid-Sequenz als *De-novo*-Sequenzierung aus den MS-Daten ableitet [89, 90]. Zusätzlich kann dieses nach allen in der *Unimod*-Datenbank<sup>16</sup> gespeicherten posttranslationalen Modifikationen die MS-Spektren durchsuchen, während die Mascot- und Sequest-Analyse auf wenige PTMs beschränkt war. Dies ermöglicht die Suche nach PTMs, ohne sich vorher auf bestimmte Modifikationen festlegen zu müssen.

Die PEAKS-Analyse wurde mit dem Programm *PEAKS* (Bioinformatics Solution INC, Waterloo, Kanada, Version 7.0) mit den folgenden Parametern durchgeführt:

<sup>15</sup>Programm zur Zuordnung von Proteinen aus Datenbankeinträgen zu MS/MS-Messungen. U. a. können die theoretischen m/z von Fragmentationen eines Peptides ermittelt werden: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>

<sup>16</sup>Datenbank mit posttranslationalen Modifikationen

Peptidtoleranz:	8 ppm
MS/MS-Toleranz:	0.02 Da
<i>Miscleavage</i> -Rate:	100
Enzyme:	Unspezifisch

Für die Hilfe bei der Durchführung und Bereitstellung der Software möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Schlosser bedanken.

## 3.8 Varianzanalyse

### 3.8.1 AL-Base-Datenbank

Da die Aminosäuresequenz eines Proteins einen entscheidenden Einfluss auf dessen Struktur ausübt, wurde untersucht, inwiefern Stellen („*Hot spots*“) in der Aminosäuresequenz der FLCs existieren, an denen bestimmte Aminosäuren bei Patienten mit Multiplen Myelom oder AL-Amyloidose häufiger auftreten als bei gesunden Kontrollprobanden. Die in dieser Arbeit ermittelten sechs Sequenzen reichen jedoch aufgrund der natürlichen Varianz von Antikörpern nicht aus, um diese Frage zufriedenstellend zu beantworten. Deshalb wurden zusätzlich die Sequenzen der *AL-Base*-Datenbank verwendet. Die *AL-Base*-Datenbank beinhaltet u. a. FLC-Sequenzen von Patienten mit Multiplen Myelom, mit AL-Amyloidose und Patienten mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose-Beteiligung sowie von gesunden Kontrollpatienten.

Zur Identifizierung von krankheitsspezifischen „*Hot spots*“ in den Aminosäuresequenzen wurden Sequenzen aus der *AL-Base*-Datenbank<sup>17</sup> [60] entnommen und auf das Auftreten von Aminosäuren statistisch untersucht. Dazu wurde für jede Stelle im Peptid die häufigste Aminosäure der Sequenzen ermittelt und die relative Häufigkeit der häufigsten Aminosäure innerhalb der Subgruppe berechnet. Die Bestimmung der häufigsten Aminosäure und der relativen Häufigkeiten erfolgte mit einem selbstprogrammierten *Python*-Skript, welches im Anhang im Abschnitt A.4 zu finden ist. Alle Skripte wurden mit der Python 2.7.3-Shell<sup>18</sup> ausgeführt.

---

<sup>17</sup>*Amyloid-Light-Chain*-Datenbank, *Amyloid Treatment and Research Center Boston University School of Medicine* (Stand: Juni 2013): <http://albase.bumc.bu.edu/aldb>

<sup>18</sup>Copyright (c) 2001-2012 Python Software Foundation

### 3.8.2 Isolation und Vorbereitung der Aminosäuresequenzen

Aus der *AL-Base*-Datenbank wurden sämtliche  $\kappa$ -FLC-Sequenzen vom Subtypen  $V_{\kappa}I$  (Variabel I) extrahiert, die den Subgruppen AL-Amyloidose (AL), Multiples Myelom (MM) sowie dem Multiplen Myelom mit AL-Amyloidose-Beteiligung (MM/AL) zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus wurden als Kontrollgruppe alle Sequenzen isoliert, die als normales FLC-Repertoire („Normal-Repertoire“) gekennzeichnet waren. Die Sequenzen lagen dabei als Gen- oder Aminosäuresequenzen vor. Die Gensequenzen wurden mit dem „*ExpASy-Translate-Tool*“<sup>19</sup> in die Aminosäuresequenzen übersetzt. Identische Sequenzen wurden im Anschluss eliminiert. Von den Aminosäuresequenzen wurde die variable Region separiert, indem die *leader*- und die konstante Region bis zu den Aminosäuren QQYNSYP entfernt wurden. Den Multiplen-Myelom-Sequenzen wurden die selbstermittelten Aminosäuresequenzen GI 1206, SC 1211 und WS 1199 und der Gruppe mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose die Sequenzen EW 1046, SP 1070 sowie KR 1159 hinzugefügt. Mit allen extrahierten Sequenzen wurde ein multiples Sequenzalignment durchgeführt. Dazu wurden die Programme *ClustalW2* (Version 2.1, EMBL-EBI European Molecular Biology Laboratory-The European Bioinformatics Institute) [91], *Clustal $\Omega$*  (Version 1.2.0, EMBL-EBI) [92] sowie *Muscle* (Version 3.8.31, EMBL-EBI) [93] genutzt. Da von der Subgruppe Multiples Myelom mit AL-Amyloidose-Beteiligung nur zehn Sequenzen in der Datenbank gefunden werden konnten, werden diese in den nachfolgenden Betrachtungen nicht weiter berücksichtigt.

### 3.8.3 Ermittlung der häufigsten Aminosäuren

Für jede Stelle  $i$  in der FLC-Aminosäuresequenz wurde die am häufigsten vorkommende Aminosäure bestimmt, indem über alle Sequenzen aus den drei Subgruppen Kontrollgruppe, Multiples Myelom und AL-Amyloidose die Verteilung der Aminosäuren und daraus die häufigste Aminosäure ermittelt wurden. Die Bestimmung der häufigsten Aminosäuren wurde mit einem Python-Skript umgesetzt, welches die folgenden Einzelschritte ausführt:

1. Einlesen der Sequenzen aus einem .txt-file
2. Zählen der unterschiedlichen Aminosäuren an jeder Stelle im Peptid

<sup>19</sup>*ExpASy-Translate-Tool*: Software zur Übersetzung einer Nukleotidsequenz in die Proteinsequenz, SIB Swiss Institute of Bioinformatics (Stand Juni 2013): <http://web.expasy.org/translate/>

3. Überprüfung der Zählung
4. Ermitteln der häufigsten Aminosäuren an jeder Stelle im Peptid
5. Ausgabe der häufigsten Aminosäure an jeder Stelle als .txt-file

### 3.8.4 Ermittlung der relativen Häufigkeiten

Die Bestimmung der relativen Häufigkeiten von den häufigsten Aminosäuren wurde ebenfalls mit einem Python-Skript umgesetzt, welches aus den folgenden Einzelschritten besteht:

1. Einlesen der Sequenzen aus einem .txt-file
2. Einlesen der häufigsten Aminosäuren aus einem .txt-file
3. Bestimmen der relativen Häufigkeiten  $P_i$  für das Auftreten der häufigsten Aminosäure an der  $i$ -ten Stelle in der Sequenz
  - 3.1. Zählen der Sequenzen mit der häufigsten Aminosäure an der  $i$ -ten Stelle  $n_i$
  - 3.2. Zählen der Sequenzen mit einer beliebigen Aminosäure an der  $i$ -ten Stelle  $N_i$
  - 3.3. Berechnen der  $P_i$  an der Stelle  $i$  nach der Formel 3.1

$$P_i = \frac{n_i}{N_i} \quad (3.1)$$

In einem weiteren Schritt wurden innerhalb der FLC-Sequenz die Stellen markiert, an denen sich die Werte der relativen Häufigkeiten  $P_i$  zwischen der Kontrollgruppe und der Multiplen-Myelom- bzw. AL-Amyloidose-Subgruppe um mindestens 30 %-Punkten unterschieden. Zur Bestätigung von signifikanten Unterschieden zwischen den Subgruppen wurde jeweils ein  $\chi^2$ -Test nach der Formel 3.3 durchgeführt [94]. Die beobachteten Häufigkeiten  $f_{b,gh}$  entsprachen den berechneten relativen Häufigkeiten, während die erwarteten Häufigkeiten  $f_{e,gh}$  nach der Formel 3.2 mit den Zeilenhäufigkeiten  $Z_g$  und den Spaltenhäufigkeiten  $S_h$  der Kontingenztabellen sowie der Stichprobengröße  $M$  bestimmt wurden.

$$f_{b,gh} = \frac{Z_g \cdot S_h}{M} \quad (3.2)$$

$$\chi^2 = \sum_{g=1}^2 \sum_{h=1}^2 \frac{(f_{b,gh} - f_{e,gh})^2}{f_{e,gh}} \quad (3.3)$$

Der kritische  $\chi_{\alpha=0.1}^2$  % entsprach 10.84 [95], wobei der durchgeführte Test einen Freiheitsgrad von 1 aufwies. Bei einem  $\alpha$  von 1 % beträgt das kritische  $\chi_{\alpha=1}^2$  % 6.63 [95].



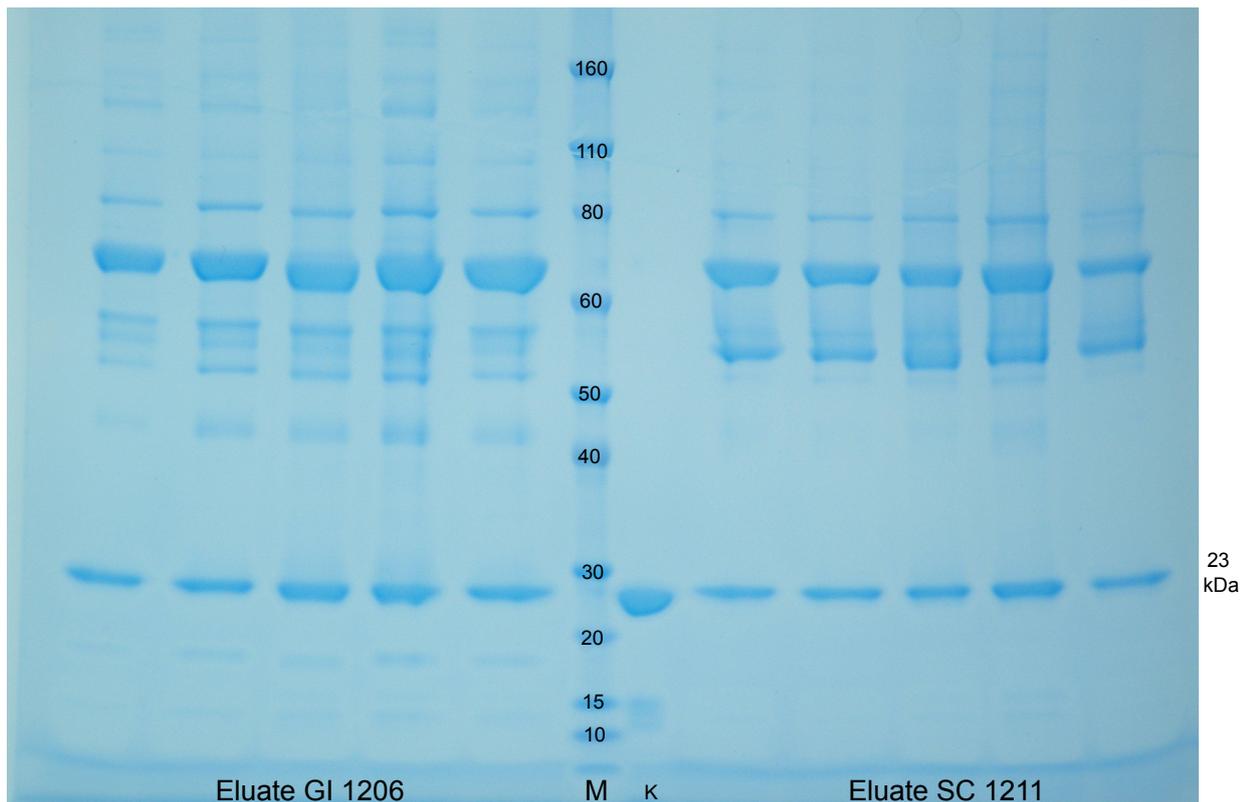
## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Charakterisierung von freien Leichtketten und die Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen wurden mit Patienten mit Multiplen Myelom bzw. mit Patienten mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose-Beteiligung durchgeführt, deren freie Antikörperleichtketten hinsichtlich der Aminosäuresequenzen sowie des Auftretens von Sulfonierungen, Methylierungen, Acetylierungen und Glykosylierungen untersucht wurden. Die Aminosäuresequenzen wurden mittels PCR mit der mRNA aus den FLC-produzierenden Myelomzellen der Patienten abgeleitet, während für die PTM-Analysen die FLCs aus dem Knochenmarksüberstand durch eine Affinitätschromatographie isoliert wurden. Die anschließende Identifizierung der PTMs erfolgte mit Hilfe von MS/MS-Analysen. Darüber hinaus wurden die FLC-Sequenzen auf die Häufigkeit des Auftretens von Aminosäuren statistisch untersucht.

### 4.1 Probenvorbereitung: FLC-Isolierung

Zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Analyse wurden die freien Antikörperleichtketten mit Hilfe einer FLC-spezifischen Affinitätschromatographie aus den Knochenmarksüberständen der Patientenproben isoliert, wofür anti- $\kappa$ -Antikörper an das Säulenmaterial gebunden wurden. Anschließend wurden die Eluate zur Überprüfung des Aufreinigungsschrittes in einem SDS-PAGE-Gel aufgetragen, dessen Ergebnis für die Proben GI 1206 und SC 1211 beispielhaft in der Abbildung 4.1 dargestellt ist. Die Gele der Proben WS 1199, EW 1046, SP 1070 und KR 1159 zeigten ein ähnliches Ergebnis und wurden im Anhang in der Graphik A.1 abgebildet.

Bei allen Proben konnte eine deutliche ca. 23 kDa-große Bande erkannt werden. Diese befindet sich auf der gleichen Höhe wie der  $\kappa$ -Standard und wird deshalb als FLC-Bande an-



**Abbildung 4.1: SDS-PAGE-Gel der Eluate der Affinitätschromatographie zur Isolierung der freien Antikörperleichtketten aus dem Knochenmarksüberstand.** In dem Gel wurden die Eluate der Proben GI 1206 und SC 1211 zusammen mit einem Größenmarker M und einem  $\kappa$ -Standard  $\kappa$  aufgetragen. Die Größenangaben bei dem Marker sind in kDa dargestellt.

gesehen. Das Auftreten der FLC-Bande bestätigt die Anwendbarkeit der Affinitätschromatographie zur Isolierung der  $\kappa$ -FLCs aus dem Knochenmarksüberstand. Darüber hinaus zeigten sich allerdings in allen SDS-PAGE-Gelen bei allen Patientenproben weitere Proteinbanden, deren Proteine unspezifisch an das Affinitätschromatographie-Material gebunden haben. Das Vorhandensein der anderen Banden verdeutlicht, dass die Spezifität der Affinitätschromatographie nicht ausreichend hoch war, um die FLCs in einem Schritt zuverlässig aus den Knochenmarksüberständen zu isolieren. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit eines zweiten Aufreinigungsschrittes in Form eines präparativen SDS-PAGE-Gels, aus dem die FLC-Banden für die weiteren Analysen ausgeschnitten werden können.

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie und der SDS-PAGE ist es gelungen, eine Methode zur Isolierung der FLCs aus dem Knochenmarksüberstand mit einer komplexen Zusammensetzung von Proteinen zu etablieren, bei der die FLCs nicht als Hauptkomponente vorlagen. Dadurch unterscheidet sich die Aufreinigungsmethode von denen anderer Gruppen, die die

FLCs meist aus dem Urin der Patienten isolierten, wo die FLCs als Hauptbestandteil vorhanden waren. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode könnte deshalb auch für die Aufreinigung der FLCs aus anderen komplexen Probenmatrices, z. B. Serum, Anwendung finden.

## 4.2 Ermittlung der FLC-Aminosäuresequenzen

### 4.2.1 Ermittlung der Aminosäuresequenzen mittels PCR

#### 4.2.1.1 PCR-Ergebnisse

Zur Identifizierung sämtlicher Aminosäuresequenzen der Patienten-FLCs wurde die FLC-cDNA aus der Gesamt-cDNA mittels PCR extrahiert. Die Primer für die PCR wurden so gewählt, dass der *forward*-Primer in der *leader*-Region und der *backward*-Primer zu Beginn des konstanten Bereichs bindet. Dadurch kommt es zur Amplifizierung der variablen Region, welche ca. 110 Aminosäuren umfasst. Die Überprüfung der PCR-Produkte in einem Agarosegel zeigte für sämtliche Proben eine ca. 300 bp-große Bande, während in der Negativkontrolle keine Banden zu finden waren. Das Auftreten von nur einer Bande in den Probenbahnen bestätigt eine FLC-spezifische PCR, bei der keine Nebenprodukte entstanden sind. Des Weiteren entspricht eine 300 bp-große DNA-Bande einem Peptid mit ca. 110 Aminosäuren. Das Fehlen einer Bande in der Negativkontrolle bescheinigt unkontaminierte PCR-Ansätze.

#### 4.2.1.2 Aminosäuresequenzen der sechs Patientenproben

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte sowohl in Vorwärts- als auch Rückwärtsrichtung, um eine hohe Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Proteinsequenzen sind in der Abbildung 4.2 zusammengefasst. Bei den Multiplen-Myelom-Patienten ohne AL-Amyloidose-Beteiligung GI 1206, SC 1211 und WS 1199 konnten sowohl bei der Vorwärts- als auch Rückwärtssequenzierung identische Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Außerdem enthielten die sequenzierten Bereiche einen Teil der konstanten Region, deren Aminosäuresequenz mit dem Eintrag aus der *UniProtKB*<sup>1</sup>-Datenbank überein-

---

<sup>1</sup>*UniProtKB*-Datenbank: Umfangreiche Datenbank für Proteinsequenzen, die bekannte Sequenzen von allen Lebewesen und Viren enthält, UniProt Consortium

**GI 1206:**

DIQMTQSPST LSASVQDRVT ITCRASQDIT NSLWYQQKA GKAPKLLIYD ASNLEAGVPS RFTGSGSGTE FTLTISSLQD DDFATYYCQQ YKSPYTFGGQ GTKLEIKRTV  
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC

**SC 1211:**

DTQMTQSPST LSASVQDRVT ITCRASQDIT NSLWYQQKA GIAPKLLIYK ASTLESGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQD DDFATYYCQQ YNSYSWTFEGQ GTRVEIKRTV  
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC

**WS 1199:**

DIKMTQSPSS LSASVQDRVT ITCQASQDIP NMLWYQHKP GQAPKLLIYQ ASNLEAGVPS RFSRSGSGTD FTLTISSLQD EDIATYYCQQ YDIVPYTFEGQ GTKLEIMRTV  
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC

**EW 1046:**

DIQMTQSPSS LSASVQDRVT ITCQASQDIP NMLWYQHKP GQAPKLLIYQ ASNLEAGVPS RFSRSGSGTD FTLTISSLQD EDIATYYCQQ YGSLPPTFGQ GTRLEIKRTV  
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC

**SP 1070:**

DIQMTQSPSS LSASVQDRVT ITCQASQDIS DYLSWYQQKP GKAPKLLIYD ASTLETGVPS RFSGSGSGTY FTLTISSLQD EDIATYYCQQ YDDLSPYTFG QGTKLEIKRTV  
VAAPSVFIFPP PSDQLKSGT ASVCLLNIFY YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTLT LSKADYEKHK KVVACEVTHQ GISSPVTKSF NRGECC

**KR1159:**

DIQMTQSPSS LSASIGDRVT ITCQASQEID NYLWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLEAGVPS RFSASGSGTD FTLTISSLQD EDFATYYCQQ YDNLPRTEFGP GTKVDIKRTV  
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC

**Abbildung 4.2: Aminosäuresequenzen der Patienten GI 1206, SC 1211 und WS 1199, welche am Multiplen Myelom ohne AL-Amyloidose leiden, bzw. der Patienten EW 1046, SP 1070 und KR 1159, welche vom Multiplen Myelom und der AL-Amyloidose betroffen sind.** Bei der Darstellung der Aminosäuresequenzen wurden die variablen Regionen, welche mittels PCR-Produkt-Sequenzierung ermittelt wurden, schwarz abgebildet, während die konstante Region blau markiert wurde. Die Sequenz für die konstante Region wurde der UniProtKB-Datenbank entnommen. Bereiche, die sowohl bei der Vorwärts- als auch Rückwärtssequenzierung auftraten, wurden doppelt unterstrichen, während die einfach unterstrichenen Regionen nur durch eine Sequenzrichtung verifiziert werden konnten. Bei der Patientenprobe EW 1046 kam es zu einem Widerspruch in den Sequenzen bei der Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung, welcher grün markiert wurde. Bei der Rückwärtssequenzierung traten an dieser Stelle die Aminosäuren Serin und Alanin auf. Darüber hinaus kam es bei den Patientenproben EW 1046 und KR 1159 zu Unterschieden zwischen dem Datenbankeintrag für die konstante Region und dem Ergebnis der DNA-Sequenzierung, welche rot hervorgehoben sind. Während der Datenbankeintrag an dieser Stelle ein Prolin postuliert, zeigt die Sequenzierung an dieser Stelle ein Histidin bzw. die beiden Aminosäuren Histidin und Leucin. Die grau gekennzeichneten Anfangsbereiche bei den Proben SP 1070 und KR 1159 wurden aus der Datenbank V Base ergänzt, da sie durch die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung nicht abgedeckt wurden.

stimmte. Aus diesem Grund kann von einer zuverlässigen Bestimmung der Proteinsequenzen bei diesen Proben ausgegangen werden.

Bei der Patienten-Probe EW 1046 trat ein Unterschied in den Aminosäuresequenzen bei der Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung auf, der in der Abbildung 4.2 grün markiert wurde. Bei der Vorwärtssequenzierung konnten als 98. und 99. Aminosäure Phenylalanin und Glycin identifiziert werden, während die Rückwärtssequenzierung an dieser Stelle die beiden Aminosäuren Serin und Alanin zeigte. Die Kontrollchromatogramme der DNA-Sequenzierung wiesen stets eine Uneindeutigkeit zu Beginn einer Sequenz auf, da kurze DNA-Abschnitte schwerer analysiert werden können. Die Aminosäuren Serin und Alanin traten als 1. Aminosäuren bei der Rückwärtssequenzierung kurz nach dem Bereich des Primers auf, weshalb mit einer geringeren Zuverlässigkeit der Ergebnisse in diesem Bereich zu rechnen ist. Deshalb werden die Aminosäuren Phenylalanin und Glycin als 98. und 99. Aminosäure als wahrscheinlicher angesehen. Darüber hinaus konnte die massenspektrometrische Analyse der Proben nur Peptide mit diesen beiden Aminosäuren finden, während Peptide mit den Aminosäuren Serin und Alanin nicht auftraten (Genaue Ergebnisse siehe: 4.2.2).

Die Patienten-Probe EW 1046 wies bei der 113. Aminosäure Prolin eine weitere Unregelmäßigkeit auf, welche rot in der Abbildung 4.2 markiert wurde. Diese Aminosäure befindet sich in der konstanten Region der freien Leichtketten. Die DNA-Sequenzierung zeigte an dieser Stelle ein Histidin, wohingegen die Sequenz der konstanten Region aus der *UniProtKB*-Datenbank ein Prolin postuliert. Des Weiteren handelt es sich bei der Stelle um den Bereich, in dem der Primer gebunden hat. Der Primer wurde so gewählt, dass er an die Sequenz TVAAPSVF bindet. Selbst wenn der Primer nicht 100 %-spezifisch an die cDNA gebunden haben sollte, so codieren die DNA-Amplifikate die TVAAPSVF-Sequenz, da diese die Verlängerung der Primer darstellen. Deshalb kann von einem Fehler der DNA-Sequenzierung ausgegangen werden und das Prolin an dieser Stelle erscheint wahrscheinlicher. Darüber hinaus konnte das Prolin in den nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen bestätigt werden (Genaue Ergebnisse siehe: 4.2.2).

Ein ähnliches Problem trat bei der Probe KR 1159 auf, welche ebenfalls an der 113. Aminosäurestelle (Prolin) einen Widerspruch zur Sequenz der konstanten Region zeigte. Laut Sequenzierergebnis existiert an dieser Stelle die Aminosäurekombination Histidin-Leucin-Serin, wohingegen nach der *UniProtKB*-Datenbank hier die beiden Aminosäuren Prolin und Serin zu finden sein sollten. Da sich die Aminosäuren jedoch im Bereich des Primers befinden, wird analog zum Vorgehen bei der Probe EW 1046 von dem Auftreten der Kombination Prolin-Serin ausgegangen.

Bei dem Patienten SP 1070 traten keine Widersprüche bei den Sequenzierungen auf. Allerdings deckten weder die Vorwärts- noch die Rückwärtssequenzierung die ersten sechs Aminosäuren ab. Die ermittelte Sequenz wurde deshalb durch die Aminosäureabfolge DI-QMTQ ergänzt, welche in der *V-Base*<sup>2</sup>-Datenbank als häufigste Sequenz auftaucht. Da jedoch durchaus Mutationen in diesem Bereich der FLC auftreten können, muss diese Sequenz mit großer Vorsicht betrachtet werden und bei dem Auftreten von posttranslationalen Modifikationen müssen diese zusätzlich verifiziert werden. Auch bei dem Patienten KR 1159 konnten die ersten fünf Aminosäuren nicht anhand der DNA-Sequenzierung bestimmt werden, weshalb sie analog zu der SP 1070-Probe ergänzt wurden.

### 4.2.1.3 Überprüfung der konstanten Region

Die Sequenz der konstanten Region wurde für alle sechs Patientenproben aus der *UniProtKB*-Datenbank entnommen. Da bei den  $\kappa$ -Leichtketten nur ein Gen für die konstante Region im menschlichen Genom vorhanden ist [24], wird auch nur eine Sequenz für die konstante Region erwartet. In der variablen Region der leichten Kette treten eine Vielzahl von Mutationen auf, die während der Plasmazellreifung entstanden sind und daher nicht im menschlichen Genom codiert sind. Dies wirft die Fragestellung auf, inwiefern Mutationen in der konstanten Region während der Plasmazellreifung auftreten. Zur Beantwortung wurden die *UniProtKB*- und die *AL-Base*-Datenbank auf Sequenzen der konstanten Region untersucht. Die *UniProtKB*-Datenbank enthielt nur einen Eintrag mit der Sequenz der konstanten Region, welche für die Ergänzung der in dieser Arbeit untersuchten FLC-Aminosäuresequenzen genutzt wurde. Alle weiteren Aminosäuresequenzen von  $\kappa$ -

---

<sup>2</sup>Datenbank für Immunglobuline

Leichtketten enthielten nur den variablen Bereich, sodass keine Rückschlüsse auf die konstante Region erfolgen konnten. Von den 100 Einträgen der *AL-Base*-Datenbank beinhalteten 30 Einträge die Sequenz der konstanten Region, wobei alle Einträge 100 % Sequenzhomologie mit dem Eintrag aus der *UniProtKB*-Datenbank aufwiesen. Aus den Einträgen in der *AL-Base*-Datenbank ging jedoch nicht hervor, ob diese experimentell ermittelt oder aus einer Datenbank entnommen wurden. Aufgrund von fehlenden abweichenden Sequenzen der konstanten Region wird von der Korrektheit der verwendeten Sequenz ausgegangen.

#### **4.2.2 Massenspektrometrische Verifizierung der Sequenzen**

Zur Verifizierung der durch PCR-isolierten und sequenzierten Aminosäuresequenzen wurden aus den Knochenmarksüberständen die FLCs isoliert, diese mit Trypsin und Chymotrysin verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Mit Hilfe der in den Massenspektren gefundenen Peptide konnten bei den sechs Patientenproben zwischen 79 % und 100 % der Gesamtaminosäuresequenz bestätigt werden. Die genaue Abdeckung der Sequenz durch die Verdauung mit den Enzymen Trypsin und Chymotrysin ist in den Abbildungen 4.3 und 4.4 wiedergegeben. Dabei zeigte der Trypsinverdau außer bei den Patienten EW 1046 und KR 1159 die größere Sequenzabdeckung als der Chymotrypsinverdau.

Die durch PCR-ermittelten Aminosäuresequenzen der Patientenproben GI 1206 und WS 1199 konnten nahezu zu 100 % bestätigt werden. Eine Ausnahme stellten die drei Aminosäuren EAK an der 143. bis 145. Stelle in der konstanten Region dar, welche weder durch den Trypsin- noch dem Chymotrypsinverdau abgedeckt werden konnten. Da jedoch die restlichen Aminosäuren der konstanten Region verifiziert werden konnten, kann auch für diese drei Aminosäuren die Zuverlässigkeit erwartet werden. Die konstante Region der Patientenprobe SC 1211 wies ebenfalls an der 143. bis 145. Stelle diese Lücke in der Sequenzverifizierung auf. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der gefundenen Massenspektren der Bereich von der 72. bis 86. Aminosäure nicht bestätigt werden. Da bei der cDNA-Sequenzierung jedoch sowohl die Vorwärts- als auch die Rückwärtssequenzierung die gleichen Aminosäuren für diesen Bereich ermitteln konnten, wird die Richtigkeit dieser Aminosäuren für diesen Bereich angenommen. Das Fehlen eines für ein Peptid charakteristischen Massenspektrums stellt

**GI 1206:**

DIQMTQSPST LSASIGDRVT ITCRASQTIN SWLAWYQQKP GKAPKLLIYD ASLLESGVPS RFTGSGSGTE FTLTISSLQS DDFATYYCQQ YKSPYTFGQ GTKLEIKRITV  
 AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC 99 %  
 96 %  
 59 %

**SC 1211:**

DTQMTQSPST LSASVGDRLVT ITCRASQTIN NWLAWYQQKP GIAPKLLIYK ASTLESGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP DDFATYYCQQ YNSYSWTFGQ GTRVEIKRITV  
 AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC 92 %  
 87 %  
 53 %

**WS 1199:**

DIKMTQSPSS LSASVGDRLVT ITCQASQDIT NSLAWYQQKA GKAPKLLIYD VSNLEAGVPS RFSGGRSGTD FTFISSLQP EDIATYYCQQ YDIVPYTFGQ GTKLEIMRITV  
 AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECC 99 %  
 93 %  
 70 %

**Abbildung 4.3: Sequenzabdeckung für die Proben GI 1206, SC 1211 und WS 1199.** Die Abbildung zeigt die Verifizierung der mittels PCR-bestimmten Aminosäuresequenzen durch die massenspektrometrische Messung nach dem Trypsin- ( ) bzw. Chymotrypsinverdau ( ). Die konstante Region der FLC-Sequenz wurde blau hervorgehoben.

**EW 1046:**

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIP>NNLNWYQHKP GQAPKFLIYG ASNLELGVPS RFSRSASGTM FTFTITSVQP EDFATYYCQQ YGSLPPT**FGQ** GTRLEIKR**TV**  
 AAPS**VFIFPP** SDEQLKSGTA SVVCLLN**FY** P**REAKVQWKV** DNALQSGNSQ E**SVTEQDSK** ST**YLSLSTLT** LSKADYEK**HK** VYACEVTHQ**G** LSSP**VTKSFN** R**GEC** 79 %  
 53 %  
 77 %

**SP 1070:**

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS DYLSWYQQKP GKAPKLLI**YD** ASTLETGVPS RFGSGSGTY FTFTI**SSLQP** EDIATYYC**QQ** YDDLSPYTF**G** QG**TKLEIKRT**  
 VAAP**SVFIFP** PSDEQLKSGT ASVVCLLN**MF** Y**PREAKVQWK** VDNALQSGNS QESVTEQ**DSK** DST**YLSLSTL** T**LSKADYEKH** KYACEVTHQ**GLSSPVT**KSF NR**GEC** 100 %  
 99 %  
 95 %

**KR 1159:**

DIQMTQSPSS LSASIGDRVT ITCQASQEID NYLNWYQQKP GKAPKLLI**YD** ASNLEAGVPS RFSASGGTD F**TLTISS**LQS EDFATYYC**QQ** YDNLPR**TFGP** G**TKVDI**KR**TV**  
 AAPS**VFIFPP** SDEQLKSGTA SVVCLLN**FY** P**REAKVQWKV** DNALQSGNSQ E**SVTEQDSK** ST**YLSLSTLT** LSKADYEK**HK** VYACEVTHQ**G** LSSP**VTKSFN** R**GEC** 100 %  
 88 %  
 100 %

**Abbildung 4.4: Sequenzabdeckung für die Proben EW 1046, SP 1070 und KR 1159.** Die Abbildung zeigt die Verifizierung der mittels PCR-bestimmten Aminosäuresequenzen durch die massenspektrometrische Messung nach dem Trypsin-(**■**) bzw. Chymotrypsinverdau (**■**). Aminosäuren, die Abweichungen bei Sequenzierung zeigten, wurden grün bzw. rot markiert (siehe Abb. 4.2). Darüber hinaus wurde die konstante Region der FLCs blau hervorgehoben.

kein Argument für eine andere Aminosäuresequenz dar. Vielmehr könnte das Fehlen dieses Peptids auf eine schwierige Ionisierbarkeit bzw. Desolvatisierung sowie auf ein schlechtes Fragmentierungsverhalten zurückzuführen sein.

Bei der Probe EW 1046 zeigten sich mit 79 % die schlechteste Sequenzabdeckung, weshalb zusätzlich zum Trypsin- und Chymotrypsinverdau ein Thermolysin-Verdau vermessen wurde, mit dem 100 % der Sequenz abgedeckt werden konnten. Da sich der Trypsin- und Chymotrypsinverdau durch eine größere Spezifität beim Schneiden der Peptide und durch größere Peptide auszeichnen, werden deren Ergebnisse als zuverlässiger angesehen. Daher werden die Sequenzinformationen aus dem Thermolysinverdau zur Bestätigung der Aminosäuresequenz genutzt, bei der Identifizierung von PTMs aber auf diese verzichtet.

Darüber hinaus kam es bei der EW 1046-Probe bei der cDNA-Sequenzierung zu einem Widerspruch an der 98./99. Stelle, bei dem die Vorwärtssequenzierung ein Phenylalanin-Glycin ergab, während die Rückwärtssequenzierung ein Serin-Alanin postulierte. Deshalb wurden die Spektren nach den Massenspektren für die Peptide PPT-FG bzw. PPT-SA durchsucht, wobei stets nur Peptide mit den Phenylalanin-Glycin-Peptiden gefunden werden konnten, weshalb von einer Verifizierung dieser beiden Aminosäuren ausgegangen wird.

Bei den Patientenproben SP 1070 und KR 1159 konnten 100 % der Aminosäuren in den beiden Sequenzen verifiziert werden. Bei der Ermittlung der Aminosäuresequenzen durch die PCR zeigte sich bei den Proben EW 1046 und KR 1159 ein Widerspruch zwischen den PCR-Ergebnissen und dem Datenbankeintrag für die konstante Region bei der Aminosäure Prolin an der 113. Stelle. An dieser Stelle ergab die cDNA-Sequenzierung ein Histidin bzw. Histidin-Leucin, während laut Datenbank an dieser Stelle ein Prolin postuliert wurde. Zur Verifizierung des Prolins an dieser Stelle wurde manuell nach den Peptiden RTVAAPSVF und TVAAPSVF bzw. RTVAAHSVF und TVAHSVF sowie RTVAAHLSVF und TVAHLVSF gesucht, wobei bei der Suche sowohl die  $[M+2H^+]^{2+}$ - als auch  $[M+3H^+]^{3+}$ -Vorläuferionen berücksichtigt wurden. Dabei konnte stets nur das Peptid mit dem Prolin in den Massenspektren gefunden werden, sodass von einer Bestätigung des Prolins an dieser Stelle ausgegangen wird.

### 4.2.3 Sequenzhomologien zwischen den sechs Patientenproben

Eine vergleichende Darstellung der ermittelten Aminosäuresequenzen ist in der Abbildung 4.5 zusammengefasst. Die Aminosäuresequenzen der Patienten GI 1206, SC 1211, WS 1199, EW 1046 und KR 1159 bestehen aus 214 Aminosäuren, während die Probe SP 1070 eine Insertion an der 93. Stelle aufweist. Der Vergleich zwischen den Aminosäuresequenzen zeigt an 40 Stellen Unterschiede, was 37 % der variablen Region und 17 % der Gesamtsequenz entspricht.

Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Proben konnten anhand der gefundenen Aminosäuren keine Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen dem Auftreten von bestimmten Aminosäuren und einem Krankheitsbild gezogen werden. In umfangreicheren Studien könnten die identifizierten Stellen auf einen möglichen Zusammenhang untersucht werden.

### 4.2.4 Homologie mit Sequenzen aus Proteindatenbanken

Zur Bestätigung der  $\kappa$ -FLC-spezifischen Aminosäuresequenz und zur Identifizierung der FLC-Subtypen wurde ein Homologievergleich zwischen den sechs mittels PCR bestimmten Aminosäuresequenzen der Patienten GI 1206, SC 1211, WS 1199, EW 1046, SP 1070 und KR 1159 mit den Sequenzen aus der *UniProtKB/SwissProt*- bzw. *IMGT/GENE*-Datenbank durchgeführt.

Die *UniProtKB/SwissProt*-Datenbank stellt die größte Sammlung von Gen- und Proteinsequenzen aller Lebewesen und Viren dar, während sich die *IMGT/GENE*-Datenbank auf Gen- und Proteinsequenzen von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren konzentriert. Die Suche mit der *UniProtKB/SwissProt*-Datenbank diente dem Identifizieren des Immunglobulinsubtypen. Die zusätzliche Suche mit der Immunglobulin-spezifischen *IMGT/GENE*-Datenbank sollte die Zuverlässigkeit der Ergebnisse erhöhen, da diese über einen größeren Umfang an Immunglobulinsequenzen verfügt. Beide Datenbanksuchen zeigten für alle sechs Proben die größten Sequenzübereinstimmungen mit  $\kappa$ -FLC-Sequenzen, die dem Subtypen  $V_{\kappa}I$  (Variabel I) angehören. Deshalb gilt die Zuordnung der Patienten-FLC zum Subtypen  $V_{\kappa}I$  als sehr zuverlässig.

GI 1206	DIQMTQSPST	LSASIGDRVT	ITCRASQTIN	SWLAWYQQKP	GKAPKFLIYD
SC 1211	DTQMTQSPST	LSASVGDRVT	ITCRASQTIN	NWLAWYQQKP	GIAPKLLIYK
WS 1199	DIKMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCQASQDIT	NSLNWYQKKA	GKAPKLLIYD
EW 1046	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCQASQDIP	NNLNWYQHHP	GQAPKFLIYG
SP 1070	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCQASQDIS	DYLSWYQQKP	GKAPKLLIYD
KR 1159	DIQMTQSPSS	LSASIGDRVT	ITCQASQEID	NYLNWYQQKP	GKAPKLLIYD
GI 1206	ASSLESGVPS	RFTGSGSGTE	FTLTISLQS	DDFATYYCQQ	YK-SYPYTFG
SC 1211	ASTLESGVPS	RFSGSGSGTE	FTLTISLQP	DDFATYYCQQ	YN-SYSWTFG
WS 1199	VSNLEAGVPS	RFSGGRSGTD	FTFTISLQP	EDIATYYCQQ	YD-IVPYTFG
EW 1046	ASNLELGVPS	RFSRSASGTN	FTFTITSVQP	EDFATYYCQQ	YG-SLPPTFG
SP 1070	ASTLETGVPS	RFSGSGSGTY	FTFTISLQP	EDIATYYCQQ	YD-LSPYTFG
KR 1159	ASNLEAGVPS	RFSASGSGTD	FTLTISLQS	EDFATYYCQQ	YD-NLPRTFG
GI 1206	QGTKLEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK
SC 1211	QGTRVEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK
WS 1199	QGTKLEIMRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK
EW 1046	QGTRLEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK
SP 1070	QGTKLEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK
KR 1159	PGTKVDIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK
GI 1206	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ
SC 1211	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ
WS 1199	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ
EW 1046	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ
SP 1070	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ
KR 1159	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ
GI 1206	GLSSPVTKSF	NRGEC			
SC 1211	GLSSPVTKSF	NRGEC			
WS 1199	GLSSPVTKSF	NRGEC			
EW 1046	GLSSPVTKSF	NRGEC			
SP 1070	GLSSPVTKSF	NRGEC			
KR 1159	GLSSPVTKSF	NRGEC			

**Abbildung 4.5: Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen der sechs Patienten.** In der Abbildung wurden die Aminosäuresequenzen der Patienten GI 1206, SC 1211 und WS 1199, welche am Multiplen Myelom leiden, sowie die Sequenzen der Multiplen-Myelom-Patienten mit AL-Amyloidose-Beteiligung EW 1046, SP 1070 und KR 1159 zusammengefasst. Unterschiede in den Sequenzen wurden grau unterlegt. Bei dem Patienten SP 1070 trat an der 93. Stelle eine Insertion der Aminosäure Asparaginsäure auf, welche rot hervorgehoben wurde. Die konstante Region der FLCs wurde blau markiert.

### 4.3 Copräzipitation

Bei der Auswertung der MS/MS-Analysen identifizierte Mascot [87] bei allen Patientenproben die Proteine Apolipoprotein A und Serum Amyloid P Komponente (SAP). Diese beiden Proteine wurden auch von anderen Forschungsgruppen im Zusammenhang mit amyloiden Ablagerungen gefunden [96–102], weshalb die Colokalisation dieser Proteine mit den löslichen FLCs aus dem Knochenmark ein Indikator für die Neigung der FLCs zu amyloiden Ablagerungen sein könnte. So beschrieb u. a. Hatters *et al.* das Auftauchen von Apolipoprotein A I und -II sowie Apolipoprotein B100 und Apolipoprotein E in amyloiden Ablagerungen im Gehirn bei Arteriosklerose-Patienten [96]. Des Weiteren erwähnen Gunzburg *et al.* das Auftreten von Apolipoprotein E in den A $\beta$ -Ablagerungen von Alzheimerpatienten [103]. Und Lavatelli *et al.* zeigte die Colokalisation von Apolipoprotein J im 2-D-SDS-PAGE-GEL zusammen mit FLCs aus dem Serum von AL-Amyloidose-Patienten [104].

Die FLC-Proben für die massenspektrometrische Messung wurden mittels Affinitätschromatographie aus den Knochenmarksüberständen isoliert. Die Affinitätschromatographie sollte aufgrund der gebundenen anti- $\kappa$ -Antikörper spezifisch die FLCs aus dem Überstand isolieren, sodass mitidentifizierte Proteine bereits bei den Patienten assoziiert mit den FLCs vorgelegen haben müssten.

Bei den Patienten konnten zwischen 12 % und 79 % bei dem Trypsin- und zwischen 10 % und 78 % bei dem Chymotrypsinverdau der Sequenz des Apolipoproteins A I abgedeckt werden. Von dem SAP-Protein konnten zwischen 42 % und 69 % bei dem Trypsinverdau bzw. 7 % und 65 % bei dem Chymotrypsinverdau der Sequenz gefunden werden, weshalb beide Proteine bei den Patienten zuverlässig identifiziert werden konnten.

Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass das gleichzeitige Auftreten der Proteine Apolipoprotein und SAP zusammen mit den FLCs nicht zwangsläufig auf eine *In-vivo*-Assoziation der Proteine zurückzuführen ist. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Proteine Apolipoprotein und SAP unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden haben und deshalb zusammen mit den FLCs von der Affinitätschromatographiesäule coeluierten.

## 4.4 Posttranslationale Modifikationen

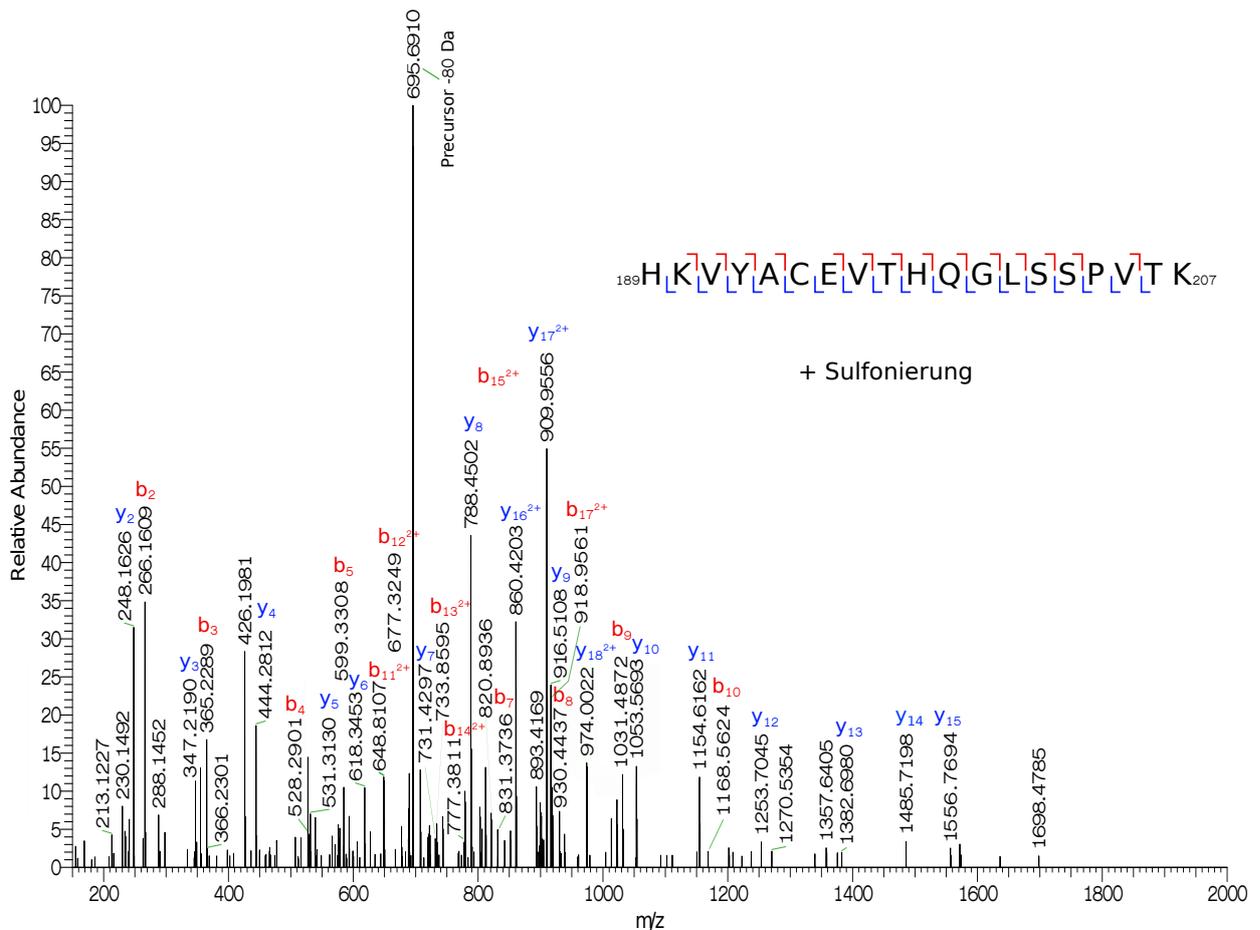
Zur Identifikation der posttranslationalen Modifikationen wurden die HCD-MS-Spektren mittels Mascot- und Sequest-Algorithmus analysiert. Dabei konnten durch den Sequest-Algorithmus [88] im Vergleich zur Mascot-Suche [87] keine zusätzlichen posttranslationalen Modifikationen identifiziert werden, weshalb bei den nachfolgenden Ausführungen auf die explizite Darstellung der Sequest-Ergebnisse verzichtet wurde.

### 4.4.1 Sulfonierung

Eine Sulfonierung ist in einer massenspektrometrischen Analyse durch eine Erhöhung der Peptidmasse um 79.96 Da erkennbar. Zur Unterscheidung der Sulfonierung von der fast identisch schweren 79.97 Da-Phosphorylierung bedarf es einer HCD- sowie einer ETD-MS-Messung. Eine Differenzierung allein aufgrund des Masseunterschieds von 0.01 Da ist mit der Orbitrap aufgrund zu geringer Präzision schwierig. In den HCD-MS-Spektren zeichnet sich eine Sulfonierung durch die Beobachtung des Vorläuferions mit einem Neutralverlust von 79.96 Da ( $-\text{SO}_3$ , im folgenden 80 Da genannt) sowie durch b- und y-Ionen mit einem Neutralverlust von ebenfalls 80 Da aus. [35, 77, 105]

Im Gegensatz dazu existiert bei einer Phosphorylierung im HCD-MS-Spektrum häufig das Vorläuferion inklusive der Phosphogruppe sowie ein Signal, das das Vorläuferion mit einem Neutralverlust von 97.96 Da ( $-\text{H}_3\text{PO}_4$ , im folgenden -98 Da genannt) darstellt. Die b- und die y-Ionen zeichnen sich bei der Phosphorylierung ebenfalls durch das Vorhandensein der Phosphogruppe beziehungsweise durch einen Neutralverlust von 98 Da aus [35, 38, 78, 79, 105].

Aufgrund des Neutralverlustes ist eine Lokalisation der Sulfonierung innerhalb der HCD-MS-Messung nicht möglich, da keine Ionen mit der Sulfonierung vorhanden sind. Eine Lokalisation der PTM kann jedoch mit einer ETD-Analyse erfolgen. Bei der ETD-MS-Messung kann sowohl bei der Sulfonierung als auch bei der Phosphorylierung die posttranslationale Modifikation an den c-, z- und z+1-Ionen erhalten bleiben [77, 81, 82, 106], sodass eine Unterscheidung zwischen der Sulfonierung und der Phosphorylierung nicht möglich ist. Allerdings zeigen die PTM-haltigen Fragment-Ionen die Position der posttranslationalen Modifikation

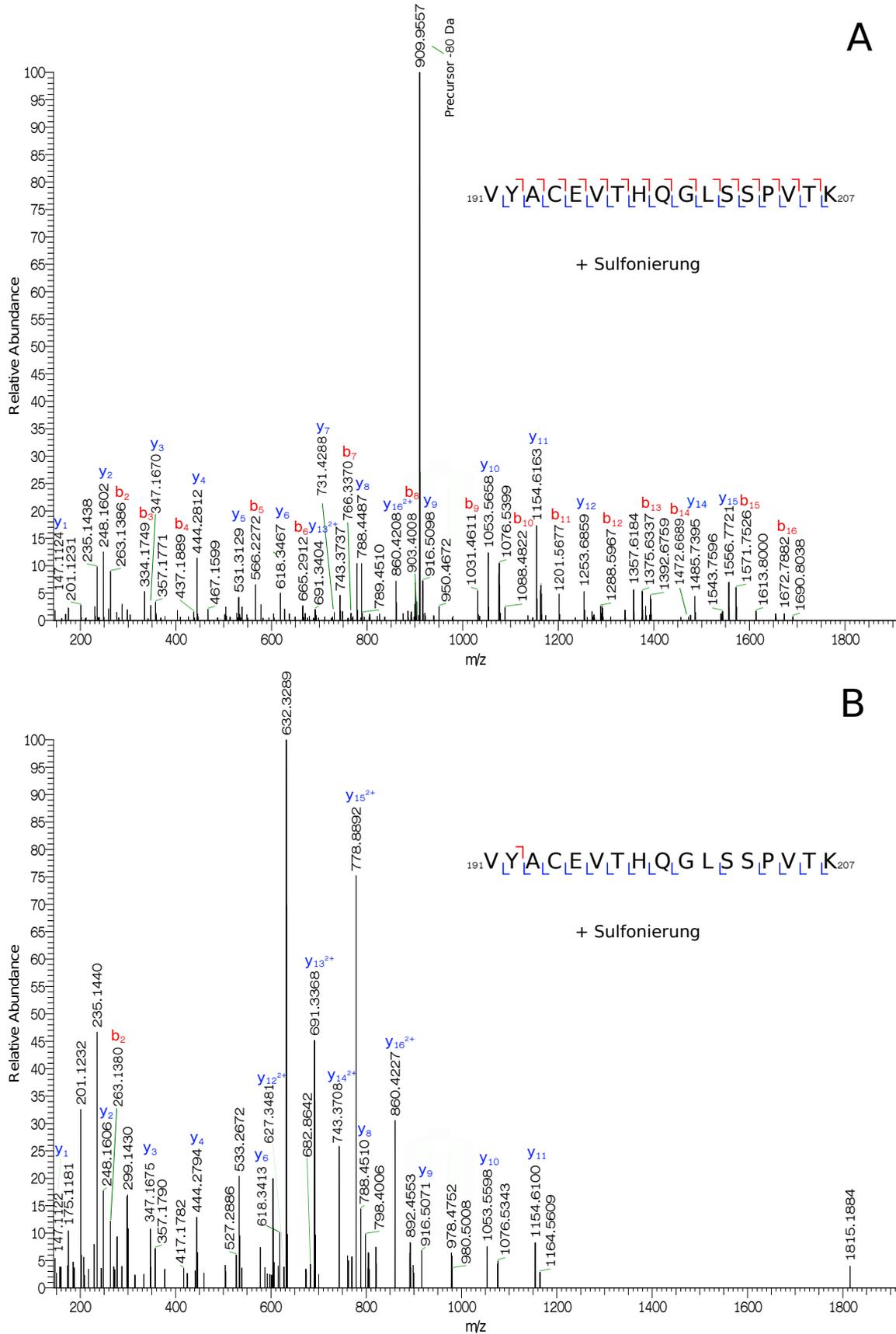


**Abbildung 4.6:** HCD-MS-Spektrum des sulfonierten trypsinverdauten Peptids  $^{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  am Beispiel des Patienten GI 1206. Das MS/MS-Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 722.34 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 2164.00 Da. Die markierten  $y$ - und  $b$ -Ionen zeigen jeweils die unsulfonierten Ionen.

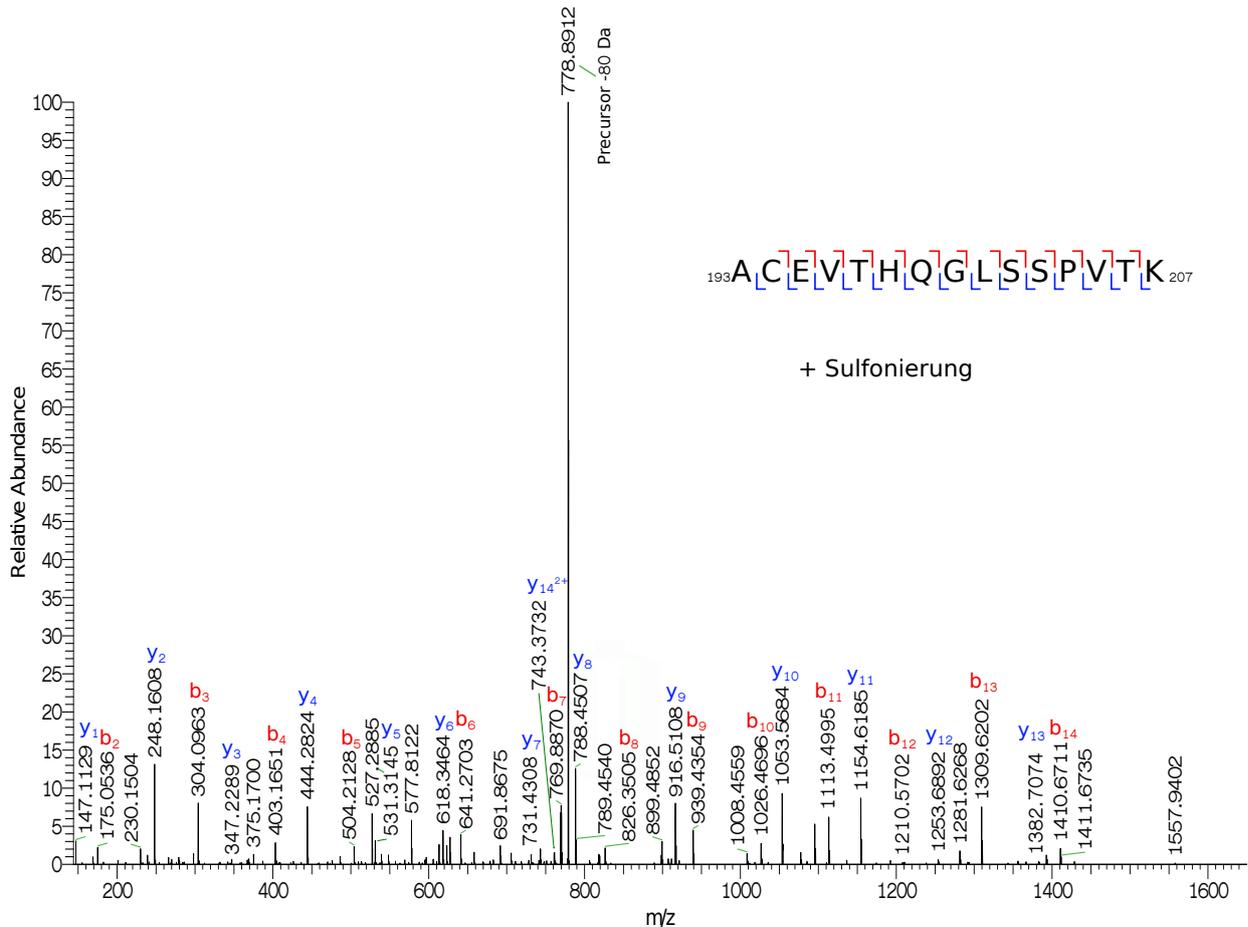
an. Eine Sulfonierung kann dabei an einem Serin, einem Threonin, einem Tyrosin bzw. einem Cystein auftreten.

#### 4.4.1.1 Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194

**HCD** Die HCD-MS-Messungen ergaben für alle Patienten sowohl beim Trypsin- als auch beim Chymotrypsinverdau mehrere unterschiedliche Peptide, die eine Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194 zeigen. Bei der Trypsin-Messung konnten hauptsächlich die beiden Peptide  $^{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  und  $^{191}\text{VYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  mit jeweils einer Sulfonierung identifiziert werden. In den Abbildungen 4.6 und 4.7 sind für diese beiden Peptide die Spektren der Patienten GI 1206 und SP 1070 beispielhaft dargestellt. Bei



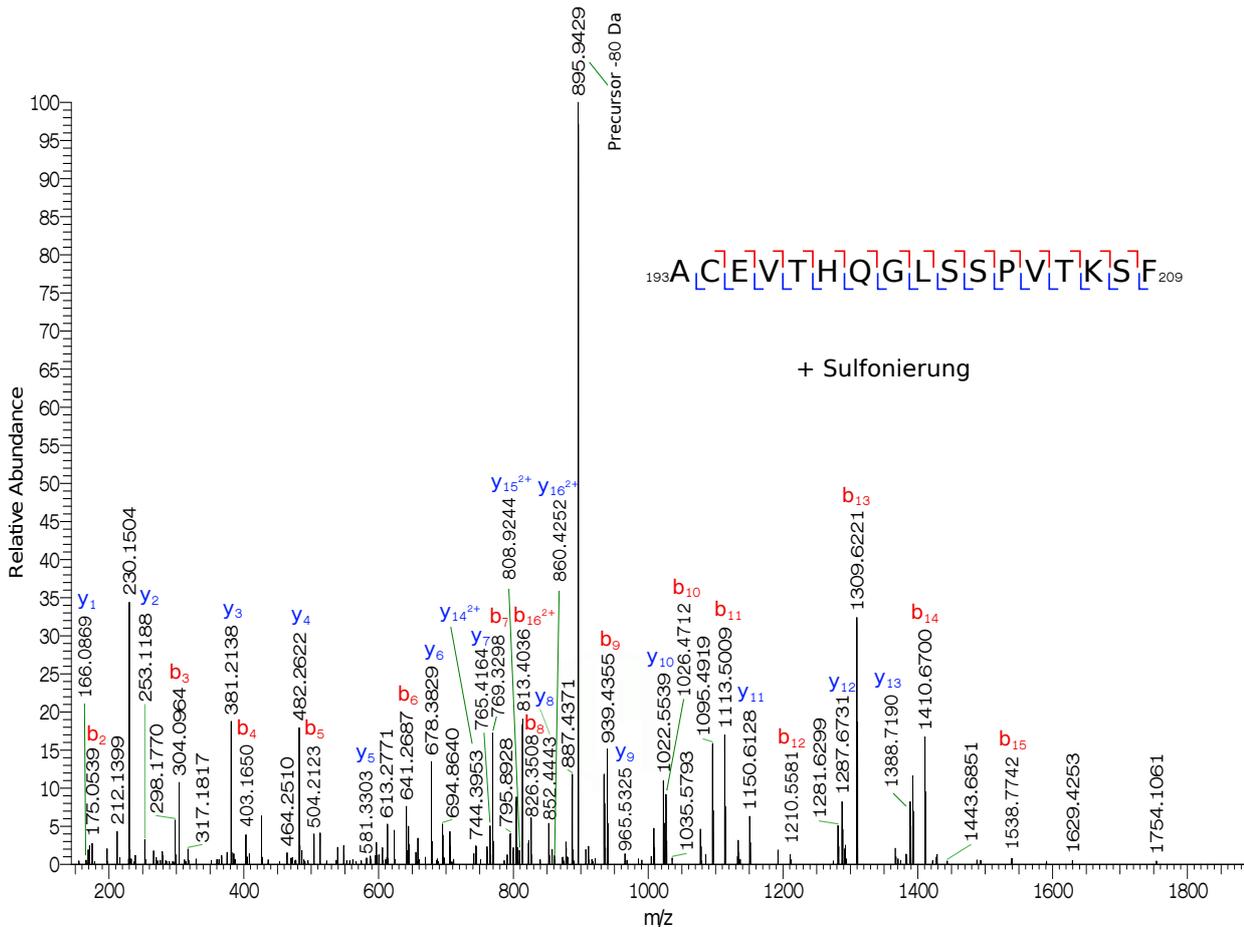
**Abbildung 4.7: HCD-MS-Spektren des sulfonierten trypsinverdauten Peptids  $^{191}\text{VYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  am Beispiel des Patienten SP 1070.** Darstellung der HCD-MS-Spektren der  $2^+$ -fach- (A) bzw.  $3^+$ -fachgeladenen (B) Vorläuferionen 949.93 Da bzw. 633.63 Da. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1897.85 Da bzw. 1897.87 Da. Die markierten y- und b-Ionen zeigen jeweils die unsulfonierten Ionen.



**Abbildung 4.8: HCD-MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  mit einer Sulfonierung am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 818.87 Da und einer  $2^+$ -Ladung. Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1635.73 Da. Die dargestellten  $y$ - und  $b$ -Ionen zeigen die Ionen ohne eine Sulfonierung.

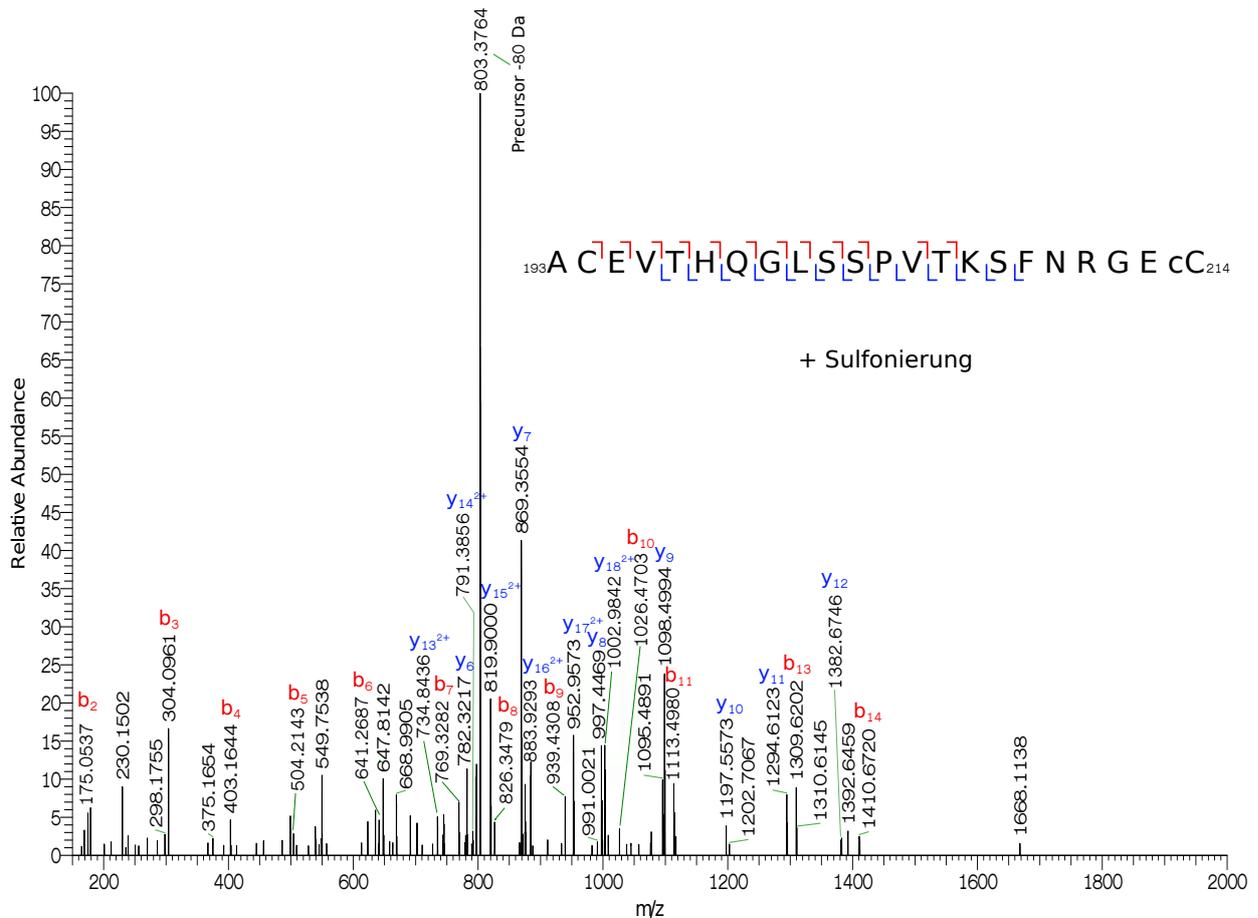
dem Chymotrypsinverdau konnten vor allem die Peptide  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTKSF}_{209}$ ,  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  sowie  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC}_{214}$  gefunden werden. Für diese Peptide befinden sich in den Abbildungen 4.8, 4.9 sowie 4.10 beispielhaft für die Patienten SP 1070 und GI 1206 die jeweiligen Spektren. Eine vollständige Übersicht für alle Patienten über die gefundenen Peptide ist in der Tabelle 4.1 aufgelistet.

Das Spektrum in der Abbildung 4.6 zeigt das sulfonierte Peptid  ${}_{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ . Bei diesem Peptid konnte das Vorläuferion mit einem Neutralverlust von 80 Da ( $m/z=695.6910$ ), nicht aber das Vorläuferion mit der PTM bzw. mit einem Neutralverlust von 98 Da gefunden werden. Der Vergleich mit literaturbekannten Spektren von Medzih-



**Abbildung 4.9: HCD-MS-Spektrum des Peptids  $^{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTKSF}_{209}$  mit einer Sulfonierung nach dem Chymotrypsinverdau am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das HCD-MS-Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 935.92 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1869.83 Da. Die angegebenen y- und b-Ionen sind jeweils unsulfoniert.

radszky *et al.* [35] zeigt, dass das Vorhandensein des 80 Da-Vorläuferions auf eine Sulfonierung dieses Peptides hindeutet, während das Nichtvorhandensein des Vorläuferions bzw. 98 Da-Vorläuferions gegen die Phosphorylierung des Peptides spricht. Darüber hinaus konnte die vollständige y-Serie von  $y_2$ - $y_{18}$  mit einem Neutralverlust von 80 Da gefunden werden, während kein y-Ion ohne Neutralverlust bzw. mit einem Neutralverlust von 98 Da erkennbar war. Auch dies deutet auf die Sulfonierung hin und spricht gegen die Phosphorylierung. Das Auftreten der vollständigen y-Serie bestätigt außerdem die Sequenz des Peptids. Neben der y-Serie konnte in dem Spektrum eine nahezu vollständige b-Serie von  $b_2$  bis  $b_{17}$  gefunden werden, die ebenfalls die Peptidsequenz verifiziert. Allerdings fehlen hier das  $b_6$ - und  $b_{16}$ -Ion. Die Erfahrung bei der Auswertung anderer HCD-MS-Spektren zeigt aber, dass dies in HCD-



**Abbildung 4.10: HCD-MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids  $_{193}$ ACEVTHQGLSSPV-TKSFNRGEc $_{214}$  mit einer Sulfonierung am Beispiel des Patienten GI 1206.** Das HCD-MS-Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 830.03 Da und einer 2<sup>+</sup>-Ladung. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1658.05 Da. Zusätzlich zur Sulfonierung befindet sich am Cystein C214 eine Carbamidomethylierung. Die dargestellten y- und b-Ionen entsprechen den unsulfonierten Ionen.

MS-Spektren nicht ungewöhnlich ist, da y-Ionen zuverlässiger auftreten als b-Ionen. Analog zu den y-Ionen konnten bei den b-Ionen nur Ionen mit einem Neutralverlust von 80 Da und keine ohne Neutralverlust bzw. mit einem Neutralverlust von 98 Da gefunden werden, was wieder als Hinweis auf eine Sulfonierung gewertet wird. Da sowohl die Vorläuferionen als auch die y- und b-Ionen stets das typische Verhalten einer Sulfonierung zeigen, wird dieses Spektrum als Nachweis einer Sulfonierung am Peptid  $_{189}$ HKVYACEVTHQGLSSPVTK $_{207}$  angesehen. Der Neutralverlust verhindert jedoch die Lokalisierung der Sulfonierung. Es wird vermutet, dass sich die Sulfongruppe am Cystein C194 befindet, da Cysteine aufgrund der Probenvorbereitung eine Carbamidomethylierung zeigen sollten. Das Fehlen der Carbamidomethylierung am Cystein C194 könnte durch eine sterische Hinderung durch eine Sulfon-

gruppe an diesem Cystein entstanden sein. Der Nachweis der Sulfonierung an dieser Stelle kann jedoch mit Hilfe der ETD-MS-Spektren unterstützt werden.

Das sulfonierte  ${}_{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ -Peptid trat auch bei dem Patienten EW 1046 auf. Allerdings weist bei diesem die  $\gamma$ -Serie einzelne Lücken auf. Da jedoch ein Großteil der  $\gamma$ - und  $b$ -Ionen sowie das Signal des 80 Da-Vorläuferions mit dem Spektrum in der Abbildung 4.6 identisch ist, wird vom dem gleichen Peptid mit der gleichen PTM ausgegangen.

Das  ${}_{191}\text{VYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ -Peptid tauchte sowohl als  $2^{+}$ - und  $3^{+}$ -geladenes sulfoniertes Peptid auf, dessen Spektren in der Abbildung 4.7 dargestellt sind. Analog zu dem  ${}_{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ -Peptid in der Abbildung 4.6 befindet sich im  $2^{+}$ -HCD-MS-Spektrum das für eine Sulfonierung typische 80 Da-Vorläuferion ( $m/z=909.9557$ ), während das für eine Phosphorylierung typische Vorläuferion ohne Neutralverlust nicht auftaucht. Allerdings findet sich ein kleines Signal ( $m/z=900.9515$ ), das dem Vorläuferion mit einem 98 Da-Neutralverlust oder aber auch dem Vorläuferion mit einem 80 Da- und  $\text{H}_2\text{O}$ -Neutralverlust entsprechen könnte und somit nicht eindeutig einer Sulfonierung oder Phosphorylierung zugeordnet werden kann. Da der Hauptpeak 909.9557 allerdings dem Vorläuferion mit dem sulfonierungstypischen Neutralverlust entspricht, wird von einer Sulfonierung des Peptides in diesem Spektrum ausgegangen. Darüber hinaus beinhaltet dieses Spektrum die vollständige  $\gamma$ - und  $b$ -Serie von  $\gamma_1$  bis  $\gamma_{16}$  bzw.  $b_2$  bis  $b_{16}$  mit einem Neutralverlust von 80 Da. Die analogen  $\gamma$ - und  $b$ -Ionen ohne Neutralverlust bzw. 98 Da-Neutralverlust konnten nicht gefunden werden. Auf Grundlage dieser typischen Neutralverluste gilt das Vorhandensein der Sulfonierung in Abgrenzung zur Phosphorylierung in diesem Spektrum als bewiesen.

Das Spektrum von dem  $3^{+}$ -geladenen Peptid weist eine nahezu vollständige  $\gamma$ -Serie mit dem typischen Neutralverlust von 80 Da ohne den phosphorylierungstypischen Neutralverlust auf. Ionen der  $b$ -Serie konnten mit Ausnahme des  $b_2$ -80 Da-Ions weder mit der PTM, noch mit einem Neutralverlust von 80 Da oder 98 Da gefunden werden. Außerdem konnte kein Signal identifiziert werden, das das Vorläuferion mit der PTM, mit einem Neutralverlust von 80 Da oder 98 Da präsentiert. Da nur die  $\gamma$ -Serie das für die Sulfonierung typische Verhalten zeigt,

wird dieses Spektrum nur mit Einschränkungen als Nachweis für die Sulfonierung angesehen. Da das gleiche Peptid aber bereits als 2<sup>+</sup>-geladenes Peptid die Sulfonierung bewies, unterstützt das Vorhandensein des 3<sup>+</sup>-geladenen Peptids die Zuverlässigkeit der Identifizierung der Sulfonierung.

Bei dem Chymotrypsinverdau konnten die drei Peptide  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ ,  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTKSF}_{209}$  sowie  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC}_{214}$  gefunden werden. Das in der Abbildung 4.8 dargestellte sulfonierte Peptid  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  zeichnet sich durch eine hohe Zuverlässigkeit bei der Identifikation der Sulfonierung aus, da sowohl die y- als auch die b-Serie mit dem sulfonierungstypischen Neutralverlust von 80 Da gefunden werden konnten, während die phosphorylierungstypischen Neutralverluste nicht aufgetreten sind. Die y- und die b-Serie existiert in dem Spektrum lückenlos von  $y_1$  bis  $y_{14}$  bzw. von  $b_2$  bis  $b_{14}$  und verifiziert damit die Peptidsequenz. Darüber hinaus konnte im Spektrum das Vorläuferion mit einem Neutralverlust von 80 Da ( $m/z=778.8912$ ), nicht aber das Vorläuferion ohne Neutralverlust detektiert werden.

Analog zum Peptid  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  in der Abbildung 4.8 zeigt auch das sulfonierte Peptid  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTKSF}_{209}$  in der Abbildung 4.9 eine lückenlose y- und b-Serie, die sich nur durch den sulfonierungstypischen Neutralverlust von 80 Da sowohl bei der y- und b-Serie sowie bei dem Vorläuferion auszeichnet ( $m/z=895.9429$ ) und somit zuverlässig die Sulfonierung an diesem Peptid bestätigt.

Das in der Abbildung 4.10 dargestellte Peptid  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC}_{214}$  bestätigt ebenfalls die Sulfonierung, welche sich wahrscheinlich am Cystein C194 befindet. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Peptiden handelt es sich hierbei mit 21 Aminosäuren um ein größeres Peptid, dessen vollständige Sequenzabdeckung durch die y- und b-Serie erschwert ist, da die größeren Ionen schlechter im HCD-MS-Spektrum zu sehen sind. Dennoch existieren die lückenlose y-Serie von  $y_6$  bis  $y_{18}$  sowie die nahezu lückenlose b-Serie von  $b_2$  bis  $b_{14}$  ohne das  $b_{12}$ -Ion. Dadurch kann die Gesamtsequenz des Peptids durch die Kombination der y- und b-Serie verifiziert werden. Außerdem konnte auch in diesem Spektrum das charakteristische Vorläuferion mit einem Neutralverlust von 80 Da ( $m/z=803.3764$ ) gefunden

**Tabelle 4.1: Übersicht der sulfonierten Peptide im Bereich des Cysteins C194 aus der HCD-MS-Messung.** Aufgeführt sind für jeden Patienten die gefundenen Spektren. Für jedes Spektrum wurde die Qualität der b- und y-Serie bewertet: b:+++ := lückenlose b-Serie, b:++ := b-Serie mit vereinzelten Lücken, im Bereich von C194 aber lückenlos, b:(++) := b-Serie mit vereinzelten Lücken (auch im Bereich des Cysteins C194), b:+ := vereinzelte b-Ionen, b:- := kein b-Ion vorhanden. Analog zur b-Serie wurde die y-Serie bewertet. Die Zahlen in der Tabelle verweisen auf die abgebildeten Spektren im Anhang.

Multiples Myelom		Multiples Myelom mit AL-Amyloidose			
GI 1206	SC 1211	WS 1199	EW 1046	SP 1070	KR 1159
Trypsinverdau					
Peptid <sub>189</sub> HKVYACEVTHQGLSSPVTK <sub>207</sub>					
b:(+++), y:+++ (Abb. 4.6)	-	-	b:(++), y:(++) (Abb. A.2)	-	-
Peptid <sub>191</sub> VYACEVTHQGLSSPVTK <sub>207</sub>					
b:++++, y:+++ (Abb. A.3)	b:+++, y:+++ (Abb. A.4)	b:(++), y:+++ (Abb. A.5)	b:+++, y:(++) (Abb. A.6)	b:++++, y:+++ (Abb. 4.7)	b:+++, y:+++ (Abb.A.7)
Chymotrypsinverdau					
Peptid <sub>193</sub> ACEVTHQGLSSPVTK <sub>207</sub>					
-	b:+++, y:+++ (Abb. A.8)	-	-	b:++++, y:+++ (Abb. 4.8)	b:++++, y:+++ (Abb. A.9)
Peptid <sub>193</sub> ACEVTHQGLSSPVTKSF <sub>209</sub>					
b:(+++), y:(+++) (Abb. A.10)	b:+++, y:+++ (Abb. A.11)	b:(+++), y:(+++) (Abb. A.12)	b:++++, y:+++ (Abb. A.13)	b:++++, y:+++ (Abb. 4.9)	b:++++, y:+++ (Abb. A.14)
Peptid <sub>193</sub> ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <sub>214</sub>					
b:+++, y:(+++) (Abb. 4.10)	b:+++, y:(+++) (Abb. A.15)	b:+++, y:(+++) (Abb. A.16)	-	-	-

werden. Darüber hinaus sind die Ionen der  $y$ - und  $b$ -Serie ebenfalls mit dem spezifischen Neutralverlust von 80 Da vorhanden, während Ionen mit einem für eine Phosphorylierung charakteristischen Neutralverlust fehlen. Die Lokalisierung der Sulfonierung ist durch den Verlust der PTM auch bei diesem Peptid nicht eindeutig möglich. Allerdings existiert in diesem Peptid an der Stelle C214 ein weiteres Cystein, das im Gegensatz zum Cystein C194 eine Carbamidomethylierung trägt. Die selektive Addition der Carbamidomethylierung am Cystein C214 deutet auf eine Hemmung der Carbamidomethylierung am C194 hin, wie sie durch eine sterische Hinderung durch eine bereits vorhandene Sulfonierung erfolgen könnte. Deshalb untermauert dieses Spektrum die Hypothese, dass die Sulfonierung am Cystein C194 lokalisiert ist.

Bei allen drei Peptiden des Chymotrypsinverdaus konnten neben dem Vorläuferion mit einem 80 Da-Neutralverlust jeweils ein sehr kleines Signal identifiziert werden, der das Vorläuferion mit einem Neutralverlust von 98 Da zeigt. Dies könnte ein Hinweis auf eine Phosphorylierung sein. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass diese Signale dem Vorläuferion nach dem Verlust der Sulfo- und einer  $H_2O$ -Gruppe entsprechen, da die  $y$ - und  $b$ -Ionen nur mit dem sulfonierungstypischen 80 Da-Neutralverlust vorhanden sind und auch der Hauptpeak dem Vorläuferion mit dem sulfonierungstypischen 80 Da-Neutralverlust entspricht. Der Verlust von  $H_2O$  kommt typischerweise in MS/MS-Spektren vor, weshalb die gezeigten Spektren höchstwahrscheinlich eine Sulfonierung an diesen Peptiden zeigen.

Alle fünf beschriebenen sulfonierten Peptide konnten bei mehreren Patienten nachgewiesen werden, auch wenn nicht alle Peptide bei jedem Patienten vorkamen. In der Tabelle 4.1 befindet sich eine Zusammenfassung, welche Peptide bei welchem Patienten gefunden werden konnten. Peptide, die bei mehreren Patienten auftauchten, hatten nicht immer die gleiche Qualität wie die in diesem Abschnitt beschriebenen Peptid-Spektren. Da jedoch die Peptide stets das gleiche Vorläuferion- $m/z$  aufwiesen und ein Großteil der  $y$ - und  $b$ -Ionen vorhanden war, wird von der Gleichheit und damit dem Vorhandensein von sulfonierten Peptiden ausgegangen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für alle sechs Patientenproben mindestens ein Peptid im Trypsin- und Chymotrypsinverdau identifiziert werden konnte, das eine Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194 durch das Auftreten von  $\gamma$ - und  $b$ -Ionen sowie des Vorläufers mit dem für die Sulfonierung charakteristischen Neutralverlust von 80 Da bestätigt. Bei all diesen gefundenen Peptiden liegt das Cystein C194 ohne Carbamidomethylierung vor, weshalb die Lokalisation der Sulfonierung an dieser Stelle postuliert wird. Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die Identifizierung der Sulfonierung in den MS-Spektren nicht zwangsläufig auch eine *In-vivo*-Funktion dieser PTM bedeutet.

**ETD-MS-Messung** Bei den ETD-MS-Messungen konnten die drei sulfonierten Peptide  $_{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ ,  $_{190}\text{KVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  sowie  $_{191}\text{VYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  aus dem Trypsinverdau identifiziert werden. Für jedes Peptid wurde in den Abbildungen 4.11, 4.12 bzw. 4.13 ein ETD-MS-Spektrum eines der Patienten beispielhaft dargestellt. Für die anderen Patienten befinden sich die Spektren mit diesen Peptiden im Anhang. Dabei konnten bei fast allen Patienten diese drei Peptide gefunden werden, wobei nicht bei allen Patienten mit Hilfe der Spektren die Lokalisation der Sulfonierung bestimmt werden konnte. Eine Zusammenfassung der auftretenden Peptide befindet sich für jeden Patienten in der Tabelle 4.2.

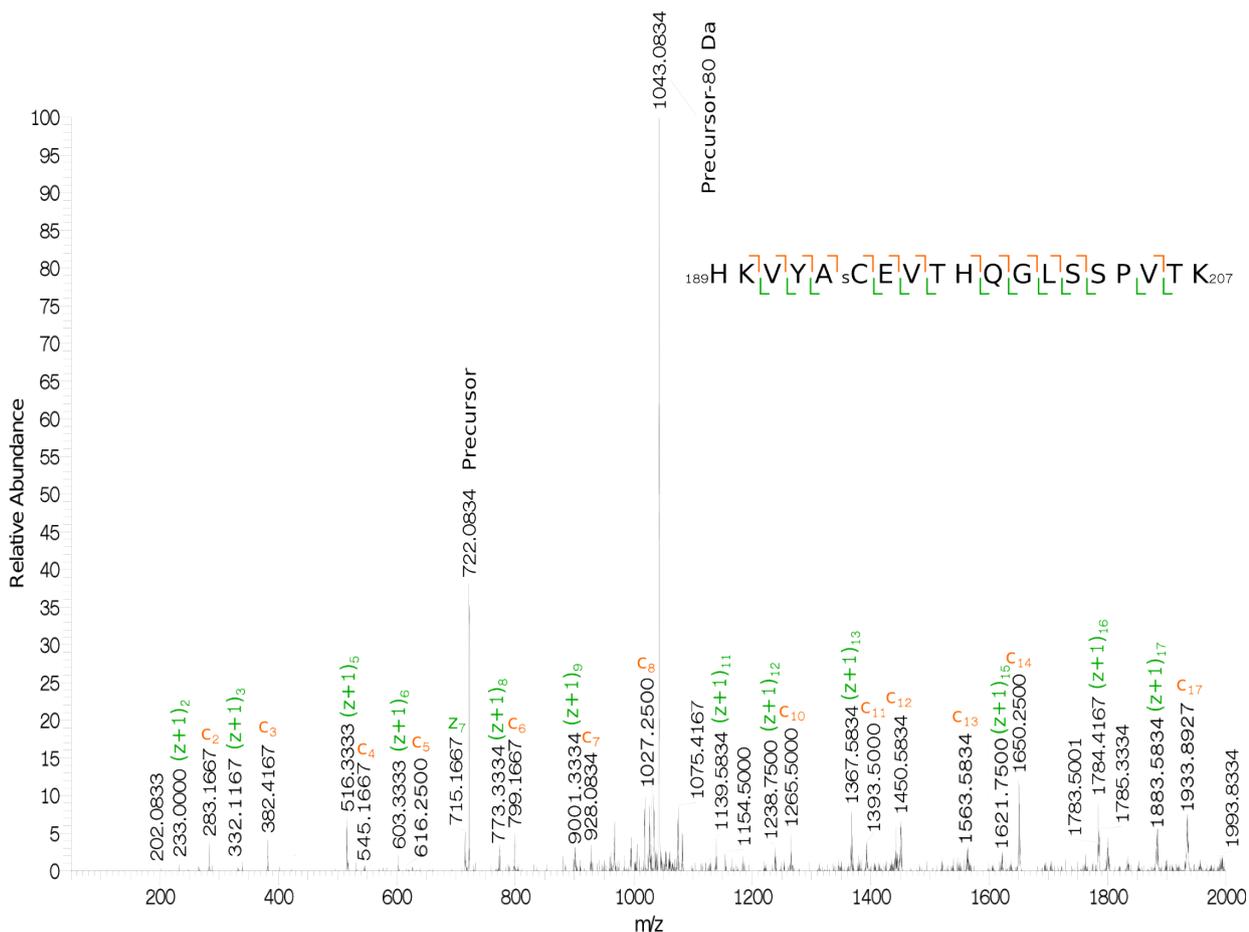
Die meisten gefundenen Spektren zeichnen sich durch  $c$ -Ionen mit der PTM ab dem Cystein C194 oder der Glutaminsäure E195 und durch  $z/z+1$ -Serien ohne PTM bis zur Glutaminsäure E195 aus. Die PTM-freien  $c$ - bzw. PTM-tragenden  $z/z+1$ -Ionen fehlen in diesen Spektren oder sind nur lückenhaft vorhanden. Dadurch kann die Position der Sulfonierung zwar auf die Aminosäuren Cystein C194 und Tyrosin Y192 eingegrenzt werden, eine Unterscheidung ist jedoch nicht immer möglich.

Das Peptid  $_{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  zeigte die besten Spektren zur Positionsbestimmung der Sulfongruppe. So konnte bei dem Patienten GI 1206 das in der Abbildung 4.11 dargestellte Spektrum gefunden werden. Bei diesem existieren die  $c$ -Ionen ohne PTM von  $c_2$  bis  $c_5$  sowie die  $c$ -Ionen mit PTM von  $c_6$  bis  $c_{17}$  mit Ausnahme der  $c_9$ -,  $c_{15}$ - und  $c_{16}$ -Ionen. Damit kann die Sulfonierung nur an der 6. Aminosäure am Cystein C194 sein, da das  $c_6$ -Ion

das erste Ion mit der Modifikation ist. Die Lokalisation der Sulfonierung wird ebenfalls durch die z- bzw. z+1-Serie bestätigt. So sind die z- und/oder z+1-Ionen ohne 80 Da-PTM von z/z+1<sub>2</sub> bis z/z+1<sub>13</sub> mit Ausnahme der z/z+1<sub>4</sub>- und z/z+1<sub>10</sub>-Ionen vorhanden, während die z/z+1-Ionen mit PTM von z/z+1<sub>15</sub> bis z/z+1<sub>17</sub> gefunden werden konnten. Das Auftauchen der z/z+1<sub>15</sub>-Ionen inklusive der 80 Da-Modifikation verifiziert die Sulfonierung am Cystein C194 auch ohne das sulfonierte z/z+1<sub>14</sub>-Ion, da bei einer Sulfonierung am Tyrosin Y192 erst das z/z+1<sub>16</sub>-Ionen mit Sulfonierung und das z/z+1<sub>15</sub> ohne Modifikation auftreten müsste. Das Vorhandensein des sulfonierten z/z+1<sub>14</sub>-Ions würde diese Aussage unterstützen, für den Nachweis der Lokalisation ist es jedoch nicht notwendig.

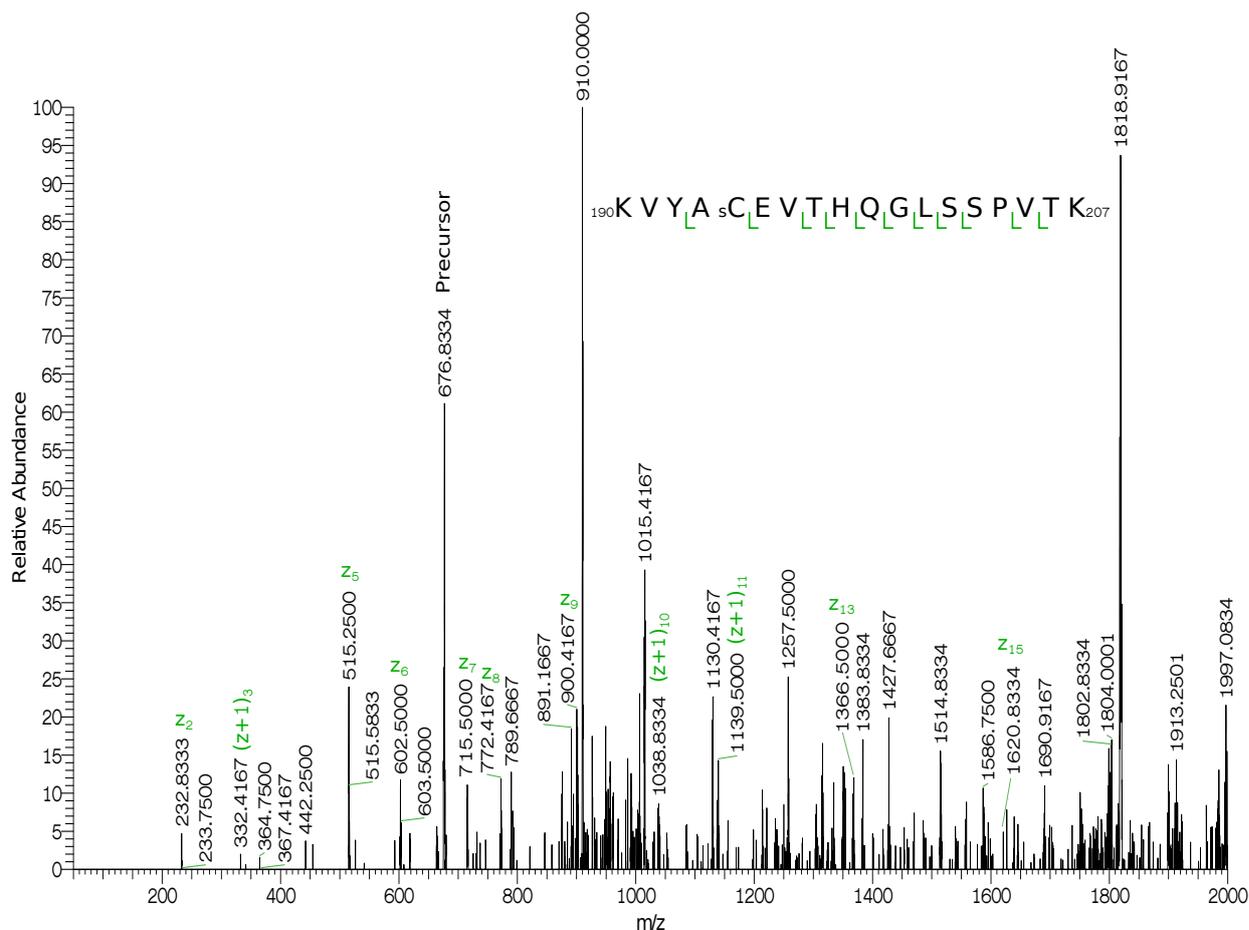
Für das Peptid <sub>189</sub>HKVYACEVTHQGLSSPVT<sub>207</sub> konnten bei allen sechs Patienten Spektren gefunden werden. Allerdings konnten nur bei den Patienten GI 1206, SC 1211 und SP 1070 Spektren identifiziert werden, die die Sulfonierung am Cystein C194 zeigen (siehe Abbildung 4.11 und im Anhang die Abbildungen A.17 und A.20). Bei diesen sind die unmodifizierten c-Ionen von c<sub>2</sub> bis c<sub>5</sub> und die sulfonierten c-Ionen ab c<sub>7</sub> vorhanden. Das c<sub>6</sub>-Ion konnte weder modifiziert noch unmodifiziert gefunden werden. Dennoch reicht das Auftreten des unmodifizierten c<sub>5</sub>-Ions für die Lokalisation der Sulfonierung am Cystein C194 aus, da bei einer Sulfonierung am Tyrosin Y192 das c<sub>5</sub>-Ion bereits die Modifikation tragen müsste. Das c<sub>6</sub>-Ion könnte die Zuverlässigkeit der Positionierung erhöhen, ist aber für die Lokalisation nicht notwendig. Die z/z+1-Ionen ohne PTM existieren bis z/z+1<sub>13</sub>, während die modifizierten Ionen ab z/z+1<sub>14</sub> vorhanden sind. Das modifizierte z/z+1<sub>14</sub>-Ion bestätigt die Position der PTM am Cystein C194, da dies das erste Ion mit dem Cystein C194 ist.

Bei den Patienten WS 1199, EW 1046 und KR 1159 konnten keine Spektren gefunden werden, die die Lokalisation am Cystein C194 beweisen. Deren <sub>189</sub>HKVYACEVTHQGLSSPVT<sub>207</sub>-Spektren weisen unmodifizierte z/z+1-Ionen bis zur Glutaminsäure E195 auf, während modifizierte z/z+1- bzw. c-Ionen vollständig fehlen bzw. nur lückenhaft vorhanden sind. Dadurch kann die Sulfonierung zwar auf das Cystein C194 und das Tyrosin Y192 eingegrenzt werden, die Unterscheidung zwischen den beiden Aminosäuren ist aber nicht möglich.



Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)
155.0927	1	H	19	-	-	235.0495	1	H	19	-	-
283.1877	2	K	18	1930.9817	1931.9895	363.1445	2	K	18	2010.9385	2011.9463
382.2561	3	V	17	1802.8867	1803.8945	462.2129	3	V	17	1882.8435	1883.8513
545.3194	4	Y	16	1703.8183	1704.8261	625.2762	4	Y	16	1783.7751	1784.7829
616.3566	5	A	15	1540.7550	1541.7628	696.3134	5	A	15	1620.7118	1621.7196
719.3657	6	C	14	1469.7179	1470.7257	799.3225	6	C	14	1549.6747	1550.6825
848.4083	7	E	13	1366.7087	1367.7165	928.3651	7	E	13	1446.6655	1447.6733
947.4767	8	V	12	1237.6661	1238.6739	1027.4335	8	V	12	1317.6229	1318.6307
1048.5244	9	T	11	1138.5977	1139.6055	1128.4812	9	T	11	1218.5545	1219.5623
1185.5833	10	H	10	1037.5500	1038.5578	1265.5401	10	H	10	1117.5068	1118.5146
1313.6419	11	Q	9	900.4911	901.4989	1393.5987	11	Q	9	980.4479	981.4557
1370.6634	12	G	8	772.4325	773.4403	1450.6202	12	G	8	852.3893	853.3971
1483.7474	13	L	7	715.4111	716.4189	1563.7042	13	L	7	795.3679	796.3757
1570.7795	14	S	6	602.3270	603.3348	1650.7363	14	S	6	682.2838	683.2916
1657.8115	15	S	5	515.2950	516.3028	1737.7683	15	S	5	595.2518	596.2596
1754.8643	16	P	4	428.2629	429.2707	1834.8211	16	P	4	508.2197	509.2275
1853.9327	17	V	3	331.2102	332.2180	1933.8895	17	V	3	411.1670	412.1748
1954.9804	18	T	2	232.1418	233.1496	2034.9372	18	T	2	312.0986	313.1064
-	19	K	1	131.0941	132.1019	-	19	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung 4.11:** ETD-MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $^{189}\text{HKVYA}_5\text{CEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten GI 1206. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 722.34 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2164.00 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.

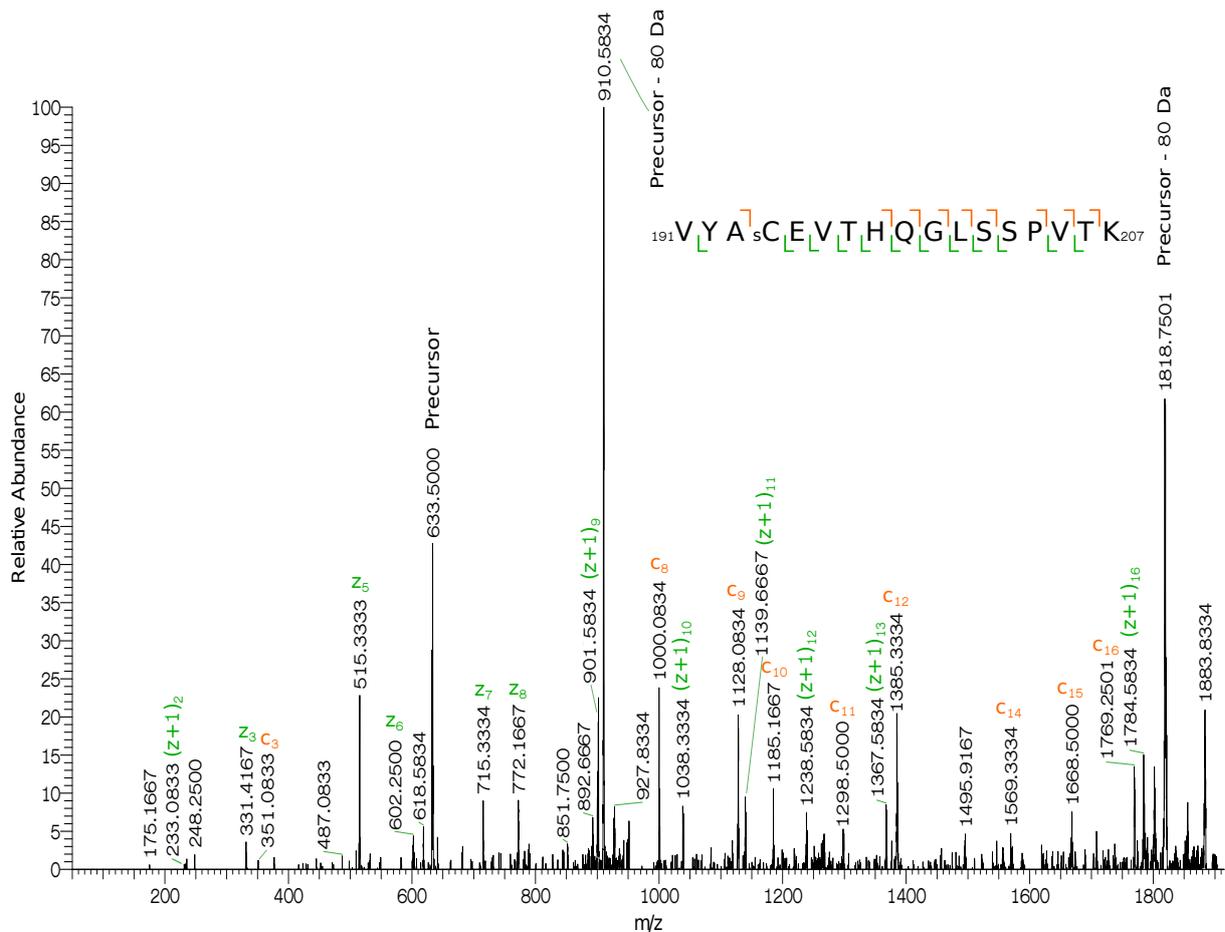


Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)
146.1288	1	K	18	-	-	226.0856	1	K	18	-	-
245.1972	2	V	17	1802.8867	1803.8945	325.1540	2	V	17	1882.8435	1883.8513
408.2605	3	Y	16	1703.8183	1704.8261	488.2173	3	Y	16	1783.7751	1784.7829
479.2976	4	A	15	1540.7550	1541.7628	559.2544	4	A	15	1620.7118	1621.7196
582.3068	5	C	14	1469.7179	1470.7257	662.2636	5	C	14	1549.6747	1550.6825
711.3494	6	E	13	1366.7087	1367.7165	791.3062	6	E	13	1446.6655	1447.6733
810.4178	7	V	12	1237.6661	1238.6739	890.3746	7	V	12	1317.6229	1318.6307
911.4655	8	T	11	1138.5977	1139.6055	991.4223	8	T	11	1218.5545	1219.5623
1048.5244	9	H	10	1037.5500	1038.5578	1128.4812	9	H	10	1117.5068	1118.5146
1176.583	10	Q	9	900.4911	901.4989	1256.5398	10	Q	9	980.4479	981.4557
1233.6045	11	G	8	772.4325	773.4403	1313.5613	11	G	8	852.3893	853.3971
1346.6885	12	L	7	715.4111	716.4189	1426.6453	12	L	7	795.3679	796.3757
1433.7206	13	S	6	602.3270	603.3348	1513.6774	13	S	6	682.2838	683.2916
1520.7526	14	S	5	515.2950	516.3028	1600.7094	14	S	5	595.2518	596.2596
1617.8054	15	P	4	428.2629	429.2707	1697.7622	15	P	4	508.2197	509.2275
1716.8738	16	V	3	331.2102	332.2180	1796.8306	16	V	3	411.1670	412.1748
1817.9214	17	T	2	232.1418	233.1496	1897.8782	17	T	2	312.0986	313.1064
-	18	K	1	131.0941	132.1019	-	18	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung 4.12:** ETD-MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $^{190}\text{KVVYAsCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten EW 1046. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 676.65 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2026.93 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.

Das  ${}_{190}\text{K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K}_{207}$ -Peptid konnte bei allen Patienten, außer bei dem Patienten KR 1159 identifiziert werden. Dessen Spektren zeichnen sich durch unmodifizierte  $z/z+1$ -Serien bis  $z/z+1_{13}$  aus, während  $c$ -Ionen und modifizierte  $z/z+1$ -Ionen meist vollständig fehlen bzw. nur vereinzelt auftauchen. Die vorhandenen  $z/z+1$ -Ionen treten meist lückenlos auf, sodass die Peptidsequenz und damit die Peptidentität durchaus verifiziert werden kann. Da die  $z/z+1$ -Serie jedoch vor dem Cystein C194 endet, ist eine Lokalisation der PTM anhand dieses Peptides nicht möglich. Darüber hinaus befanden sich in mehreren Spektren  $z/z+1_{16}$  und  $z/z+1_{17}$ -Ionen ohne PTM. Bei diesen sollte die PTM sowohl bei einer Sulfonierung des Cysteins C194 als auch des Tyrosins Y192 vorhanden sein, da bereits das  $z/z+1_{14}$ -Ion das Cystein und das  $z/z+1_{16}$ -Ion das Tyrosin trägt. Das vollkommene Fehlen der Sulfonierung an dieser Stelle im Peptid kann jedoch aufgrund der Masse des Vorläuferions ausgeschlossen werden, da dieses um 80 Da größer ist als das unmodifizierte Peptid, was genau der Masse einer Sulfonierung entspricht. Es wird jedoch vermutet, dass bei diesem Peptid die Modifikation während der Fragmentierung verloren gegangen ist oder dass die gefundenen Ionen andere Moleküle repräsentieren. Der Verlust der PTM kann bei einer ETD-MS-Messung stattfinden, auch wenn die ETD-Fragmentierung als sanfte Fragmentierungsmethode gilt, bei der labile PTM erhalten bleiben. Die Möglichkeit der PTM-Abspaltung wird aber vereinzelt auch in der Literatur beschrieben [81], wobei der Großteil anderer Arbeitsgruppen den Erhalt der Modifikation zeigen konnte.

Das Peptid  ${}_{191}\text{V Y A C E V T H Q G L S S P V T K}_{207}$  trat bei allen Patienten außer bei den Patienten EW 1046 und SC 1211 auf. Ähnlich zu dem  ${}_{190}\text{K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K}_{207}$ -Peptid konnten in diesen Spektren nur  $z/z+1$ -Ionen ohne PTM gefunden werden, während modifizierte  $z/z+1$ -Ionen vollkommen fehlten. Die vorhandenen  $z/z+1$ -Ionen endeten ebenso spätestens nach der Glutaminsäure E195, sodass auch bei diesem Peptid die Sulfonierung auf das Cystein bzw. Tyrosin eingegrenzt, nicht aber zwischen den Aminosäuren unterschieden werden konnte. Die  $c$ -Ionen tauchten mit einzelnen Ausnahmen nur mit 80 Da-Modifikation ab dem  $c_8$ -Ion auf, welches sich in deutlichem Abstand zum Cystein C194 und zum Tyrosin Y192 befindet, sodass auch die vorhandenen  $c$ -Ionen die Lokalisation der posttranslationalen Modifikation nicht zeigen können.



Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z			(z+1)		c	z			(z+1)	
117.1022	1	V	17	-	-	197.0590	1	V	17	-	-
280.1656	2	Y	16	1703.8183	1704.8261	360.1224	2	Y	16	1783.7751	1784.7829
351.2027	3	A	15	1540.7550	1541.7628	431.1595	3	A	15	1620.7118	1621.7196
454.2119	4	C	14	1469.7179	1470.7257	534.1687	4	C	14	1549.6747	1550.6825
583.2545	5	E	13	1366.7087	1367.7165	663.2113	5	E	13	1446.6655	1447.6733
682.3229	6	V	12	1237.6661	1238.6739	762.2797	6	V	12	1317.6229	1318.6307
783.3706	7	T	11	1138.5977	1139.6055	863.3274	7	T	11	1218.5545	1219.5623
920.4295	8	H	10	1037.5500	1038.5578	1000.3863	8	H	10	1117.5068	1118.5146
1048.4880	9	Q	9	900.4911	901.4989	1128.4448	9	Q	9	980.4479	981.4557
1105.5095	10	G	8	772.4325	773.4403	1185.4663	10	G	8	852.3893	853.3971
1218.5936	11	L	7	715.4111	716.4189	1298.5504	11	L	7	795.3679	796.3757
1305.6256	12	S	6	602.3270	603.3348	1385.5824	12	S	6	682.2838	683.2916
1392.6558	13	S	5	515.2950	516.3028	1472.6126	13	S	5	595.2518	596.2596
1489.7104	14	P	4	428.2630	429.2708	1569.6672	14	P	4	508.2198	509.2276
1588.7788	15	V	3	331.2102	332.2180	1668.7356	15	V	3	411.1670	412.1748
1689.8265	16	T	2	232.1418	233.1496	1769.7833	16	T	2	312.0986	313.1064
-	17	K	1	131.0941	132.1019	-	17	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung 4.13: ETD-MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $_{191}$ VYACEVTHQGLSSPVTK $_{207}$  mit einer wahrscheinlichen Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten WS 1199.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 633.63 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1897.87 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.

**Tabelle 4.2: Übersicht der sulfonierten Peptide im Bereich des Cysteins C194 aus der ETD-MS-Messung.** Aufgeführt sind für jeden Patienten die gefundenen Spektren. Für jedes Spektrum wurde die Qualität der c- und z/z+1-Serie bewertet: c:+++ := lückenhose c-Serie, die die Lokalisation der Sulfonierung erlaubt, c:(+++):= c-Serie hat zwar eine Lücke, die restlichen c-Ionen erlauben aber die Lokalisierung der Sulfonierung, c:++ := c-Serie deutet auf Lokalisation der PTM hin, beweist sie aber nicht, z.B. wenn Serie direkt vor PTM aufhört, c:(++) := c-Serie deutet auf Lokalisation der PTM hin und hat Lücken, c:+ := vereinzelte c-Ionen, die keinerlei Informationen über die Positionierung zulassen, c:- := kein c-Ion vorhanden. Analog zur c-Serie wurde die z- und die z+1-Serie bewertet. Da beide Serien den C-Tern beschreiben, wurden diese mit z zusammengefasst. Die Zahlen in der Tabelle verweisen auf die abgebildeten Spektren im Anhang.

Multiples Myelom		Multiples Myelom mit AL-Amyloidose	
GI 1206	SC 1211	WS 1199	EW 1046 SP 1070 KR 1159
Peptid <sub>189</sub> HKVYACEVTHQGLSSPVTK <sub>207</sub>			
c:(+++), z:(+++)	c:(+++), z:(+++)	c:(++), z:(++)	c:(++), z:(+++)
(Abb. 4.11)	(Abb. A.17)	(Abb. A.18)	(Abb. A.20) (Abb. A.21)
Peptid <sub>190</sub> KVYACEVTHQGLSSPVTK <sub>207</sub>			
c:-, z:+	c:-, z:(++)	c:-, z:(+++)	c:-, z:+
(Abb. A.22)	(Abb. A.23)	(Abb. A.24)	(Abb. A.25) -
Peptid <sub>191</sub> VYACEVTHQGLSSPVTK <sub>207</sub>			
-	-	c:++ , z:++	- c:++ , z:(++)
		(Abb. 4.13)	(Abb. A.26) (Abb. A.27)

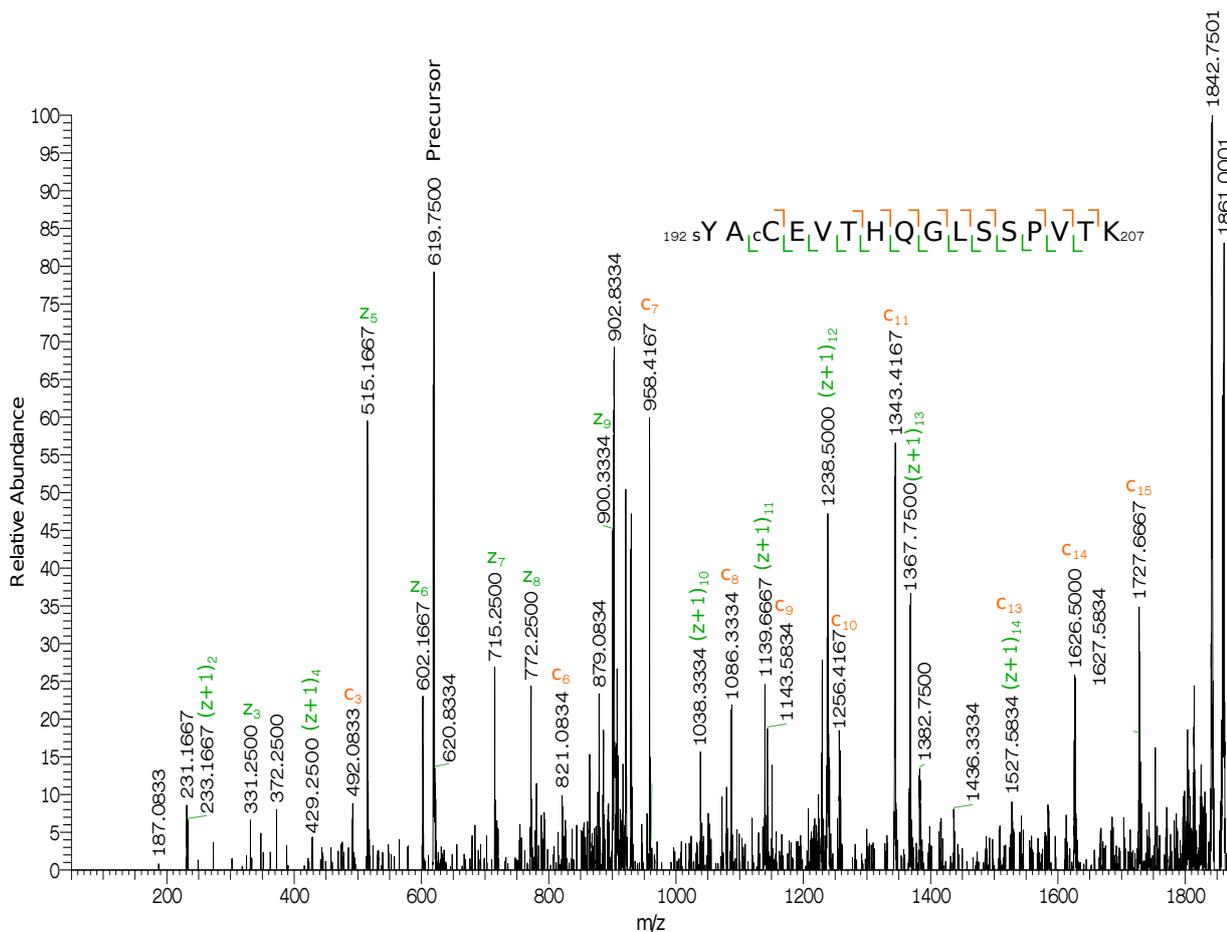
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Spektren der beiden Peptide  ${}_{190}\text{KVYACEVT-HQGLSSPVTK}_{207}$  und  ${}_{191}\text{VYACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  die Sulfonierung nicht eindeutig lokalisieren konnten. Mit Hilfe der  ${}_{189}\text{HKVYACEVTHQGLSSPVTK}_{214}$ -Spektren konnte aber zumindest für die Patienten GI 1206, SC 1211 und SP 1070 die Positionierung der PTM am Cystein C194 zuverlässig erfolgen. Dabei entstammen die Patienten GI 1206 und SC 1211 der Multiplen-Myelom-Gruppe während der Patient SP 1070 zusätzlich an der AL-Amyloidose litt, sodass keine krankheitsspezifische Lokalisation der Sulfonierung gefunden werden konnte.

Eine Sulfonierung an einem Cystein bei AL-Amyloidose-Patienten wurde auch von Connors *et al.* [10] gefunden. Allerdings lokalisierte diese Gruppe die Sulfongruppe am Cystein C214, während eine Sulfonierung am Cystein C194 bis jetzt noch nicht beschrieben wurde.

#### 4.4.1.2 Mögliche weitere Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194

**ETD-MS-Messung** Bei der Suche nach ETD-MS-Spektren mit einer Sulfonierung im Bereich des Cysteins C194 tauchte bei allen sechs Patientenproben das Peptid  ${}_{192}\text{YAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  mit einer 80 Da-PTM auf, welches im Gegensatz zu den im vorigen Absatz beschriebenen Peptiden eine Carbamidomethylierung am Cystein C194 aufwies. Das Fehlen der Carbamidomethylierung am Cystein C194 wurde im vorhergehenden Absatz als Hinweis für die Lokalisation der Sulfonierung an diesem Cystein gewertet. Deshalb deutet das Vorhandensein der Carbamidomethylierung an dieser Stelle auf eine abweichende Position der 80 Da-PTM hin.

Ein Beispielspektrum für das vermutlich sulfonierte Peptid  ${}_{192}\text{YAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  mit einer Carbamidomethylierung ist in der Abbildung 4.14 dargestellt. Dieses ETD-MS-Spektrum des Peptids  ${}_{192}\text{YAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  zeichnet sich durch lückenlose  $z/z+1$  Serien ohne PTM von  $z/z+1_2$  bis  $z/z+1_{14}$  sowie nahezu lückenloser  $c$ -Serie mit 80 Da-PTM von  $c_3$  bis  $c_{15}$  aus, während keine modifizierten  $z/z+1$ - oder unmodifizierte  $c$ -Ionen gefunden werden können. Die unmodifizierte  $z/z+1$ -Serie umfasst das  $z/z+1_{14}$ -Ion, welches das carbamidomethylierte Cystein beinhaltet. Da kein modifiziertes  $z/z+1_{14}$ -Ion identifiziert werden konnte, kann die 80 Da-Modifikation nur vor dem Cystein C194 am Tyrosin Y192



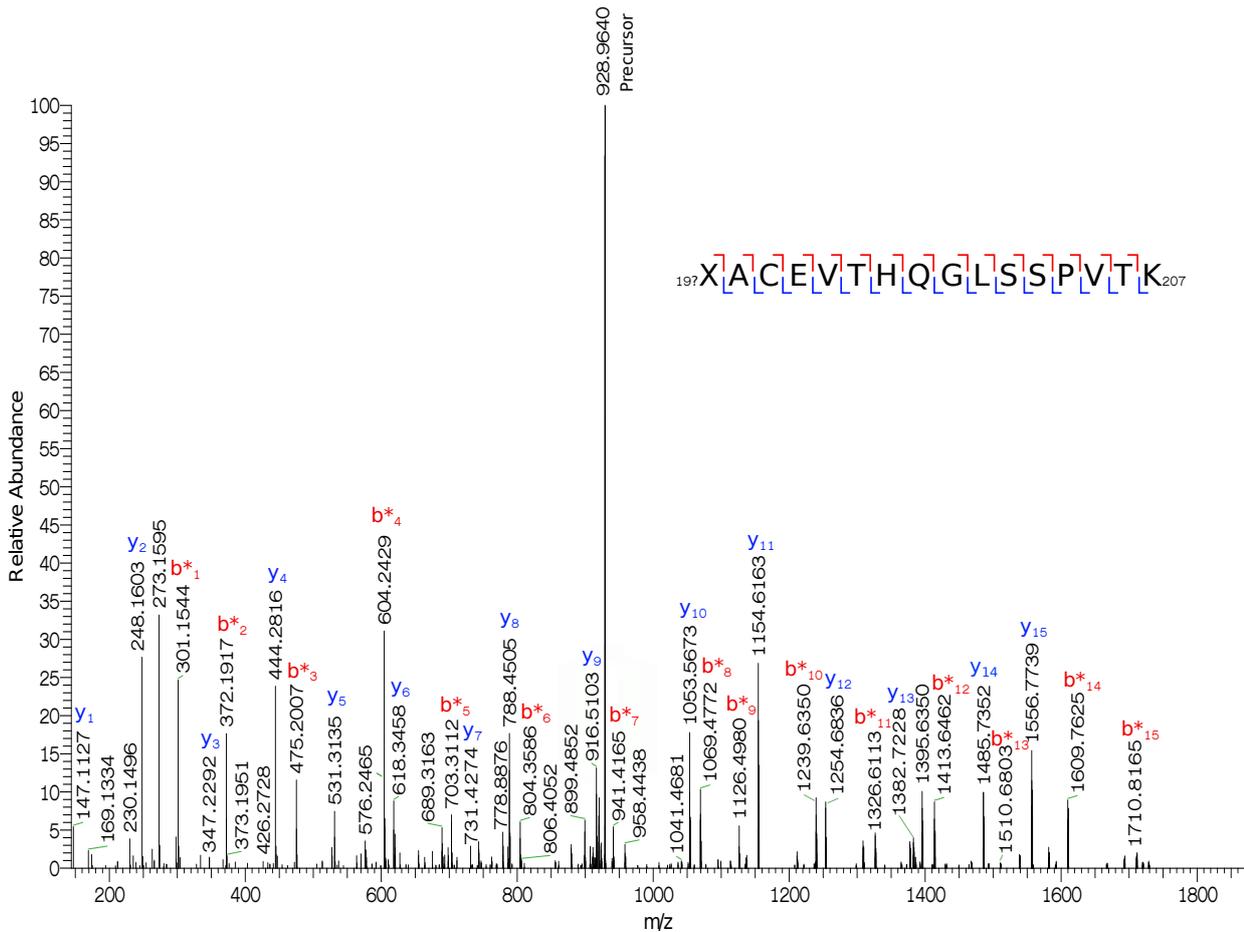
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z		(z+1)	c	(z+1)	c	z		(z+1)	c	(z+1)
181.0972	1	Y	16	-	-	261.0540	1	Y	16	-	-
252.1343	2	A	15	1597.7765	1598.7843	332.0911	2	A	15	1677.7333	1678.7411
412.1649	3	cC	14	1526.7393	1527.7471	492.1217	3	cC	14	1606.6961	1607.7039
541.2075	4	E	13	1366.7087	1367.7165	621.1643	4	E	13	1446.6655	1447.6733
640.2759	5	V	12	1237.6661	1238.6739	720.2327	5	V	12	1317.6229	1318.6307
741.3236	6	T	11	1138.5977	1139.6055	821.2804	6	T	11	1218.5545	1219.5623
878.3825	7	H	10	1037.5500	1038.5578	958.3393	7	H	10	1117.5068	1118.5146
1006.4411	8	Q	9	900.4911	901.4989	1086.3979	8	Q	9	980.4479	981.4557
1063.4626	9	G	8	772.4325	773.4403	1143.4194	9	G	8	852.3893	853.3971
1176.5466	10	L	7	715.4111	716.4189	1256.5034	10	L	7	795.3679	796.3757
1263.5786	11	S	6	602.3270	603.3348	1343.5354	11	S	6	682.2838	683.2916
1350.6106	12	S	5	515.2950	516.3028	1430.5674	12	S	5	595.2518	596.2596
1447.6634	13	P	4	428.2629	429.2707	1527.6202	13	P	4	508.2197	509.2275
1546.7319	14	V	3	331.2102	332.2180	1626.6887	14	V	3	411.1670	412.1748
1647.7795	15	T	2	232.1418	233.1496	1727.7363	15	T	2	312.0986	313.1064
-	16	K	1	131.0941	132.1019	-	16	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung 4.14: ETD-MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $_{192}$ YAcCEVTHQGLSSPVTK $_{207}$  mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 und wahrscheinlich einer Sulfonierung am Tyrosin Y192 am Beispiel des Patienten GI 1206.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 619.98 und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1856.92 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.

lokalisiert sein. Das unmodifizierte  $z/z+1_{15}$ -Ion, welches die Sulfonierung am Tyrosin direkt beweisen würde, konnte allerdings nicht gefunden werden. Darüber hinaus fehlen sowohl die modifizierten als auch unmodifizierten c-Ionen  $c_1$  und  $c_2$ , sodass mit Hilfe der c-Serie die 80 Da-PTM nur auf die Stellen Cystein C194 und Tyrosin Y192 eingegrenzt werden kann. Ein direkter Beweis der Modifikation fehlt in diesem Spektrum.

Eine Unterscheidung zwischen der 80 Da-schweren Sulfonierung und der fast gleich schweren Phosphorylierung könnte mit Hilfe der HCD-MS-Spektren erfolgen. Allerdings konnte kein entsprechendes Spektrum mittels Mascot-Algorithmus identifiziert werden. Auch konnten keine anderen sulfonierten Peptide aus dem Bereich des Cysteins C194 gefunden werden, die am Cystein C194 eine Carbamidomethylierung tragen. Um das Übersehen von passenden Spektren zu vermeiden, wurde manuell nach den entsprechenden Vorläuferionen und MS/MS-Spektren gesucht.

**HCD-MS-Messung** Die manuelle Suche in den HCD-MS-Messungen nach einem Spektrum, welches das Peptid  $_{192}\text{YAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  repräsentiert, lieferte für alle Patienten außer für die Patienten WS 1199 und KR 1159 Spektren, die ein ähnliches Peptid mit dem gleichen Molekulargewicht von 1857 Da zeigen. Für den Patienten SP 1070 ist in der Abbildung 4.15 das entsprechende Spektrum dargestellt. Dieses Spektrum zeichnet sich durch eine lückenlose y-Serie ohne 80 Da-PTM von  $y_1$  bis  $y_{13}$  aus, wodurch eine analoge Aminosäuresequenz zum Peptid  $_{192}\text{YACEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  ab der Glutaminsäure E195 verifiziert wird. Zusätzlich befinden sich in dem Spektrum zwei Ionen mit einem  $m/z$  von 1485.7352 und 1556.7739. Diese beiden Signale entsprechen dem  $y_{14}$ - und  $y_{15}$ -Ion ohne Carbamidomethylierung, wodurch zusätzlich die Aminosäuren Alanin und Cystein in diesem Peptid verifiziert werden können. Da in diesen Spektren kein y-Ion mit Carbamidomethylierung gefunden werden konnte, muss das Spektrum ein Peptid ohne die Carbamidomethylierung am Cystein zeigen. Das Fehlen der Carbamidomethylierung an dieser Stelle wird auch von der b-Serie bestätigt, welche lückenlos von  $b_4^*$  bis  $b_{15}^*$  ist. Zusätzlich existieren die Signale 301.1544, 372.1917 und 475.2007, welche dem  $b_1^*$ -,  $b_2^*$ - und  $b_3^*$ -Ion ohne Carbamidomethylierung entsprechen, sodass am Cystein keine Carbamidomethylierung vorhanden sein kann. Die b-Ionen wurden bei diesem Peptid als  $b^*$ -Ionen gekennzeichnet, da aus dem Spektrum



**Abbildung 4.15: HCD-MS-Spektrum des Peptids  $_{19?}XACEVTHQGLSSPVTK_{207}$  des Patienten SP 1070 nach dem Trypsinverdau.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 928.97 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1856.93 Da. Entgegen der Erwartungen trägt dieses Peptid keine Carbamidomethylierung am Cystein C194, dafür aber einen nicht anhand des Spektrums zu identifizierenden Rest am Alanin der neben Aminosäuren auch eine PTM enthalten könnte und hier als X dargestellt ist. Da nicht bekannt ist wie viele Aminosäuren sich hinter dem X verbergen, werden die b-Ionen dieses Peptides als  $b^*$  gekennzeichnet und X als eine modifizierte Aminosäure betrachtet.

nicht die genaue Anzahl der Aminosäuren ermittelt werden konnte und dadurch die Indizes der b-Ionen nicht eindeutig zugeordnet werden können.

Durch das Fehlen der 57 Da-großen Carbamidomethylierung am Cystein muss am Tyrosin eine andere Modifikation existieren, die ein Molekulargewicht von 137 Da aufweist, was der Summe aus einer Sulfonierung und einer Carbamidomethylierung entspricht. Nach der *Uni-mod*-Datenbank für PTMs ist eine solche PTM jedoch nicht bekannt. Darüber hinaus ist es möglich, dass vor dem Alanin mehrere Modifikationen oder andere Aminosäuren vorhanden

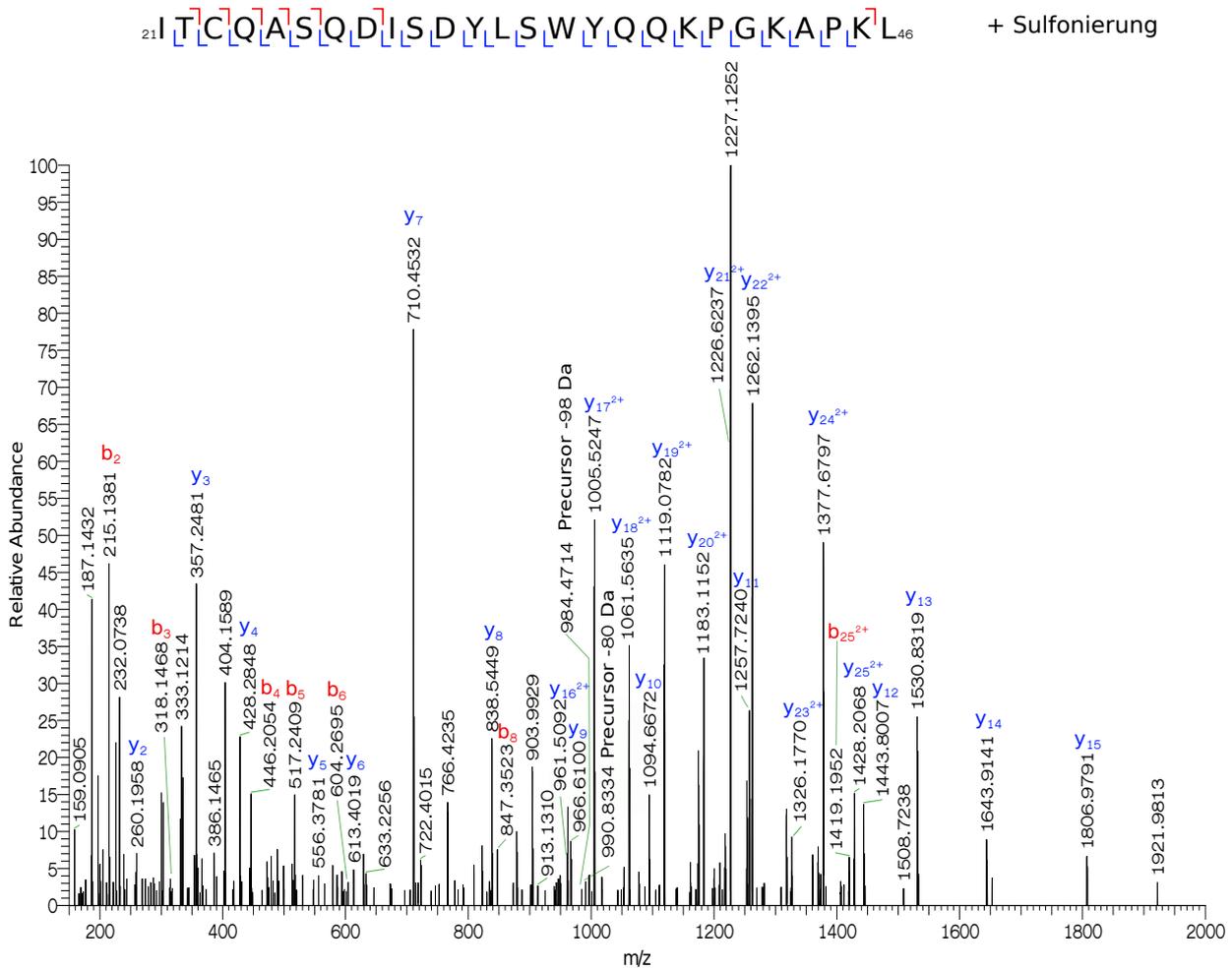
sind, die zusammen der fehlenden Masse entsprechen. Dies sind jedoch nur Spekulationen, da keine passenden Signale im Spektrum gefunden wurden, die einen Hinweis geben könnten.

Alle gefundenen HCD-MS-Spektren mit dem Molekulargewicht von 1857 Da wiesen die typischen  $y$ - und  $b$ -Ionen auf, die die Carbamidomethylierung am Cystein widerlegen. Es konnte somit kein Spektrum identifiziert werden, das das  ${}_{192}\text{YAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ -Peptid mit einer 80 Da-Modifikation repräsentiert, welches in der ETD-MS-Messung gefunden werden konnte. Aufgrund des  $z/z+14$ -Ions kann aber von einem carbamidomethylierten Cystein bei dem Peptid der ETD-MS-Messung ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für das in der ETD-MS-Messung gefundene  ${}_{192}\text{YAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ -Peptid kein Äquivalent in der HCD-MS-Messung identifiziert werden konnte, mit dessen Hilfe die PTM als Sulfonierung oder Phosphorylierung charakterisiert werden konnte. Darüber hinaus konnte in der ETD-MS-Messung kein Ion gefunden werden, welches die PTM direkt zeigen würde und somit lokalisieren könnte. Aufgrund der fehlenden HCD-MS-Spektren für dieses Peptid und nur dem indirekten Nachweis der PTM am Tyrosin Y192 wird das Vorhandensein einer Sulfonierung an dieser Stelle als zweifelhaft angesehen.

#### 4.4.1.3 Mögliche Sulfonierung im Bereich des Cysteins C23

**Vorversuche** In Vorversuchen konnte bei der Probe SP 1070 im Thermolysinverdau das Peptid  ${}_{23}\text{ITCQASQDISDYLSWYQQKPGKAPKL}_{46}$  mit einer 80 Da-Modifikation identifiziert werden, die wahrscheinlich einer Sulfonierung entspricht. In der Abbildung 4.16 ist dieses Spektrum dargestellt. Dabei handelt es sich um ein sehr gutes Spektrum, bei dem alle großen Signale erklärt werden können, wodurch von einer zuverlässigen Peptididentifizierung ausgegangen werden kann. Dieses Spektrum zeichnet sich durch eine vollständige  $y_2$ - bis  $y_{25}$ -Serie ohne die 80 Da-PTM aus, durch die die Aminosäuresequenz gesichert verifiziert werden kann. Die  $b$ -Serie ist vom  $b_2$ - bis  $b_8$ -Ion, ohne das  $b_7$ -Ion, jeweils ohne 80 Da-PTM vorhanden. Die  $y$ - und  $b$ -Ionen mit der 80 PTM oder mit einem Neutralverlust von 98 Da konnten nicht gefunden werden. Das Auftreten von  $y$ - und  $b$ -Ionen mit einem Neutralverlust von 80 Da und das Fehlen von  $y$ - und  $b$ -Ionen mit der PTM oder mit einem Neutralverlust



**Abbildung 4.16: HCD-MS-Spektrum des Thermolysin-verdauten Peptids <sup>23</sup>ITCQASQDISDYL SWYQQ-KPGKAPKL<sub>46</sub> mit einer Sulfonierung.** Das Peptid entstammt der Probe des Patienten SP 1070 und basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 1017.16 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 4064.61 Da.

von 98 Da wird auch bei diesem Peptid als Widerlegung einer Phosphorylierung und Bestätigung einer Sulfonierung an dieser Stelle betrachtet.

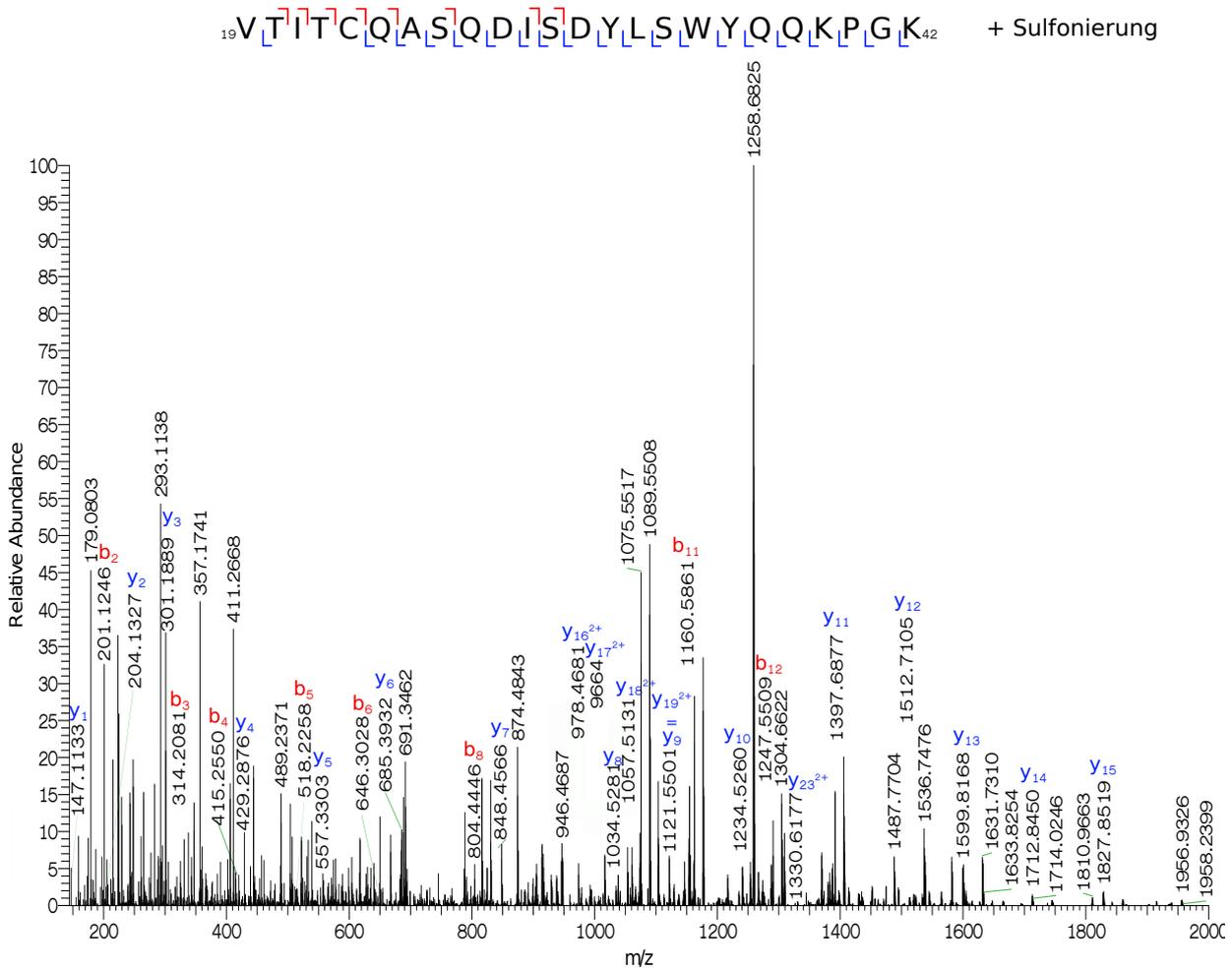
Zusätzlich befinden sich in dem Spektrum die zwei sehr kleinen Signale 990.8334 und 984.4714, die das Vorläuferion mit einem Neutralverlust von 80 Da bzw. 98 Da abbilden könnten, ein entsprechendes Signal ohne Neutralverlust fehlt jedoch. Da dies einem typischen Neutralverlust sowohl von einer Sulfonierung als auch Phosphorylierung entspricht, kann anhand der Vorläuferionen keine Aussage über die Identität der posttranslationalen Modifikation getroffen werden. Außerdem handelt es sich bei diesen beiden Signalen um

sehr kleine Peaks, die wahrscheinlich falsch-positiv identifiziert wurden. In den zuvor gezeigten Spektren trat das Vorläuferion mit dem typischen Neutralverlust meist als Hauptpeak auf.

Die exakte Lokalisation der Sulfonierung ist aufgrund nicht vorhandener Ionen mit der PTM in diesem Spektrum nicht möglich. Das Fehlen der Carbamidomethylierung am Cystein C23 könnte aber ein Hinweis auf die Lokalisation der Sulfonierung an dieser Aminosäure sein, da eine Sulfonierung an dieser Stelle eine Carbamidomethylierung während der Probenvorbereitung sterisch gehindert haben könnte. Für eine zuverlässige Lokalisation müsste auf ETD-MS-Spektren zurückgegriffen werden.

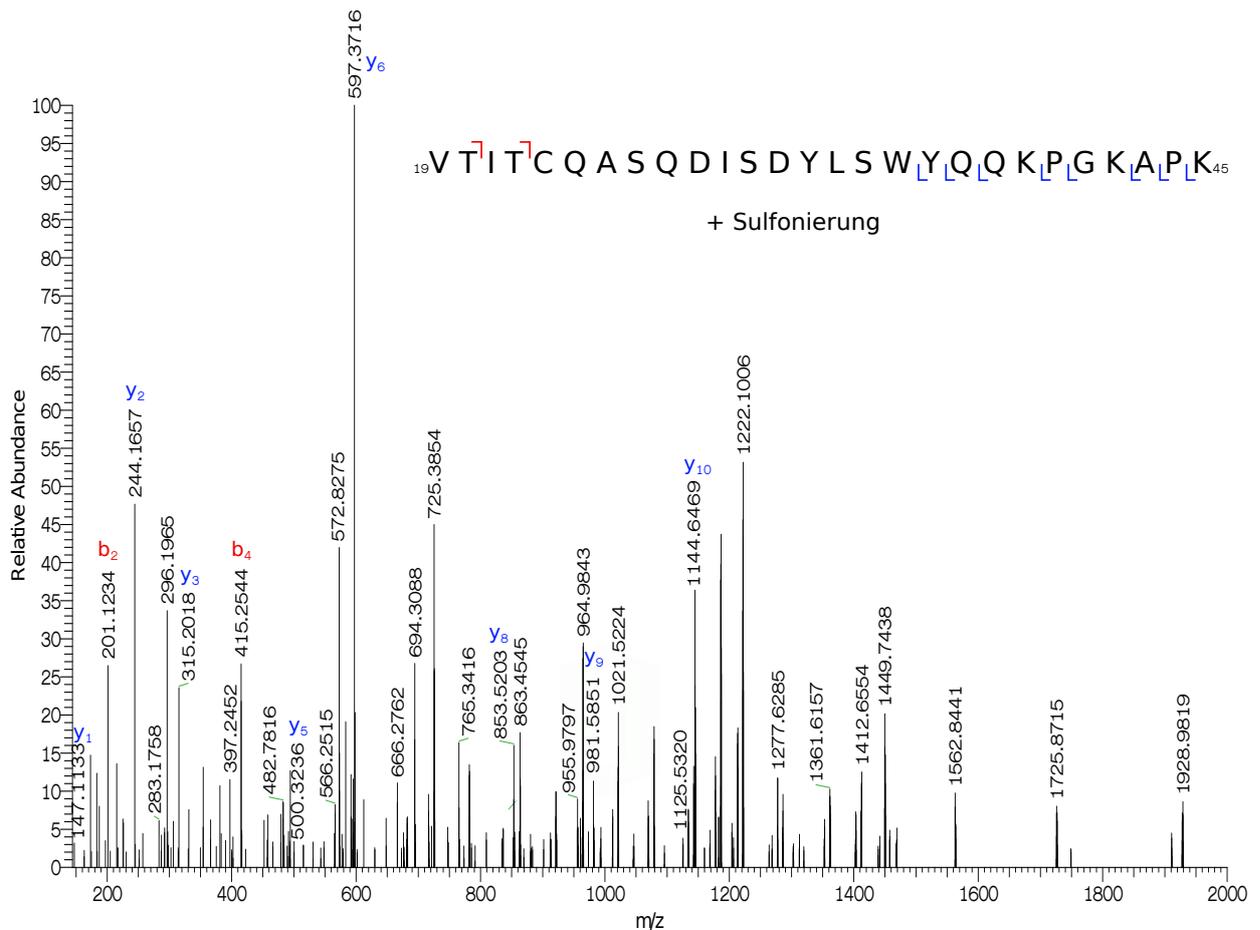
Neben dem sulfonierten Peptid  ${}_{23}\text{ITCQASQDISDYLSWYQQKPGKAPKL}_{46}$  trat das vermutlich ebenfalls sulfonierte Peptid  ${}_{23}\text{ITCQASQDISDY}_{32}$  auf, dessen Spektrum im Anhang in der Abbildung A.28 dargestellt ist. Dieses zeichnet sich zwar durch lückenhafte y- und b-Serien mit einem Neutralverlust von 80 Da aus, allerdings zeigt es ebenfalls eine Sulfonierung im Bereich des Cysteins C23, sodass dessen Identifizierung als zuverlässig angesehen werden kann.

**Hauptversuche Mascot-Analyse** Die Ergebnisse der Thermolysin-Vorversuche konnten in der HCD-Hauptmessung nicht bestätigt werden. Mit Hilfe der Mascot-Analyse konnte kein Spektrum identifiziert werden, welches ein Peptid aus einem Trypsin- oder Chymotrypsinverdau mit einer Sulfonierung im Bereich des Cysteins C23 zeigt. Eine zuverlässige PTM-Identifizierung sollte jedoch anhand von Trypsin- oder Chymotrypsin-Spektren erfolgen. Trypsin und Chymotrypsin schneiden im Vergleich zu Thermolysin die Peptide an weniger Aminosäuren, sodass bei diesen längere Peptide entstehen als beim Thermolysinverdau. Die kürzeren Peptide können allerdings weniger spezifisch den jeweiligen Proteinen zugeordnet werden, weshalb eine Sequenzverifizierung mittels Thermolysin als weniger zuverlässig betrachtet wird. Zur zuverlässigeren Identifizierung der Sulfonierung im Bereich des Cysteins C23 wurden die Chromatogramme daher zusätzlich manuell auf passende Spektren untersucht.



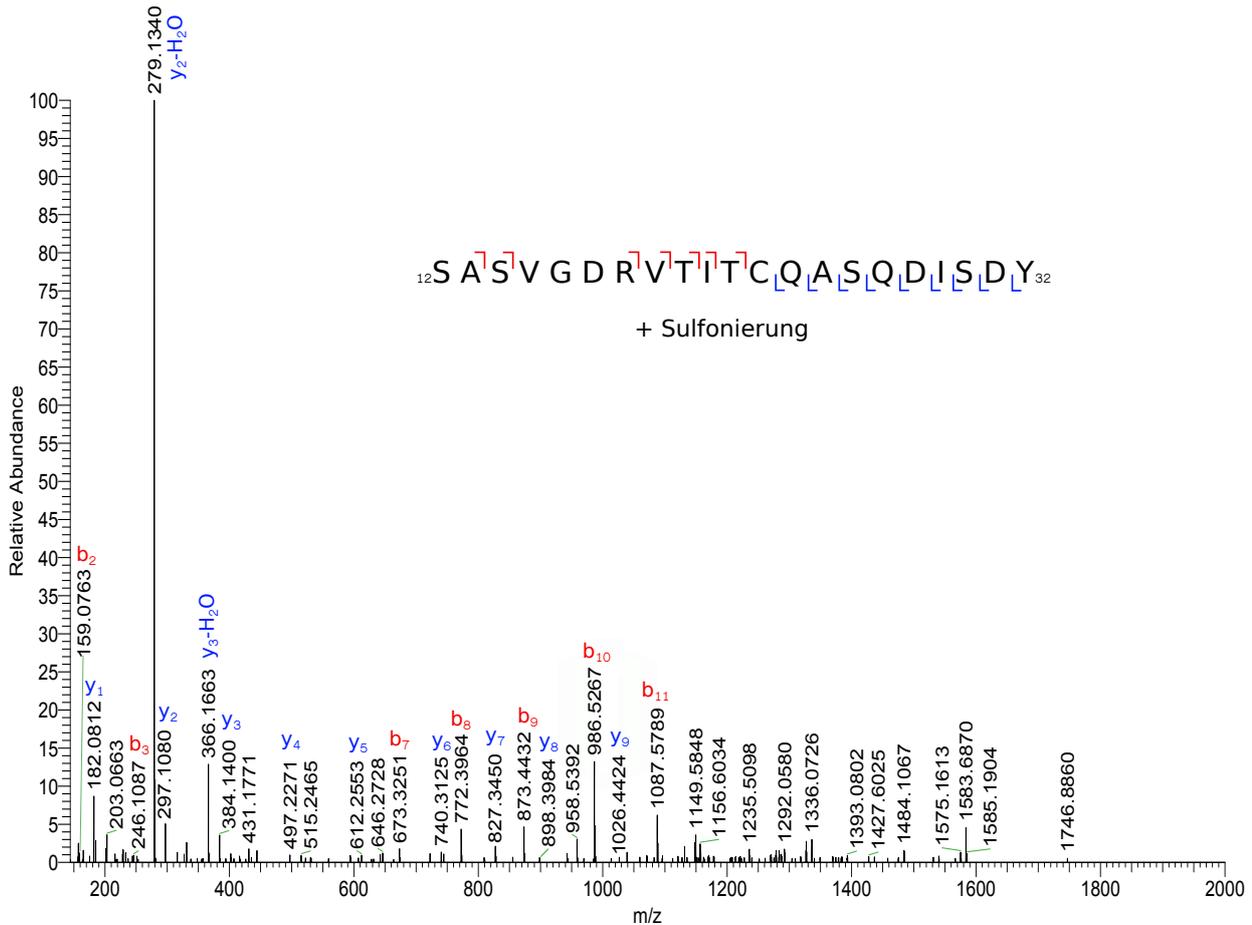
**Abbildung 4.17: HCD-MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $^{19}\text{VTITCQASQDISDYLSWYQQKPGK}_{42}$  mit einer Sulfonierung bei dem Patienten SP 1070.** Das MS/MS-Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 947.94 Da und einer Ladung von 2<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1893.87 Da. Anhand der kalkulierten monoisotopischen Masse [M] des Peptids von 2838.28 wurde für dieses m/z des Vorläuferions allerdings eine Ladung von 3<sup>+</sup> erwartet.

**Hauptversuche manuelle Suche** Die manuelle Überprüfung der HCD-MS-Spektren konnte anhand der Masse des Vorläuferions die drei Peptide  $^{19}\text{VTITCQASQDISDYLSWYQQKPGK}_{42}$ ,  $^{19}\text{VTITCQASQDISDYLSWYQQKPGKAPK}_{45}$  sowie  $^{12}\text{SASVGDRVTITCQASQDISDY}_{32}$  identifizieren, die eine Sulfonierung im Bereich des Cysteins C23 zeigen könnten. Die ersten beiden Peptide entstammen dabei den trypsinverdauten Proben, während das letzte Peptid im Chymotrypsinverdau gefunden werden konnte. Die Spektren der Peptide sind in den Abbildungen 4.17, 4.18 und 4.19 dargestellt.



**Abbildung 4.18: HCD-MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  ${}_{19}\text{VTITCQASQDISDYLSWYQQKPGKAPK}_{45}$  mit einer Sulfonierung.** Das Spektrum basiert auf einem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 1046.17 Da und einer Ladung von  $3^+$  und entstammt der Probe SP 1070. Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 3135.49 Da.

Bei dem Peptid  ${}_{19}\text{VTITCQASQDISDYLSWYQQKPGK}_{42}$  in der Abbildung 4.17 existieren unvollständige y- und b-Serien ohne PTM, die zusammen die gesamte Peptidsequenz abdecken würden. Allerdings werden diese Ionen nur durch sehr kleine Signale repräsentiert, während die großen Hauptpeaks keinen Ionen zugeordnet werden können. Außerdem zeigen die berechneten und die gemessenen Werte für die y- und b-Ionen oft eine Differenz von bis zu 0.05 Da, während bei den vorhergehenden Spektren zur Identifizierung der Sulfonierung am Cystein C194 maximal ein Fehler von 0.03 Da auftrat. Ein ähnliches Problem zeigte sich bei dem Peptid  ${}_{12}\text{SASVGDRVTITCQASQDISDY}_{32}$  in der Abbildung 4.19, bei dem unvollständige y- und b-Serien fast die gesamte Peptidsequenz abdecken könnten. Dabei werden die y- und b-Ionen teilweise durch ebenfalls relativ kleine Signale repräsentiert. Aber bis ca.



**Abbildung 4.19: HCD-MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids  $^{12}\text{SASVGDRVTITCQASQDISDY}_{32}$  mit einer Sulfonierung.** Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 1149.17 Da und einer Ladung von  $3^+$  und entstammt der Probe SP 1070. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 3444.19 Da. Anhand der kalkulierten monoisotopischen Masse [M] des Peptids von 2294.96 Da wurde allerdings eine Ladung von  $2^+$  erwartet.

1100 m/z können die Hauptpeaks Ionen zugeordnet werden, während ab dem m/z-Bereich von 1100 keine weiteren Signale identifiziert werden können. Es wird daher vermutet, dass das in diesem Spektrum abgebildete Peptid eine abweichende Aminosäuresequenz aufweisen könnte und eine sichere Peptididentifizierung nicht gewährleistet ist.

Darüber hinaus ergab sich bei diesen beiden Spektren ein Problem bei der Ladung der Peptide. Das Spektrum in der Abbildung 4.17 basiert auf einem Vorläuferion mit einem m/z von 947.94 und einer Ladung von  $z=2^+$ . Das sulfonierte  $^{19}\text{VTITCQASQDISDYLSWYQQKPGK}_{42}$ -Peptid mit diesem m/z-Verhältnis entspricht aber einer Ladung von  $z=3^+$ . Ähnliches gilt für das  $^{12}\text{SASVGDRVTITCQASQDISDY}_{32}$ -Peptid: Das Spektrum zeigt ein Vor-

läuferion mit einem  $m/z$  von 1149.17 und einer Ladung von  $z=3^+$ , während das Peptid mit diesem  $m/z$  eine Ladung von  $z=2^+$  aufweisen müsste. Das heißt, die  $y$ - und  $b$ -Serien könnten die Peptidsequenz nahezu vollständig bestätigen, die Ladung der Vorläuferionen widerlegt aber die Identität der vermuteten Peptide.

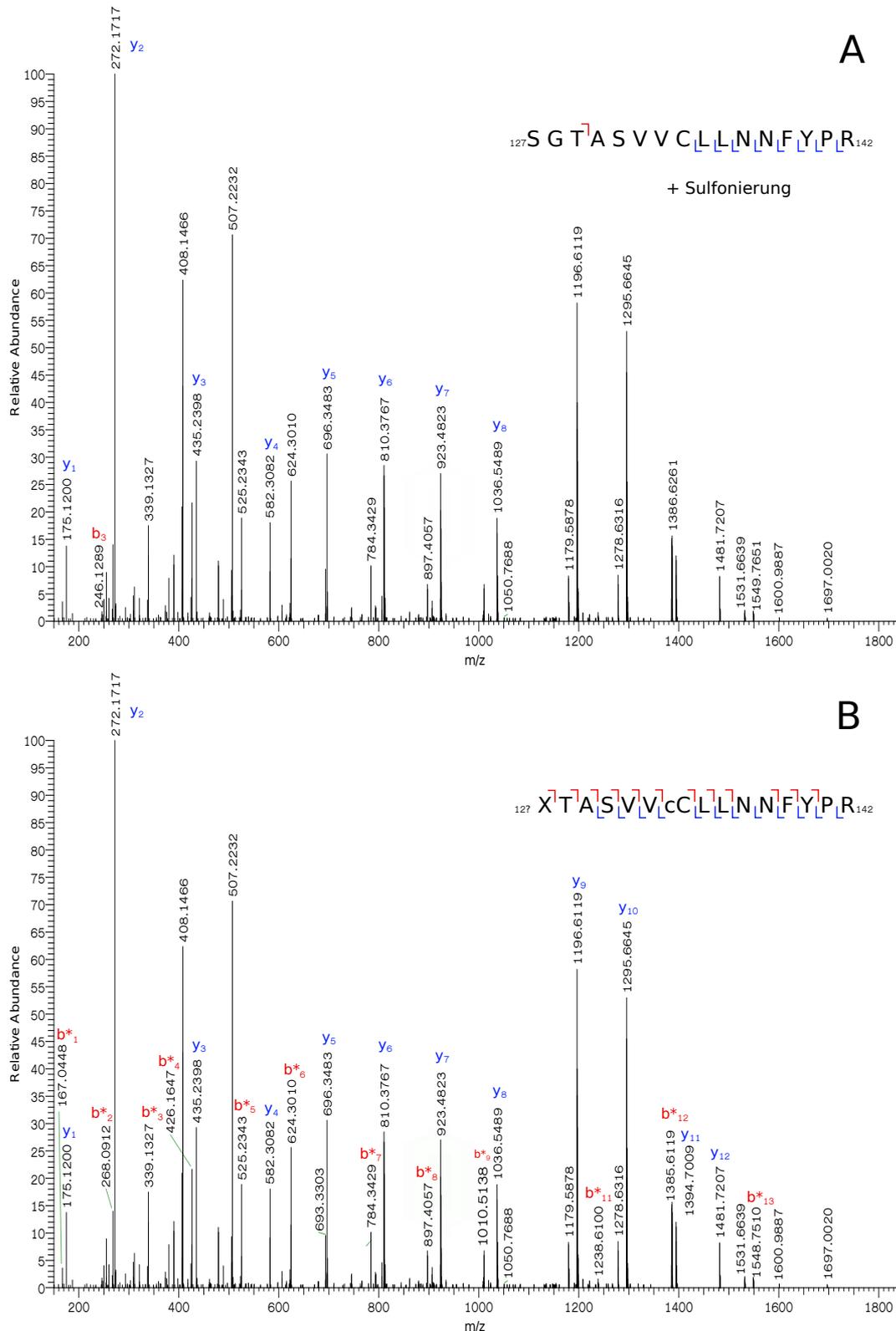
Das in der Abbildung 4.18 dargestellte Spektrum für das Peptid  ${}_{19}\text{VTITCQASQDISDYLSWYQQKPGKAPK}_{45}$  zeigt eine Übereinstimmung der gemessenen und der berechneten Werte für die Ladung. Allerdings können anhand des Spektrums nur wenige  $y$ - und  $b$ -Ionen identifiziert werden, sodass nur ein kleiner Teil der Peptidsequenz durch diese abgedeckt wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den Vorversuchen im Thermolysinverdau eine Sulfonierung gefunden werden konnte. Allerdings reichen die in den HCD-Hauptmessungen gewonnenen Spektren nicht aus, um diese posttranslationale Modifikation zuverlässig zu bestätigen. Dies wird als Hinweis für eine Sulfonierung im Bereich des Cysteins C23 gewertet, die letztenendlich nicht bewiesen werden kann.

#### 4.4.1.4 Mögliche Sulfonierung im Bereich des Cysteins C134

Bei den trypsinverdauten Proben GI 1206, SC 1211, WS 1199 und EW 1046 konnte jeweils ein Spektrum identifiziert werden, das nach der Mascot-Analyse das sulfonierte Peptid  ${}_{127}\text{SGTASVVCLNNFYPR}_{142}$  zeigt. Ein Beispielspektrum für dieses Peptid ist in der Abbildung 4.20 A dargestellt, wobei die nachfolgend beschriebenen Sachverhalte bei allen vier Spektren gefunden werden konnten.

Für dieses Peptid können die Ionen der lückenlosen  $y$ -Serie von  $y_1$  bis  $y_8$  einzelnen großen Signalen zugeordnet werden, während von der  $b$ -Serie nur das  $b_3$ -Ion als sehr kleines Signal auftaucht. Das  $y_8$ -Ion endet dabei vor dem Cystein C134, an dem möglicherweise die Sulfonierung sitzen könnte. Andere Ionen ohne Neutralverlust oder mit einem 80 Da- bzw. 98 Da-Neutralverlust konnten nicht identifiziert werden. Allerdings existieren die vier Signale 1196.6119, 1295.6645, 1394.7009 und 1481.7207, welche den  $y_9$ - bis  $y_{12}$ -Ionen ohne 80 Da-PTM aber mit Carbamidomethylierung am Cystein C134 entsprechen würden. Die Masse des Vorläuferions entspricht aber dem sulfonierten Peptid  ${}_{127}\text{SGTASVVCLNNFYPR}_{142}$  oh-



**Abbildung 4.20: HCD-MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $_{127}XTASVVcLNNFYPR_{142}$  am Beispiel des Patienten GI 1206.** Das Spektrum basiert auf einem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 910.94 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1819.87 Da. In der Abbildung A ist das von Mascot postulierte sulfonierte Peptid SGTASVVCLNFFYPR dargestellt. In der Abbildung B ist das korrigierte Peptid XTASVVcLNNFYPR zu erkennen, das anhand der vorhandenen  $y$ - und  $b$ -Ionen als wahrscheinlicher erscheint. Die Identifizierung des  $N$ -Terminus des Peptides ist anhand des Spektrums nicht möglich, weshalb dieses als X und die entsprechenden  $b$ -Ionen als  $b^*$  dargestellt sind.

ne Carbamidomethylierung. Da aber vier Signale die Carbamidomethylierung an dieser Stelle postulieren, wird das Auftreten der vier Signale als starker Hinweis gewertet, dass dieses Spektrum nicht das sulfonierte Peptid  $_{127}\text{SGTASVVCLNNFYPR}_{142}$  repräsentiert.

Darüber hinaus ist bei diesem Spektrum auffällig, dass zwar ein Großteil der  $y$ -Ionen gefunden werden konnten, aber keine zuverlässigen  $b$ -Ionen auftauchen. Die Bestimmung der Differenzen zwischen den Signalen kann allerdings elf Peaks identifizieren, deren Abstände zueinander einen Großteil der Peptidsequenz als  $b^*$ -Ionen abdecken würden (Siehe 4.20 B). Da anhand des Spektrums der  $N$ -Terminus des Peptides nicht bestimmt werden kann, werden die  $b$ -Ionen als  $b^*$ -Ionen gekennzeichnet. Besonders die beiden Signale 624.3010 und 784.3429 stechen dabei hervor, da deren Differenz der Masse eines carbamidomethylierten Cysteins entspricht, welche zusätzlich zur  $y$ -Serie eine Carbamidomethylierung am Cystein C134 unterstützt. Zusammen mit den  $y$ -Ionen wird die Sequenz  $_{127}\text{XTASVVcCLNNFYPR}_{142}$  daher ab dem Threonin mit einer Carbamidomethylierung am Cystein als bestätigt betrachtet. Problematisch sind dabei die Signale 1238.6100, 1385.5340 und 1548.7510, deren Differenz die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin widerspiegeln. Deren Differenz ist um bis zu 0.15 Da größer als die Masse der entsprechenden Aminosäure. Da dieser Teil der Sequenz aber durch die  $y$ -Serie abgedeckt wurde, wird dieser Unterschied hingenommen.

Das 167.0448-Signal entspricht dem X in der Sequenz, welches nicht anhand des Spektrums aufgeklärt werden kann. Es ist denkbar, dass dieses Peptid tatsächlich eine 80 Da-Modifikation trägt, wie es die Masse des Vorläuferions vermuten ließ. Da aber zusätzlich die Carbamidomethylierung am Cystein aufgetreten ist, würde dies bedeuten, dass die restliche Peptidsequenz um eine Aminosäure mit der gleichen Masse wie eine Carbamidomethylierung reduziert wäre. In der nicht-verifizierten Peptidsequenz  $_{127}\text{SGTASVVCLNNFYPR}_{142}$  existiert ein Glycin, welches die gleiche Masse hat wie eine Carbamidomethylierung, so dass das Spektrum das sulfonierte Peptid  $_{127}\text{STASVVcCLNNFYPR}_{142}$  ohne Glycin darstellen könnte. Der Abgleich dieses Peptides mit der *SwissProt*-Datenbank zeigt aber, dass dieses Peptid bis jetzt nicht beschrieben wurde. Daher erscheint das sulfonierte Peptid  $_{127}\text{STASVVcCLNNFYPR}_{142}$  als unwahrscheinlich. Des Weiteren ist es möglich, dass dieses Spektrum das Peptid  $\text{SGTASVVcCLNNFYPR}$  mit einer unbekanntem Modifikation zeigt. An-

hand der Masse des Vorläuferions müsste die Modifikation eine Masse von 23 Da aufweisen. Eine entsprechende Modifikation konnte in der *Unimod*-Datenbank jedoch nicht gefunden werden.

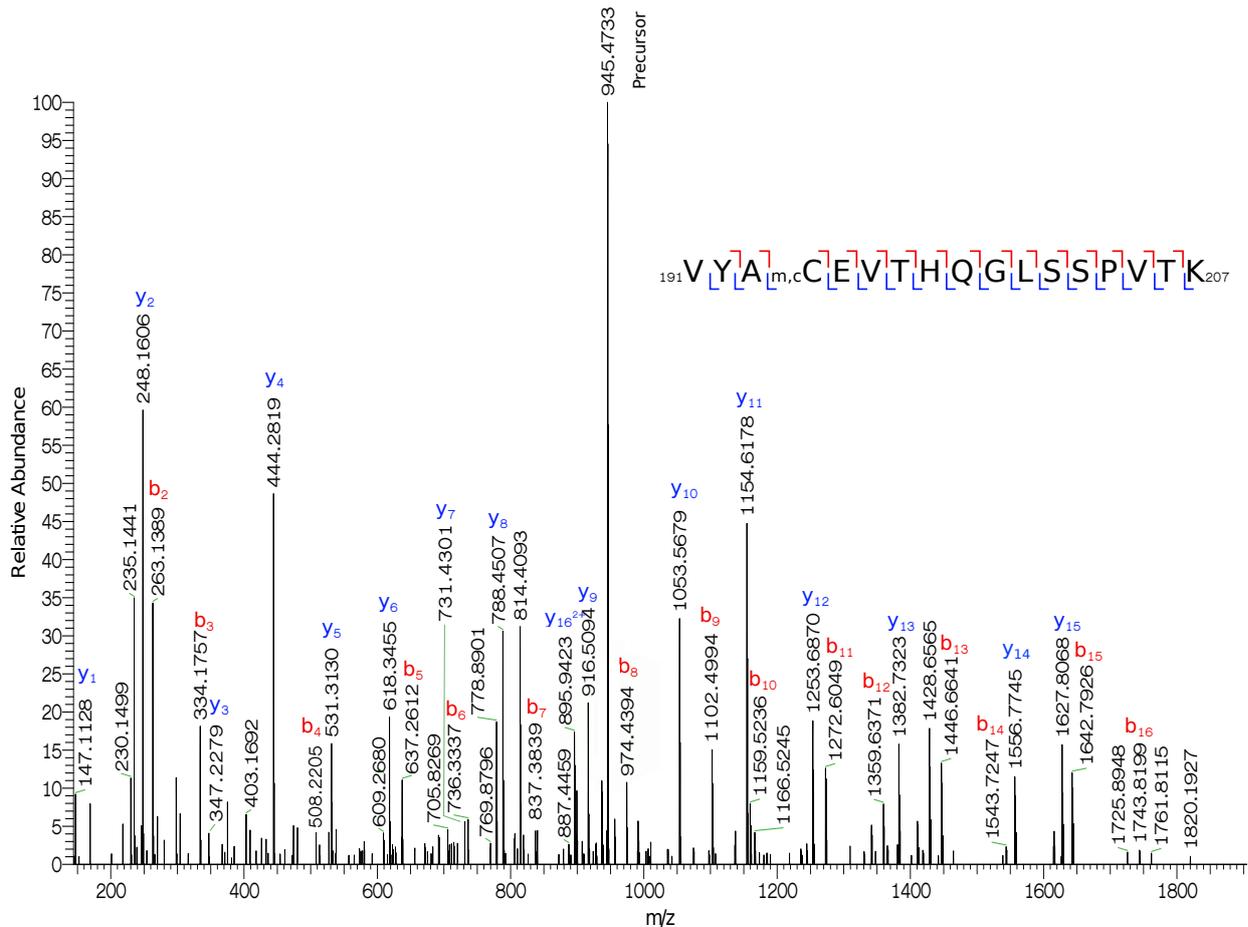
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass entgegen der von Mascot postulierten sulfonierten Sequenz, die vier Spektren der Proben GI 1206, SC 1211, WS 1199 und EW 1046 nicht das sulfonierte  $_{127}\text{SGTASVVCLNNFYPR}_{142}$ -Peptid repräsentieren. Auf der Grundlage der gefundenen  $y$ - und  $b^*$ -Ionen kann aber das Peptid  $_{127}\text{XTASVVcCLNNFYPR}_{142}$  ab dem Threonin bis zum Arginin verifiziert werden. Die Identität des X-Restes kann nicht eindeutig bestimmt werden.

### 4.4.2 Methylierung am Cystein

Die Mascot-Suche identifizierte eine Methylierung an der Glutaminsäure E195 bei allen drei Proben der Multiplen-Myelom-Patienten (GI 1206, SC 1211 und WS 1199) sowie bei allen drei Patienten mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose-Beteiligung (EW 1046, SP 1070 und KR 1159). In der Abbildung 4.21 ist das Spektrum für das Peptid  $_{191}\text{VYAm,cCEVTHQ-GLSSPVTK}_{207}$  aus der SP 1070-Trypsin-Messung exemplarisch für die methylierten Peptide dargestellt. Die manuelle Überprüfung der Spektren zeigte stets eine nahezu vollständige  $y$ -Serie ohne  $y_{14}$ -Ion, welche die Aminosäuresequenz des Peptids bestätigte. Die einzige Lücke in der  $y$ -Serie war an der Stelle der posttranslationalen Modifikation zu finden, sodass eine Verifizierung der PTM-Lokalisation nicht möglich war. Allerdings konnte in den Spektren eine vollständige  $y$ -Serie erkannt werden, wenn eine Methylierung am Cystein C194 anstelle der Glutaminsäure E195 postuliert wurde. Die Lokalisation am Cystein C194 wird außerdem durch die vollständige  $b$ -Serie bestätigt. Die Überprüfung in der PTM-Datenbank *Unimod*<sup>3</sup> zeigt, dass eine Methylierung an nahezu jeder Aminosäure inklusive der Glutaminsäure als auch am Cystein vorkommen kann, sodass von einer Identifizierung der Methylierung am Cystein ausgegangen wird. Bei der Auswahl der Parameter für die Mascot-Suche existierte nur die Option einer Methylierung an den Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure, weshalb die Mascot-Ergebnisse eine andere Lokalisation der PTM aufzeigten.

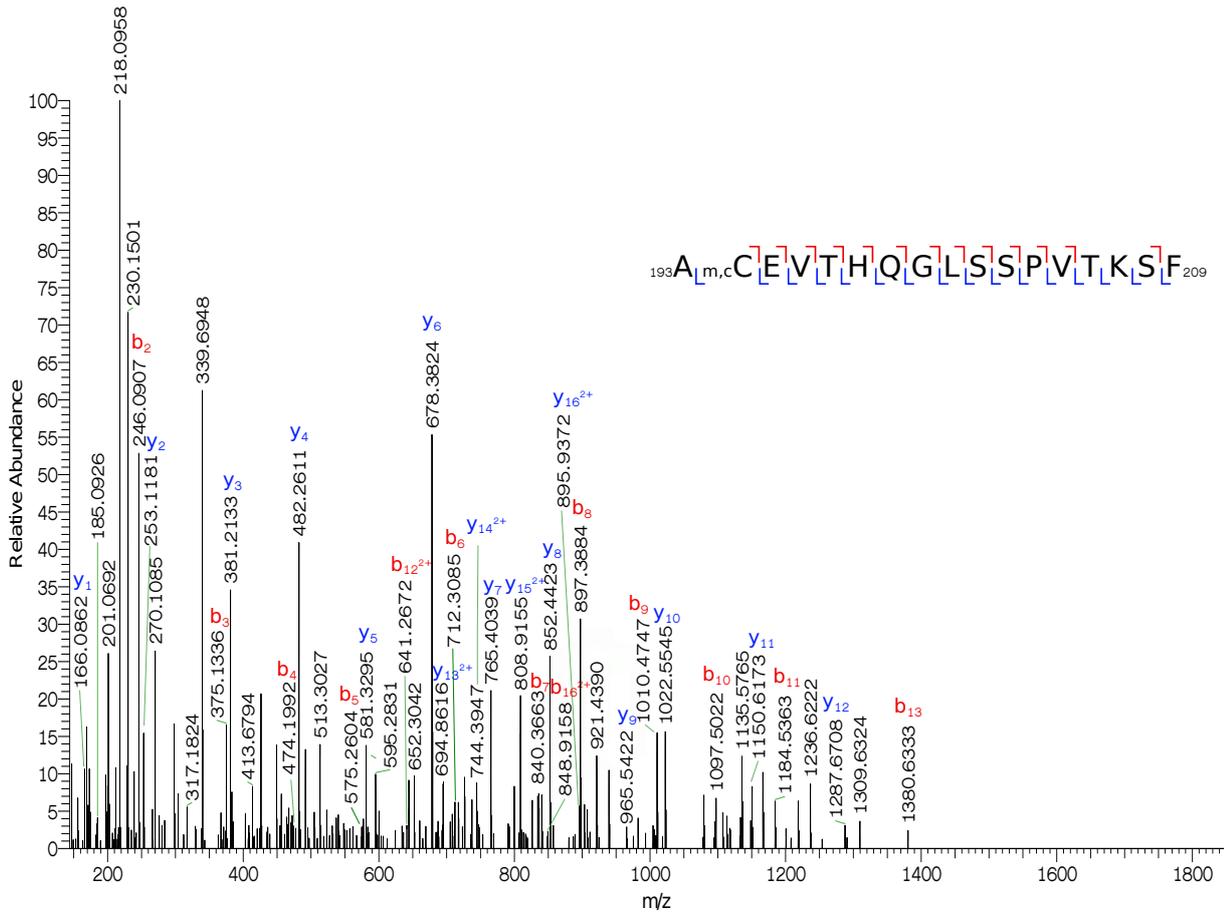
---

<sup>3</sup>[http://www.unimod.org/modifications\\_view.php?editid1=34](http://www.unimod.org/modifications_view.php?editid1=34)



**Abbildung 4.21: MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides  ${}_{191}\text{VYAm,cCEVTHQGLSSPVTk}_{207}$  mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 945.98 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1889.95 Da. Während Mascot die Methylierung an der Glutaminsäure E195 postulierte, zeigen die  $y$ - und  $b$ -Ionen die Methylierung am Cystein C194.

Die Methylierung am Cystein C194 wird bei allen sechs Proben durch mindestens zwei unterschiedliche Peptide im Trypsinverdau und ein Peptid im Chymotrypsinverdau bestätigt, welche diese posttranslationale Modifikation aufwiesen. Am häufigsten trat dabei das Peptid  ${}_{191}\text{VYACEVTHQGLSSPVTk}_{207}$  im Trypsinverdau und  ${}_{193}\text{ACEVTHQGLSSPVTk(SF)}_{209}$  im Chymotrypsinverdau auf, welche bei allen Proben zu finden waren. Die Spektren dieser beiden Peptide sind für die Probe SP 1070 in den Abbildungen 4.21 und 4.22 dargestellt. Bei diesen Peptiden ermöglichte die vollständige  $y$ -Serie und die partielle  $b$ -Serie eine Bestätigung der Aminosäuresequenz sowie die Lokalisation der posttranslationalen Modifikation am Cystein C194. Die partielle  $b$ -Serie erwies sich dabei als lückenlos im Bereich der posttranslationalen



**Abbildung 4.22: MS/MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten methylierten Peptides  $^{193}\text{Am,cCEVTHQGLSSPVTKLSF}_{209}$  mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 621.31 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1860.91 Da. Während Mascot die Methylierung an der Glutaminsäure E195 postulierte, zeigen die  $y$ - und  $b$ -Ionen die Methylierung am Cystein C194.

len Modifikation, weshalb die Lokalisation der PTM am Cystein C194 zuverlässig bestimmt werden konnte. Eine Auflistung der gefundenen Peptide für alle sechs Proben ist in der Tabelle 4.3 gegeben. Bei einigen Spektren traten dabei vereinzelt Lücken in der  $b$ - oder  $y$ -Serie auf. Da jedoch eine Übereinstimmung der Vorläuferion- $m/z$  zu den dargestellten Spektren vorhanden war sowie partiell die gleichen  $y$ - und  $b$ -Ionen auftraten, kann von dem gleichen Peptid ausgegangen werden. Peptide mit fehlenden  $y$ - oder  $b$ -Ionen konnten wahrscheinlich schlechter fragmentiert bzw. ionisiert werden und erzeugten dadurch ein schlechteres Spektrum. Da die C194-Methylierung bei allen Proben bei mehreren unterschiedlichen Peptiden gefunden werden konnte, kann von einem Nachweis dieser posttranslationalen Modifikation bei allen sechs Proben ausgegangen werden.

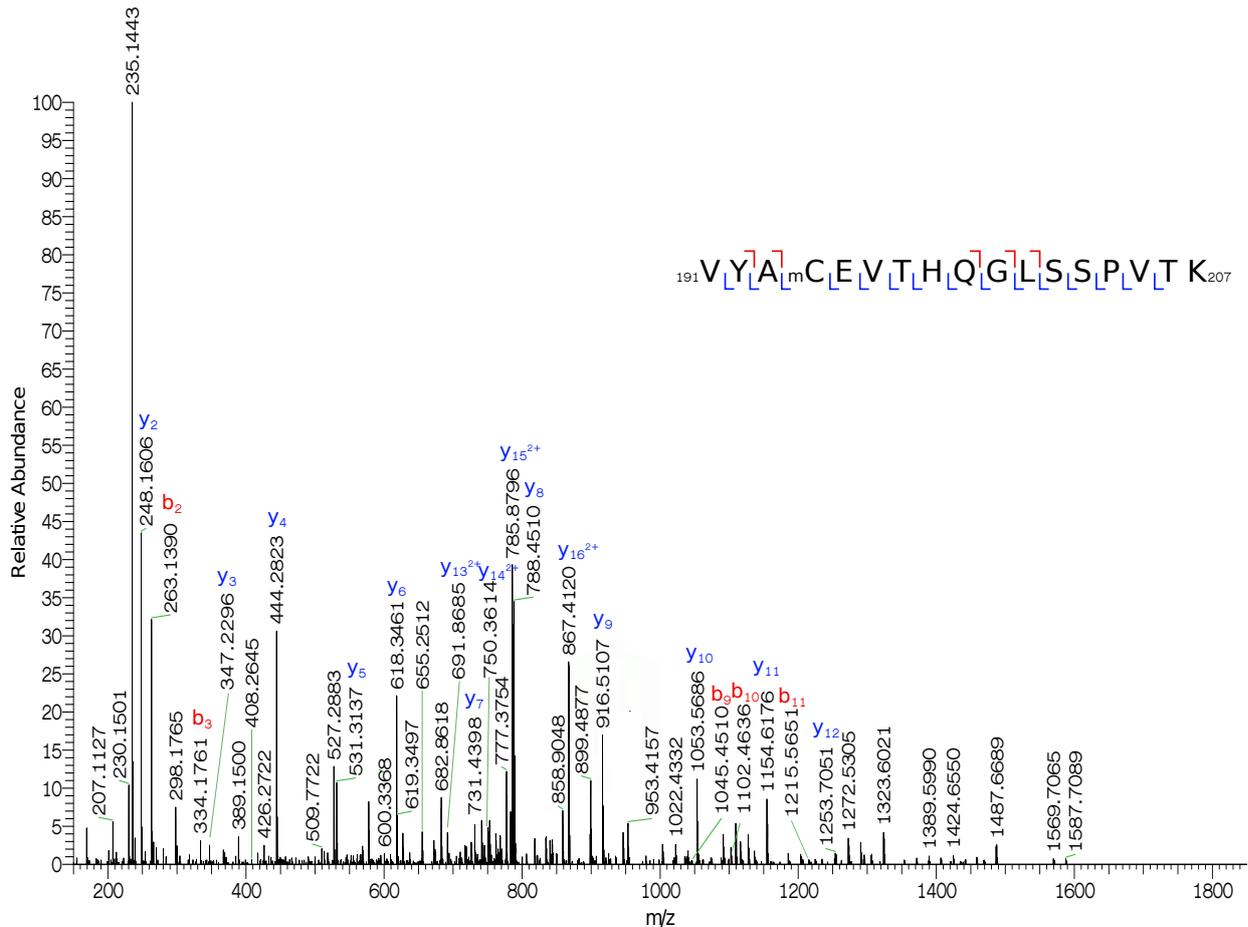
Die mittels Mascot-Suche identifizierten Spektren zeigen stets eine Methylierung am Cystein C194 in Verbindung mit einer Carbamidomethylierung am gleichen Cystein. Die Carbamidomethylierung ist das Resultat der Alkylierung zur Eliminierung von Disulfidbrücken während der Probenvorbereitung. Das gemeinsame Auftreten dieser beiden posttranslationalen Modifikationen lässt die Fragen entstehen, inwiefern die Methylierung eine wahre PTM darstellt oder ebenfalls während der Probenvorbereitung entstanden ist. Auf den ersten Blick würde bei einer PTM am Schwefel des Cysteins eine sterische Hemmung der Alkylierungsreaktion erwartet werden, sodass an dieser Stelle nicht mit einer Carbamidomethylierung zu rechnen wäre. Auf der anderen Seite existieren bei allen sechs Proben jeweils fünf Cysteine in der Aminosäuresequenz, die nach der Alkylierung eine Carbamidomethylierung aufwiesen und nur am Cystein C194 trat zusätzlich die Methylierung auf. Sollte die Methylierung ein Artefakt der Probenvorbereitung darstellen, so würde das Auftreten der Methylierung an mehreren Cysteinen neben der Carbamidomethylierung erwartet werden. Das ausschließliche Vorhandensein der Methylierung am Cystein C194 deutet daher auf eine posttranslationale Modifikation hin. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das ausschließliche Auftreten der Methylierung am Cystein C194 auf eine bessere Zugänglichkeit am Protein zurückzuführen ist.

Zur Widerlegung der Artefakt-Hypothese und Bestätigung der Modifikation wurde in einem weiteren Schritt in sämtlichen Spektren manuell nach den Peptiden  $_{193}\text{AmCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  ( $P_{m1}$ ),  $_{193}\text{AmCEVTHQGLSSPVTKSF}_{209}$  ( $P_{m2}$ ),  $_{191}\text{VYAmCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  ( $P_{m3}$ ) und  $_{189}\text{HKVYAmCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  ( $P_{m4}$ ) gesucht, die die häufigsten Peptide mit der Methylierung bei den Mascot-Ergebnissen darstellten. Diese Peptide weisen die Methylierung auf, während die Carbamidomethylierung fehlt. Die manuelle Suche konnte bei den Messungen der Proben GI 1206, SC 1211, WS 1199 und SP 1070 im Trypsinverdau das Peptid  $P_{m3}$  und bei der Probe SP 1070 das Peptid  $P_{m4}$  identifizieren, deren Spektren in der Abbildungen 4.23 und 4.24 dargestellt sind. Bei den Chymotrypsinverdau-Messungen konnte kein Peptid mit der Methylierung und ohne Carbamidomethylierung gefunden werden.

Das Peptid  $P_{m3}$  ( $_{191}\text{VYAmCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ ) tritt bei den Proben GI 1206, SC 1211, und SP 1070 sowie bei WS 1199 als dreifach geladenes Ion  $[M+3H^+]^{3+}$  auf. Das MS/MS-

**Tabelle 4.3: Übersicht der methylierten Peptide im Bereich des Cysteins C194.** Aufgeführt sind für jeden Patienten die gefundenen Spektren. Für jedes Spektrum wurde die Qualität der b- und y-Serie bewertet: b:+++ := lückenlose b-Serie, b:++ := b-Serie mit vereinzelt Lücken, im Bereich von C194 aber lückenlos, b:(++) := b-Serie mit vereinzelt Lücken (auch im Bereich des Cysteins C194), b:+ := vereinzelt b-Ionen, b:- := kein b-Ion vorhanden. Analog zur b-Serie wurde die y-Serie bewertet. Die Zahlen in der Tabelle verweisen auf die abgebildeten Spektren im Anhang.

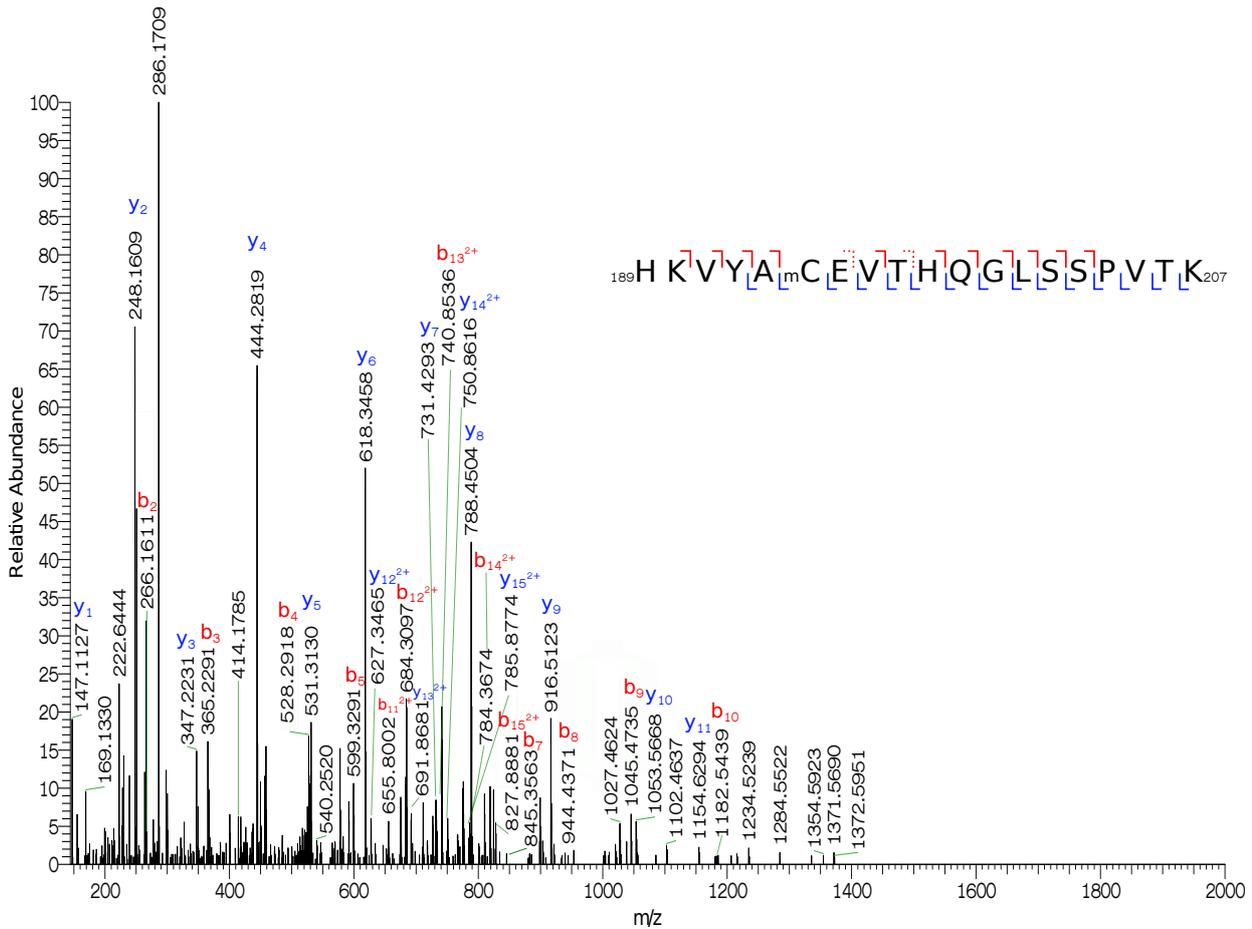
Multiples Myelom		Multiples Myelom mit AL-Amyloidose			
GI 1206	SC 1211	WS 1199	EW 1046	SP 1070	KR 1159
Trypsinverdau					
Peptid VYAm,cCEVTHQGLSSPVTk					
b:+, y:+++ (Abb. A.29)	b:(++), y:+++ (Abb. A.30)	b:+, y:+++ (Abb. A.31)	b:+, y:+++ (Abb. A.32)	b:++++, y:+++ (Abb. 4.21)	b:+, y:+++ (Abb. A.33)
Peptid <sub>189</sub> HKVYAm,cCEVTHQGLSSPVTk <sub>207</sub>					
-	-	-	-	b:++++, y:+++ (Abb. A.34)	-
Chymotrypsinverdau					
Peptid <sub>193</sub> Am,cCEVTHQGLSSPVTk <sub>207</sub>					
-	-	-	b:+++ , y:+++ (Abb. A.35)	-	-
Peptid <sub>193</sub> Am,cCEVTHQGLSSPVTkSF <sub>209</sub>					
b:+, y:(++) (Abb. A.36)	b:+++ , y:+++ (Abb. A.37)	b:+++ , y:+++ (Abb. A.38)	b:++++, y:+++ (Abb. A.39)	b:++++, y:+++ (Abb. 4.22)	b:+++ , y:+++ (Abb. A.40)



**Abbildung 4.23: MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides  $^{191}\text{VYAmCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  ohne Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten GI 1206.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 611.97 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1832.89 Da.

Spektrum dieses Ions zeigt für die Proben GI 1206, WS 1199 und SP 1070 die vollständige y-Serie für das Peptid inklusive der  $y_{13}$ - und  $y_{14}$ -Ionen, welche die Methylierung am Cystein ohne Carbamidomethylierung beweisen. Für die Probe GI 1206 wurde das MS/MS-Spektrum in der Abbildung 4.23 stellvertretend für alle drei Proben visualisiert. Aufgrund des Auftretens der lückenlosen y-Serie wird die Identifizierung der Methylierung am Cystein ohne Carbamidomethylierung als zuverlässig angesehen.

Bei der Probe SC 1211 konnte das Durchschnittsspektrum des  $P_{m3}$ -Ions mit Hilfe des Auswertungsprogrammes *Xcalibur* gefunden werden. Dieses zeigt ebenfalls die vollständige y-Serie, wodurch die PTM bestätigt und deren Lokalisation ermöglicht wird. Bei diesem



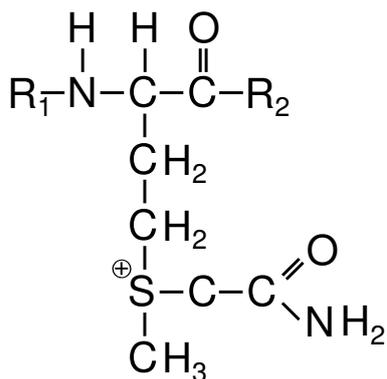
**Abbildung 4.24: MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides  $^{189}\text{HKVYAmCEV-THQGLSSPVTK}_{207}$  ohne Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 525.52 Da und einer Ladung von  $4^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2098.05 Da. Die gestrichelte Markierung der b-Ionen zeigt auf Ionen, deren Abweichung von den kalkulierten m/z-Werten mit bis zu 0.05 Da abweichen, während sonst 0.03 Da zulässig sind.

Spektrum fehlen jedoch die Ionen der b-Serie, die die Methylierung am C194-Cystein verifizieren könnten. Ein Einzelspektrum für dieses Peptid konnte bei der SC 1211-Probe nicht aus der Gesamtdatei extrahiert werden. Dies könnte problematisch für eine eindeutige Identifizierung und Lokalisation der PTMs sein, da das Durchschnittsspektrum alle Signale aus den Einzelspektren mit dem gleichen Vorläufer-m/z vereinigt. Bei dem Auftreten von unterschiedlichen Vorläuferionen mit gleichen m/z könnten so die MS/MS-Spektren von zwei unterschiedlichen Molekülen vermischt und dadurch fehlerhafte Spektren generiert werden.

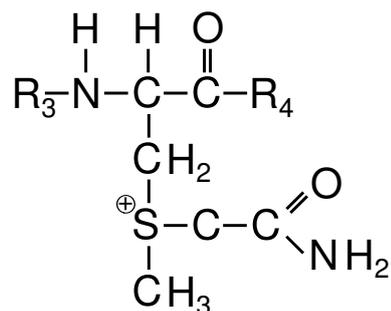
Des Weiteren wurde das Peptid P<sub>m</sub>4 (<sub>189</sub>HKVYAmCEVTHQGLSSPVTK<sub>207</sub>) bei der Probe SP 1070 als vierfach geladenes Ion  $[M+4H^+]^{4+}$  gefunden. Das MS/MS-Spektrum beinhaltet für dieses Ion die y-Serie vom y<sub>1</sub>- bis y<sub>15</sub>-Ion, wodurch eine Bestätigung der Aminosäuresequenz des Peptids und die Lokalisation der PTM möglich ist. Außerdem sind in der b-Serie die b<sub>2</sub>- bis b<sub>15</sub>-Ionen ohne das b<sub>6</sub>-Ion vorhanden. Das fehlende b<sub>6</sub>-Ion wäre notwendig, um die Methylierung am Cystein C194 zusätzlich zu bestätigen. Die b<sub>7</sub>- und b<sub>9</sub>-Ionen zeigen einen größeren Fehler als 0.03 Da. Da dieser Teils des Peptids aber bereits durch die y-Serie abgedeckt wurde, wird dieser Fehler akzeptiert. Eine Darstellung dieses MS/MS-Spektrums ist in der Abbildung 4.24 zu finden.

Das Vorhandensein von Spektren mit der Methylierung und fehlender Carbamidomethylierung legt die Schlussfolgerung nah, dass auch bei Spektren mit beiden Modifikationen die Methylierung eine wahre PTM zeigt, die nicht während der Probenvorbereitung entstanden ist. Des Weiteren bestätigt das Auftreten von dem <sub>191</sub>VYAm,cCEVTHQGLSSPVTK<sub>207</sub>-Peptid bei allen sechs Proben die Methylierung als wahre PTM bei allen Proben, auch wenn bei den Proben EW 1046 und KR 1159 die Spektren mit der Methylierung ohne die Carbamidomethylierung nicht gefunden werden konnten. Es wird vermutet, dass die methylierten Spektren ohne Carbamidomethylierung ein schlechteres Ionisierungs- oder Fragmentierungsverhalten zeigen und deshalb seltener als MS/MS-Spektrum in der Messung zu finden waren.

Zuletzt stellt sich die Frage, wo die Methylgruppe am Cystein lokalisiert sein könnte. Da bei der Analyse Peptide mit methyliertem Cystein und Carbamidomethylierung gefunden werden konnten, wird zunächst die Methylgruppe nicht am Schwefel erwartet, da an diesem die Carbamidomethylierung vorhanden ist. Allerdings konnten Gurd *et al.* [108, 109] und Lapko *et al.* [107] zeigen, dass eine Carbamidomethylierung am Schwefel eines Methionins als Nebenprodukt der Alkylierungsreaktion mit Iodacetamid auftreten kann. Da sich ein Methionin nur durch die zusätzliche  $\gamma$ -Methylgruppe von einem methyliertem Cystein unterscheidet, könnte die Alkylierungsreaktion am Schwefel des methylierten Cysteins abgelaufen sein, sodass das gleichzeitige Auftreten der Carbamidomethylierung und der Methylierung am Cystein C194 möglich ist. Die denkbaren Strukturformeln für ein carbamidomethyliertes Methionin und Cystein mit einer zusätzlichen Methylgruppe sind in der Abbildung 4.25 dargestellt.



Methionin mit  
Carbamidomethylierung

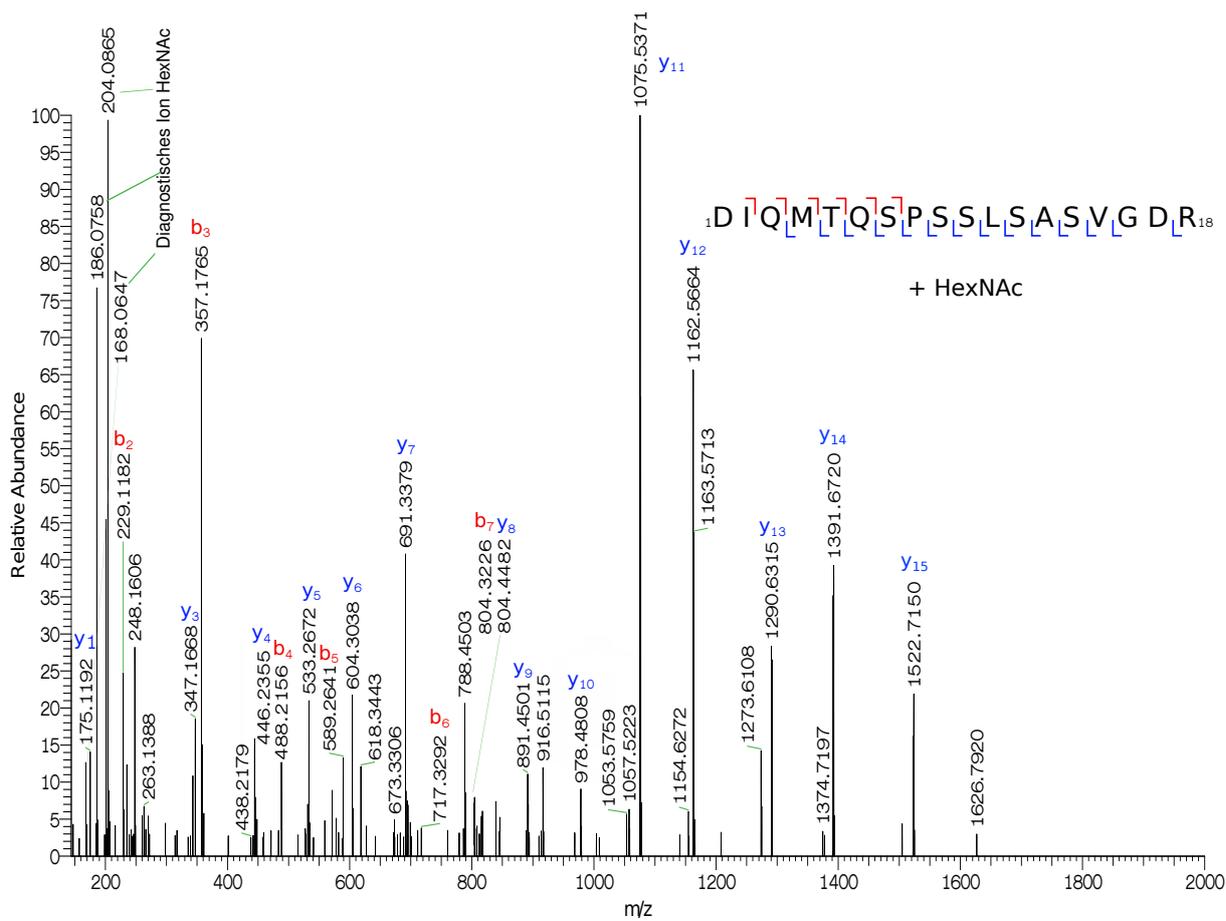


Methyliertes Cystein mit  
Carbamidomethylierung

**Abbildung 4.25: Mögliche Strukturformeln für ein Methionin bzw. methyliertes Cystein mit Carbamidomethylierung.** Die Strukturformel für das Methionin wurde aus der Veröffentlichung von Lapko *et al.* [107] entnommen und auf das methylierte Cystein übertragen.

#### 4.4.3 Glykosylierung

Bei den Patienten SP 1070, GI 1206 und WS 1199 konnten mit Hilfe des Auswertungsprogrammes PEAKS in den HCD-MS-Spektren die Peptide  $_1\text{DIQMTQSPSSLSASVGDR}_{18}$ ,  $_1\text{DIQMTQSPSTLSASIGDR}_{18}$  und  $_4\text{MTQSPSSLSASVGDR}_{18}$  mit einem *N*-Acetylhexosamin (HexNAc) im *N*-terminalen Bereich der variablen Region identifiziert werden. Bei dem HexNAc könnte es sich sowohl um ein *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) als auch ein *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) handeln, da diese Stereoisomere sind. Dadurch weisen sie die gleiche monoisotopische Masse auf und können in einer massenspektrometischen Messung nicht voneinander unterschieden werden. Es wird jedoch vermutet, dass die gefundene HexNAc-Glykosylierung eine GlcNAc-Glykosylierung darstellt, da in verschiedenen Veröffentlichungen die GlcNAc-Glykosylierung als eine weitverbreitete posttranslationale Modifikation beschrieben wird [45–50]. Für das Auftreten eines einzelnen GalNAcs ohne zusätzliche Monosaccharide konnten hingegen keine Veröffentlichungen gefunden werden. Ein GalNAc an einem Serin oder Threonin stellt vielmehr den Ausgangspunkt für komplexe *O*-Glykane dar [110].



**Abbildung 4.26: HCD-MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $^1$ DIQMTQSPSSLSASVGDR $_{18}$  des Patienten SP 1070 mit einer HexNAc-Glykosylierung.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 695.33 Da und einer 3<sup>+</sup>-Ladung. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2082.97 Da. Die dargestellten y- und b-Ionen zeigen die Ionen ohne die HexNAc-Glykosylierung.

Das Spektrum der SP 1070-Probe ist in der Abbildung 4.26 dargestellt, die Spektren der Proben GI 1206 und WS 1199 befinden sich im Anhang in den Abbildungen A.41 und A.42. Diese drei Spektren zeichnen sich durch eine lückenlose y-Serie über das gesamte Peptid sowie durch eine b-Serie aus, die den N-terminalen Bereich der Peptide abdeckt, sodass jede Aminosäure in diesen Peptiden mindestens durch die y- oder b-Serie bestätigt werden kann. So existieren z. B. bei der Probe SP 1070 die y-Ionen von  $y_1$  bis  $y_{15}$  ohne das  $y_2$ -Ion, während die b-Ionen von  $b_2$  bis  $b_7$  lückenlos vorhanden sind. Die Spektren der Proben GI 1206 und WS 1199 zeigen ähnliche y- und b-Serien, sodass auch bei diesen von einer zuverlässigen Sequenzverifikation ausgegangen werden kann, auch wenn bei diesen die b-Serien einzelne Lücken aufweisen.

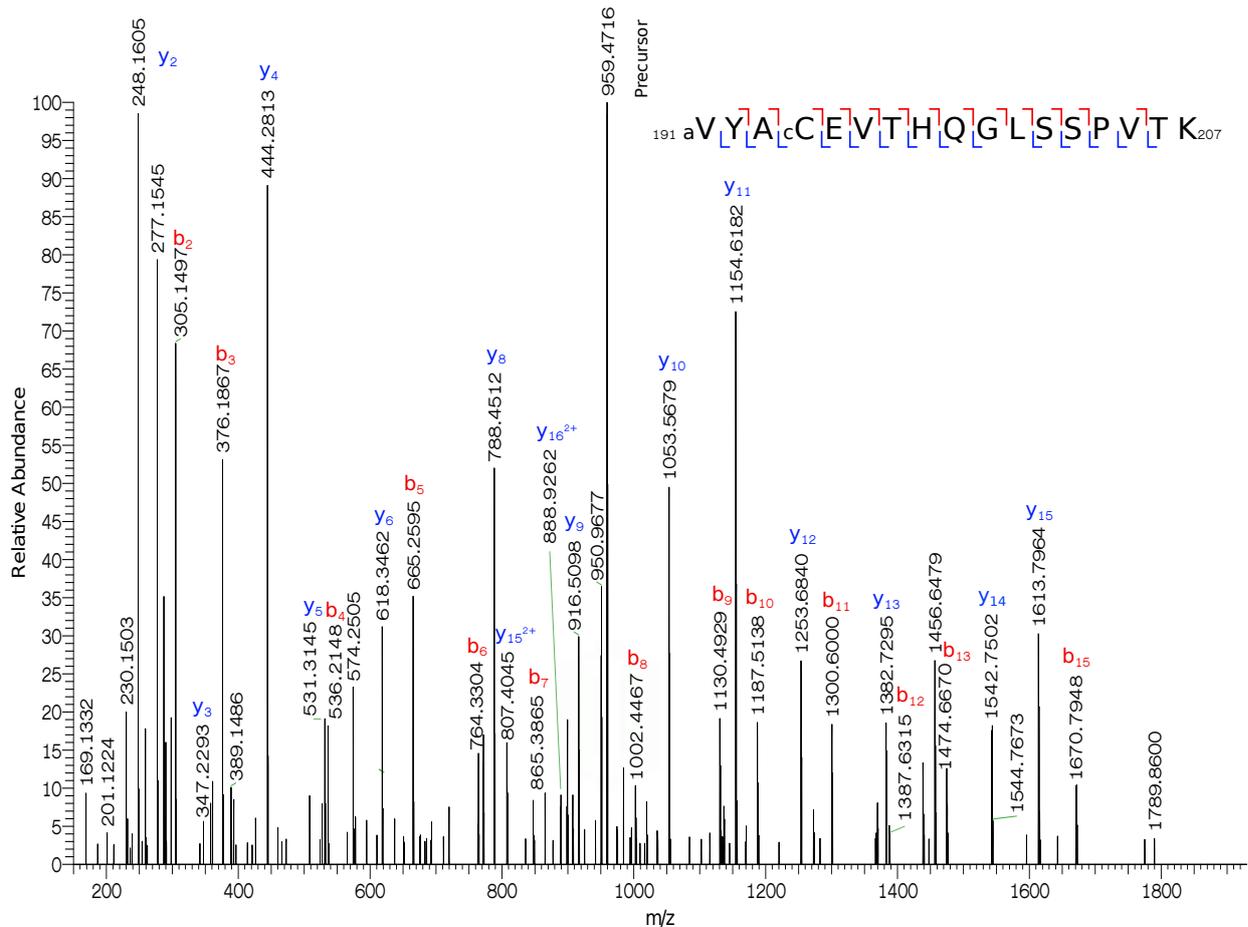
Allerdings beinhalten alle drei Spektren nur  $y$ - und  $b$ -Ionen ohne die PTM HexNAc. Der Vergleich mit literaturbekannten HCD-MS-Spektren [45] zeigt, dass dieses Verhalten typisch für eine HexNAc-Glykosylierung ist, welche analog zur Sulfonierung bei einer HCD-Fragmentierung abgespalten wird. Das Vorhandensein der HexNAc-Glykosylierung ist aber aufgrund der Erhöhung des  $m/z$ -Verhältnisses der Vorläuferionen um 203 Da sehr wahrscheinlich. Zusätzlich zeigen alle drei Spektren die für eine HexNAc-Glykosylierung spezifischen diagnostischen Ionen 168, 186 und 204 [45], wodurch die HexNAc-Glykosylierung weiter bestätigt wird. Eine Lokalisation der HexNAc-Glykosylierung ist jedoch aufgrund der vorhandenen  $y$ - und  $b$ -Ionen nicht möglich, da diese nur anhand von PTM-tragenden Ionen erfolgen könnte. Bei einer HexNAc-Glykosylierung handelt es sich um eine *O*-Glykosylierung [45], weshalb die Spektren vermutlich eine HexNAc-Glykosylierung an einen der Serine bzw. Threonine zeigen. Passende ETD-Spektren konnten allerdings nicht identifiziert werden. Diese hätten die Lokalisation der HexNAc-PTM ermöglichen können, da die HexNAc-Glykosylierung bei der ETD-Fragmentierung erhalten bleibt [45].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den Patienten SP 1070, GI 1206 und WS 1199 eine GlcNAc-Glykosylierung im *N*-terminalen Bereich der variablen Region gefunden werden konnte. Eine krankheitsspezifische PTM-Identifizierung konnte jedoch nicht erfolgen, da die Patienten GI 1206 und WS 1199 am Multiplen Myelom erkrankt sind, während der Patient SP 1070 zusätzlich eine AL-Amyloidose aufweist. Die gefundene GlcNAc-Glykosylierung sitzt wahrscheinlich an einen der Serine oder Threonine, welche sich unter den ersten 14 Aminosäuren befinden. Eine genaue Lokalisation ist aufgrund von fehlenden ETD-Spektren jedoch nicht möglich. Da eine HexNAc-Glykosylierung enzymatisch erfolgt und ein GlcNAc keine Komponente von Probenvorbereitungspuffern darstellt, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass diese PTM bereits *in vivo* vorhanden war.

### **4.4.4 Prozessbedingte Modifikationen**

#### **4.4.4.1 Acetylierung**

Eine Acetylierung erfolgt bei Proteinen am *N*-Terminus des Proteins bzw. am Stickstoff von Lysinen. Die Mascot-Analyse identifizierte für alle sechs Proben Acetylierungen am Lysin



**Abbildung 4.27: HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  ${}_{191}\text{aVYAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  mit einer N-terminalen Acetylierung.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem  $m/z$  von 959.98 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1917.95 Da.

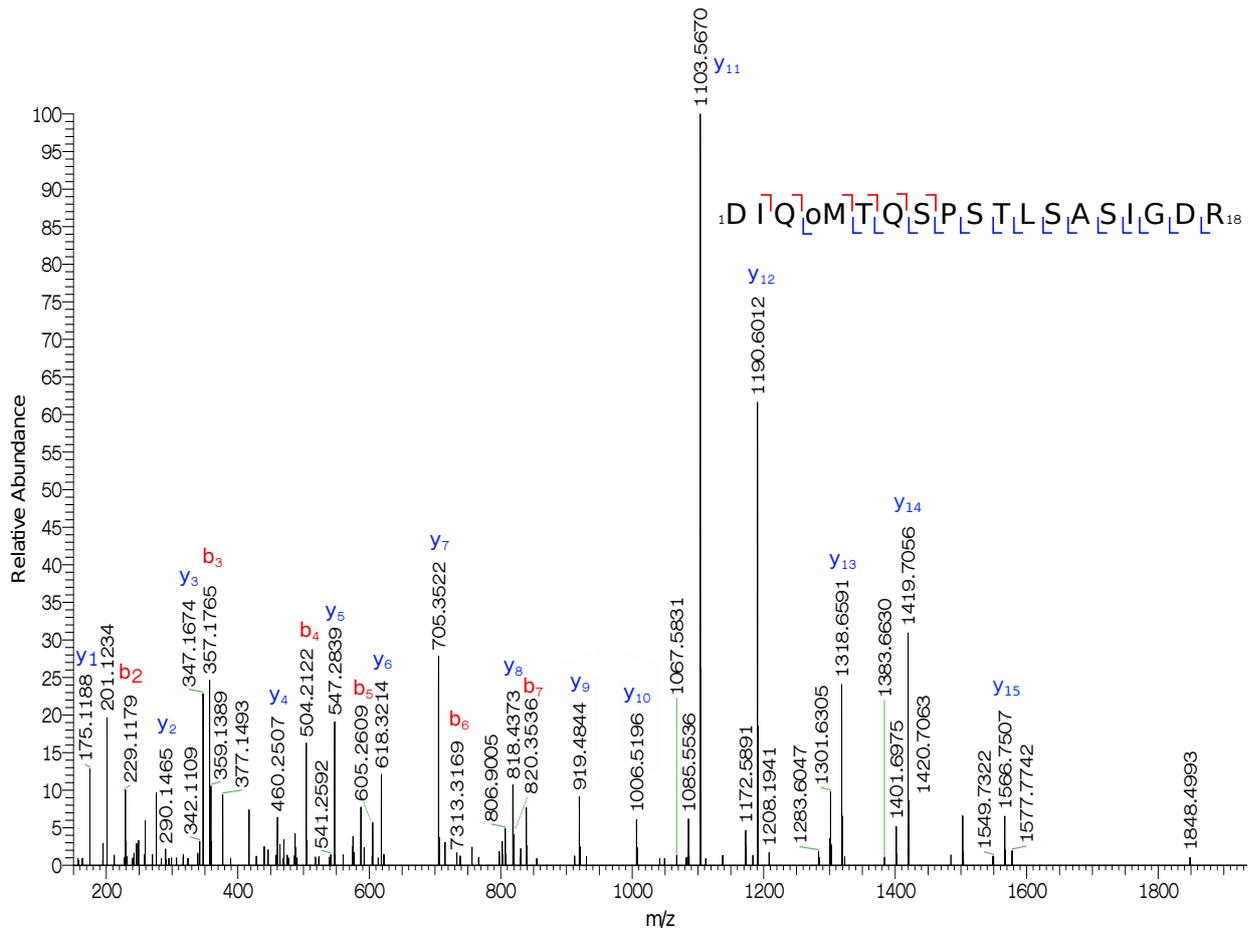
sowie am *N*-Terminus des Proteins und der Peptide, wobei sowohl bei den Trypsin- als auch den chymotrypsinverdauten Proben das Auftreten von Acetylierungen am *N*-Terminus der Peptide bei nahezu allen vorhandenen Peptiden gefunden werden konnte. Ein Beispiel für eine *N*-terminale Acetylierung ist in der Abbildung 4.27 dargestellt.

Bei dem in der Abbildung 4.27 dargestellten  ${}_{191}\text{aVYAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$ -Peptid existiert eine vollständige *y*-Serie von  $y_2$  bis  $y_{16}$  ohne das  $y_7$ -Ion, die das Auftreten der Acetylierung vor dem Tyrosin bestätigt (Zählung beginnend am *N*-Terminus des Peptids). Das Tyrosin stellt die zweite Aminosäure in diesem Peptid dar, weshalb die Acetylierung *N*-

terminal am Valin sein muss. Die b-Serie existiert lückenlos vom  $b_2$ - bis  $b_{15}$ -Ion, wodurch die b-Serie die Acetylierung auf das Tyrosin und das Valin eingrenzt. Das acetylierte Valin- $b_1$ -Ion mit einer Masse von 142.0863 Da konnte nicht im Spektrum gefunden werden, da die massenspektrometrische Messung erst ab einem  $m/z$  von 150 Da begann. Darüber hinaus konnten keine unacetylierten b- Ionen bzw. acetylierten y-Ionen gefunden werden, die die Acetylierungen an einer anderen Stelle als dem *N*-Terminus vermuten ließen, sodass von einer zuverlässigen Identifizierung einer Acetylierung am *N*-Terminus des Peptides ausgegangen wird. Theoretisch könnte der verbliebene Rest mit einer Masse von 142.0863 Da auch zwei Alaninen entsprechen, sodass das Spektrum das Peptid  ${}_{189}\text{AAVAcCEVTHQGLSSPVTK}_{207}$  zeigen könnte. Die Überprüfung dieses Peptides in der *SwissProt*-Datenbank findet jedoch keinerlei Übereinstimmung, sodass das Auftreten des doppelten Alanins an dieser Stelle sehr unwahrscheinlich ist.

Die *N*-terminale Acetylierung als posttranslationale Modifikation erfolgt durch Enzyme, welche die Acetylgruppe an den *N*-Terminus des Proteins binden. Da die untersuchten Spektren allerdings die Acetylierung am *N*-Terminus der Peptide zeigen, handelt es sich höchstwahrscheinlich um keine PTM, die bereits bei der Probenentnahme an den FLCs vorhanden war. Vielmehr wird vermutet, dass es sich bei der Acetylierung um ein Artefakt der Probenvorbereitung oder massenspektrometrischen Messung handelt. Das Auftreten einer Acetylierung an nahezu jedem Peptid und bei jeder Probe unterstützt diese Artefakthypothese. Zur genaueren Untersuchung des Ursprungs der Acetylierung könnten in zukünftigen Arbeiten, analog zu den Arbeiten von Helbig *et al.* [111], acetylierte Peptide gezielt mittels SCX (*Strong Cation Exchange Chromatography*, Kationenaustauschchromatographie mit stark sauren Gruppen) aufkonzentriert und erneut massenspektrometrisch analysiert werden.

Das Auftreten einer *N*-terminalen Peptid-Acetylierung als Artefakt lässt die Identifizierung der acetylierten Lysine bzw. der acetylierten *N*-Protein-Termini als nicht sehr wahrscheinlich erscheinen. Zur besseren Identifizierung einer Acetylierung und einer Lokalisation an einem Lysin innerhalb der Peptidkette könnten die MS/MS-Spektren in weiterführenden Untersuchungen auf die für eine Lysin-Acetylierung spezifischen diagnostischen Ionen 143.1179 Da und 126.0913 Da analysiert werden, wie es auch Trelle *et al.* [112] durchgeführt haben. Mit

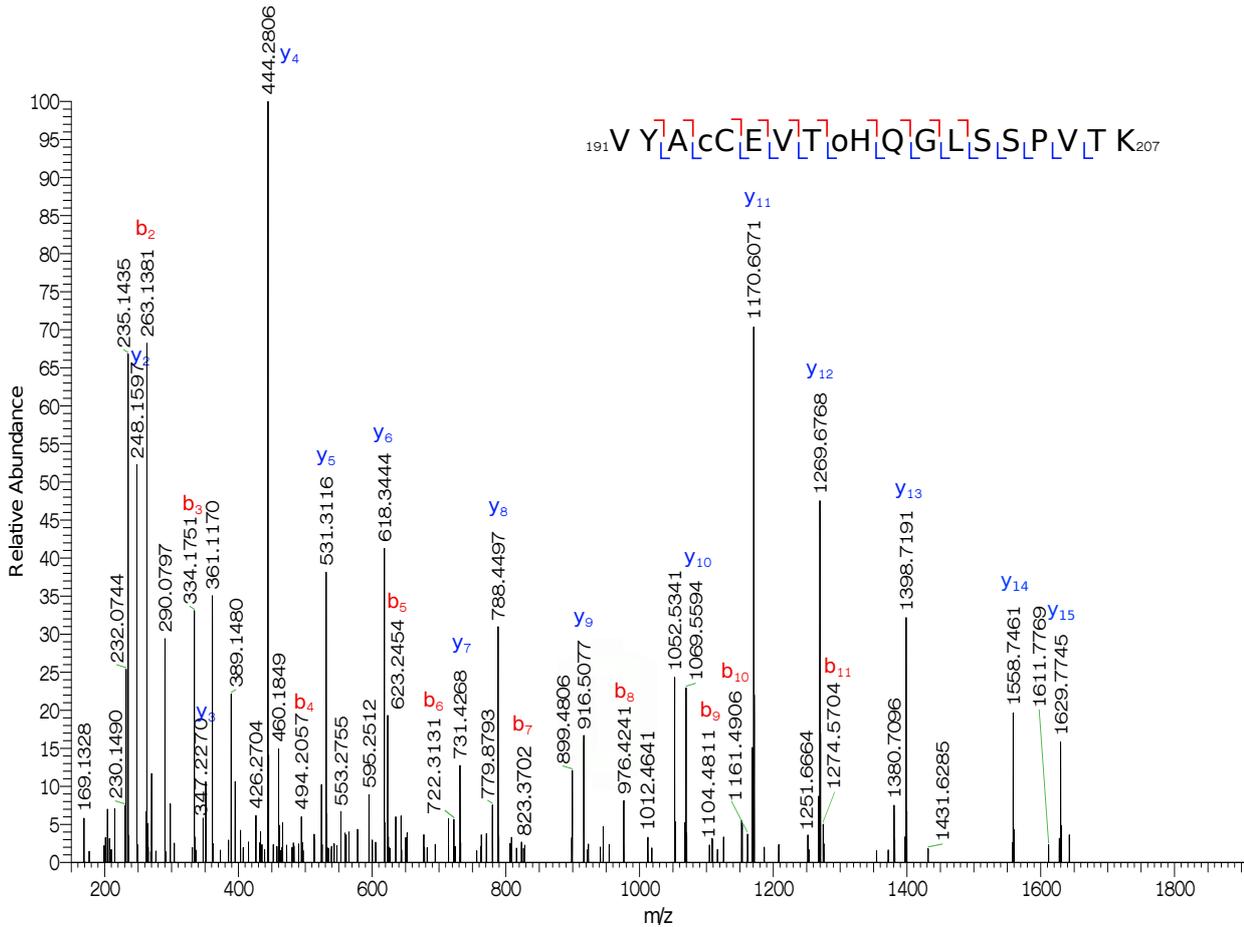


**Abbildung 4.28: HCD-Spektrum des tryptinverdauten Peptids  ${}^1$ DIQoMTQSPSTLSASIGDR<sub>18</sub> mit einer Oxidation am Methionin.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 961.96 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1921.91 Da.

den in dieser Arbeit erzeugten Spektren ist diese Analyse nicht möglich, da die MS/MS-Spektren ab einem m/z von 150 Da aufgenommen wurden.

#### 4.4.4.2 Oxidation

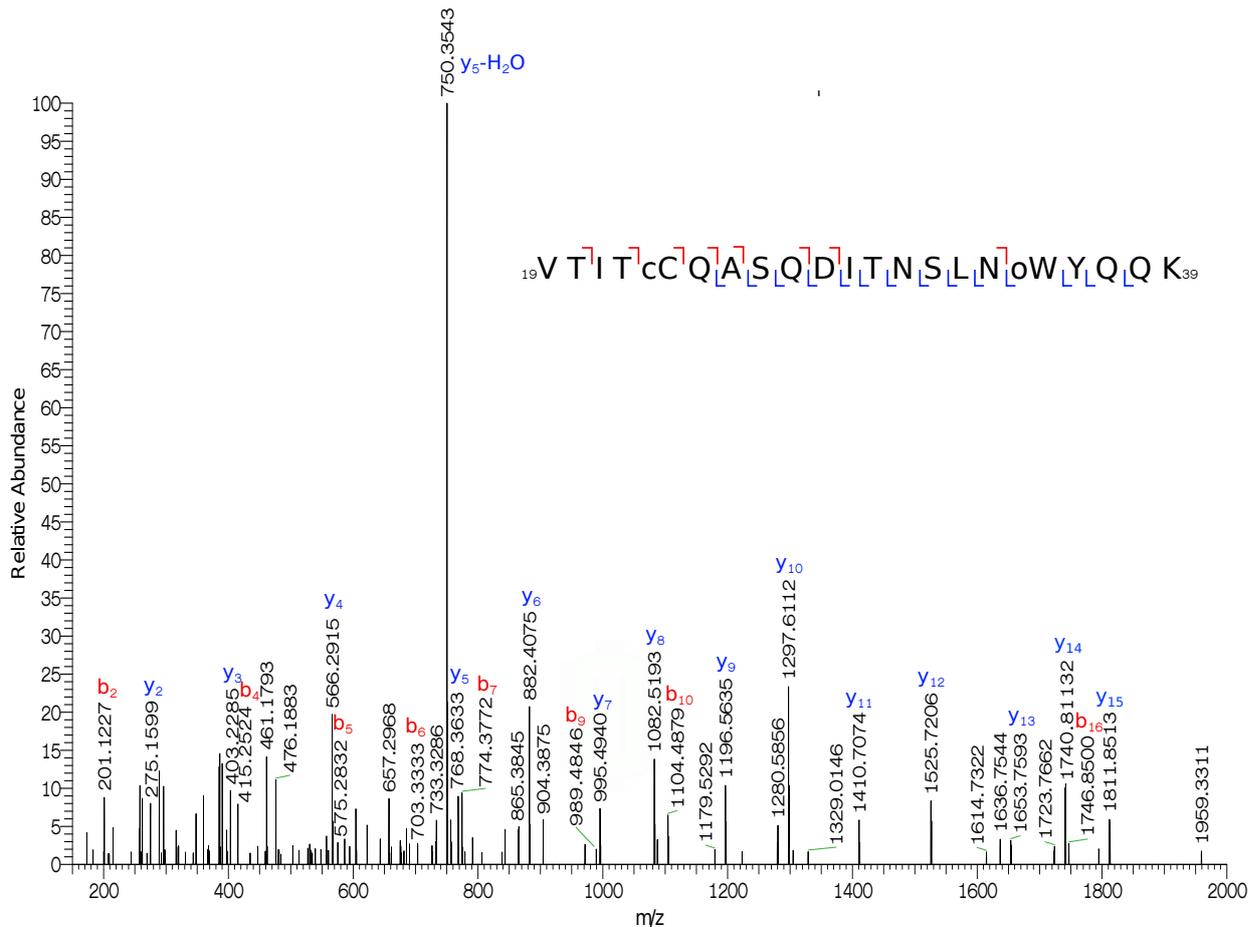
Bei der Suche nach posttranslationalen Modifikationen zeigten die Mascot-Ergebnisse das Auftreten von Oxidationen am Methionin, Histidin und Tryptophan an nahezu allen möglichen Stellen bei allen sechs Proben, wie sie beispielhaft in den Abbildungen 4.28, 4.29 und 4.30 dargestellt sind. Diese Spektren zeichnen sich durch lückenlose y-Serien aus, die die Identität der Peptide bestätigen. Darüber hinaus kann mit Hilfe der y-Serie die Oxidation am Methionin, Histidin und Tryptophan in den Spektren 4.28, 4.29 und 4.30 als posttranslatio-



**Abbildung 4.29: HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  ${}_{191}\text{VYAcCEVToHQLSSPVTK}_{207}$  mit einer Oxidation am Histidin.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem  $m/z$  von 946.46 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1890.91 Da.

nale Modifikation lokalisiert werden. Die Position der Oxidation am Methionin und Histidin in den Spektren 4.28 und 4.29 kann zusätzlich zuverlässig durch die lückenlose b-Serie im Bereich der Modifikation bestimmt werden.

Bei den dargestellten Oxidationen handelt es sich höchstwahrscheinlich um Artefakte aus der Probenvorbereitung bzw. der massenspektrometrischen Messung. Das Auftreten von Methionin-, Histidin- bzw. Tryptophan-Oxidationen bei der Probenvorbereitung und in massenspektrometrischen Messungen wurde auch schon von Schey *et al.* [113], Morand *et al.* [114] und Froehlich *et al.* [115] beschrieben. Auch konnte Perdivara *et al.* [116] zeigen, dass während einer SDS-PAGE Oxidationen am Tryptophan entstehen können.



**Abbildung 4.30: HCD-Spektrum des tryptinverdauten Peptids  ${}_{19}\text{VTITcCQASQDITNSLNoWYQQK}_{39}$  mit einer Oxidation am Tryptophan.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem  $m/z$  von 1258.10 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 2514.19 Da.

Oxidationen von bestimmten Aminosäuren dienen in biologischen Systemen als antioxidativer Vorgang, um so die Auswirkungen von oxidativen Stress für die Zelle zu reduzieren [57–59]. Dazu müssen diese Aminosäuren leicht oxidierbar sein, wobei diese leichte Oxidierbarkeit sie prädestiniert für Oxidationen während der Probenvorbereitung und der massenspektrometrischen Messungen, sodass diese häufig als Artefakte auftreten. Das Auftreten von Oxidationen als Artefakt erhöht allerdings die Komplexität einer Peptidprobe und kann dadurch die Proteinidentifizierung, -charakterisierung und -quantifizierung erschweren [115].

## 4.5 Varianzanalyse

Die Aminosäuresequenz eines Proteins hat einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur von Proteinen. Deshalb wurde analysiert, inwiefern Abschnitte in der FLC-Sequenz existieren, an denen bestimmte Aminosäuren bei krankhaften Subgruppen häufiger auftreten als bei gesunden Kontrollprobanden. Diese „Hot spots“ könnten auf die Eignung als Diagnosewerkzeug untersucht werden. So wäre es denkbar, die FLC-Aminosäuresequenz von Patienten zu analysieren und bei dem Auftreten von spezifischen Aminosäuren an den „Hot spots“ Rückschlüsse auf das Krankheitsbild zu ziehen. Darüber hinaus könnten vorhandene „Hot spots“ als Grundlage für Stabilitätsanalysen von FLCs dienen, um die Ursachen für deren Selbstaggregation weiter zu erforschen. Da Antikörper eine natürliche Sequenzvielfalt zeigen, reichen die sechs in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen nicht aus, um zuverlässige Aussagen treffen zu können. Zur Erhöhung der Anzahl der FLC-Sequenzen wurde deshalb auf die *AL-Base*-Datenbank zurückgegriffen. Diese gehört zum *Amyloid Treatment and Research Center* an der *Boston University School of Medicine* und stellt eine Datenbank zu Untersuchung von amyloidogenen Immunglobulinen dar. Sie beinhaltet FLC-Sequenzen sowohl von gesunden Kontrollprobanden als auch von Patienten mit pathologischen FLCs. Diese Datenbank eignet sich besonders für die Varianzanalyse, da sie eine Vielzahl von FLC-Sequenzen beinhaltet, zu denen das Krankheitsbild der Patienten bzw. die Zugehörigkeit zu einer gesunden Kontrollgruppe vermerkt wurde. Mit Hilfe der FLC-Sequenzen wurde für jede Stelle in der Proteinsequenz die am häufigsten vorkommende Aminosäure ermittelt und in einem zweiten Schritt untersucht, wie oft diese Aminosäure in den unterschiedlichen Subgruppen Multiples Myelom, AL-Amyloidose sowie Multiples Myelom mit AL-Amyloidose-Beteiligung bzw. in der Kontrollgruppe auftreten und an welchen Stellen in der Sequenz Unterschiede zwischen den Subgruppen feststellbar sind.

### 4.5.1 AL-Base-Datenbank

#### 4.5.1.1 Anzahl Spektren

In der *AL-Base*-Datenbank befanden sich insgesamt 120 Sequenzen von Patienten mit AL-Amyloidose (AL), 107 mit Multiplen Myelom (MM), 11 mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose-Beteiligung (MM/AL) sowie 508 Sequenzen, welche der gesunden Kontrollgrup-

pe zugeordnet werden konnten. Dabei entfielen bei den AL-Patienten 96 auf die  $\kappa$ -Subgruppe  $V_{\kappa}I$  ( $\kappa$ -Subgruppe Subtyp Variabel I), während bei den MM-Patienten 67, bei den MM/AL-Patienten 10 und bei der Kontrollgruppe 180 dem Subtypen  $V_{\kappa}I$  entsprachen. Da sich die Subtypen der  $\kappa$ -Leichtketten durch das Auftreten von typischen Aminosäuresequenzen im vorderen Bereich der variablen Region voneinander unterscheiden, wurden die Analysen nur mit  $\kappa$ -FLC-Sequenzen des Subtypen  $V_{\kappa}I$  durchgeführt. Dadurch soll vermieden werden, dass gefundene Unterschiede bei den relativen Häufigkeiten zwischen den Subgruppen MM, AL, MM/AL auf unterschiedliche Verteilungen der  $V_{\kappa}$ -Subtypen innerhalb der Subgruppen MM, AL bzw. MM/AL zurückzuführen sind.

Nach dem Entfernen von identischen Sequenzen reduzierte sich die verwertbare Anzahl auf 96 AL-, 65 MM-, 10 MM/AL- sowie auf 158 Sequenzen in der Kontrollgruppe. In der Tabelle 4.4 befindet sich eine Übersicht über die Anzahl der verfügbaren Sequenzen. Die MM- und MM/AL-Sequenzen der *AL-Base*-Datenbank wurden um die drei in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen ergänzt, sodass 68 MM-Sequenzen für die Varianzanalyse zur Verfügung standen. Da sich die Anzahl der MM/AL-Sequenzen auf 13 beschränkt, würden die folgenden statistischen Betrachtungen für diese Gruppe nur eine beschränkte Zuverlässigkeit haben, weshalb sie bei den weiteren Analysen nicht weiter beachtet werden. Da aber drei der in dieser Arbeit untersuchten Proben ebenfalls der MM/AL-Subgruppe zugeordnet werden können, erscheint eine vergleichende Analyse zwischen der MM- und MM/AL-Subgruppe als besonders interessant, sobald ausreichend MM/AL-Sequenzen zur Verfügung stehen.

#### 4.5.1.2 Auftreten des $V_{\kappa}I$ -Subtypen

Die Tabelle 4.4 demonstriert mit 85 % bis 91 % ein verhältnismäßig häufigeres Auftreten des  $V_{\kappa}I$ -Subtypen bei den krankhaften Subgruppen als die 35 % bei der Kontrollgruppe. Auf Grundlage der Sequenzen der *AL-Base*-Datenbank lässt dies bei den  $V_{\kappa}I$ -FLCs eine erhöhte Neigung zu krankhaften Veränderungen vermuten. Die in dieser Arbeit untersuchten FLCs bestätigen dieses Bild, da alle sechs Proben dem  $V_{\kappa}I$ -Subtypen angehören (siehe 4.2.4). Zur Verifizierung dieser Aussage könnten in zukünftigen Analysen weitere FLCs hinsichtlich ihrer Subgruppe untersucht werden. Zurzeit stehen allerdings nur die Sequenzen der *AL-Base*-Datenbank dafür zur Verfügung.

**Tabelle 4.4: Anzahl der Sequenzen für die Varianzanalyse.** Aufgeführt sind für die Subgruppen AL-Amyloidose (AL), Multiples Myelom (MM), Multiples Myelom mit AL-Amyloidose-Beteiligung (MM mit AL) sowie für die Kontrollgruppe (CG) die Anzahl der vorhandenen  $\kappa$ -Sequenzen aus der *AL-Base*-Datenbank, die Anzahl der Sequenzen vom  $V_{\kappa}I$ -Subtypen in der *AL-Base-Datenbank*, deren relativer Anteil an den Sequenzen sowie die Anzahl der Sequenzen, die nach dem Entfernen von identischen Sequenzen und dem Hinzufügen der in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen für die Varianzanalyse zur Verfügung standen.

Patienten-Subgruppe	<i>AL-Base</i>	Subtyp $V_{\kappa}I$	Anteil $V_{\kappa}I$	Analyse
AL-Amyloidose (AL)	120	96	80 %	96
Multiples Myelom (MM)	107	67	63 %	68
MM mit AL	11	10	91 %	13
Kontrollgruppe (CG)	508	180	35 %	158

#### 4.5.2 Multiples Sequenzalignment

Mit allen 322 FLC-Sequenzen ohne die MM/AL-Sequenzen wurde ein multiples Sequenzalignment mit den drei Programmen *ClustalW2*, *Clustal $\Omega$*  und *Muscle* durchgeführt. Die *Clustal*-Algorithmen führen das Sequenzalignment als globales Alignment aus, wobei *Clustal $\Omega$*  eine Weiterentwicklung von *ClustalW2* darstellt. Der *Muscle*-Algorithmus verwendet eine Kombination aus lokalem und globalem Alignment. Nach Angaben des Herstellers EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-The European Bioinformatics Institute) zeigt *Muscle* bei einer großen Anzahl an Sequenzen und bei sehr verschiedenen Sequenzen einen Vorteil bezüglich Schnelligkeit und Genauigkeit gegenüber den *Clustal*-Algorithmen. Da für diese Arbeit nur eine mittlere Anzahl an Sequenzen verwendet wurde und die genutzten Sequenzen alle FLC-Sequenzen darstellen und dadurch einander sehr ähnlich sind, erscheint keiner der verwendeten Algorithmen auf den ersten Blick den anderen überlegen. Zur Gewährleistung eines optimalen Alignment-Ergebnisses, wurde das Sequenzalignment parallel mit den drei Programmen durchgeführt.

Für die Bezeichnung der Aminosäurepositionen in der FLC-Sequenz wird bei allen nachfolgenden Betrachtungen das Kabat-Nummerierungssystem [117] verwendet, da Kabat als einer der ersten eine systematische Nummerierung von Aminosäurepositionen in Immunglobulinsequenzen einführte und sich viele Veröffentlichungen auf dieses System berufen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	30a	30b	30c	30d	30e	31	32	33	34	35	
<i>ClustalΩ</i> :	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	L	H	S	S	G	S	N	Y	L	N	W	
<i>Muscle</i> :	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	L	H	S	G	S	D	N	Y	L	N	W	
	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	63a	63b	63c	64	65	66	67	67a	67b	67c	68	69	
<i>ClustalΩ</i> :	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	T	G	N	G	S	G	S					G	T
<i>Muscle</i> :	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S					G	S	G	S	Y	D	H	G	T
	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	94a	95														
<i>ClustalΩ</i> :	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	Y	P															
<i>Muscle</i> :	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	Y	L	P														

**Abbildung 4.31: Häufigsten Aminosäuren nach dem ClustalΩ- bzw. Muscle-Sequenzalignment.** Nach dem multiplen Sequenzalignment wurde für jede Stelle in der Sequenz die häufigste Aminosäure ermittelt und in dieser Abbildung dargestellt. Die Ergebnisse des *ClustalΩ*- und *Muscle*-Alignments wurden gegenübergestellt und auftretende Unterschiede grau hervorgehoben. Die Nummerierung basiert auf dem Kabat-System. Die Lücken im Bereich der Aminosäuren 63a-c bzw. 67a-c basieren auf unterschiedlichen Alignment-Ergebnissen.

Allen drei Sequenzalignment-Programmen ist es gelungen, konservierte Bereiche in den Aminosäuresequenzen als homologe Bereiche zu erkennen und die Sequenzen entsprechend auszurichten. Allerdings zeigten sich bei dem Programm *ClustalW2* offensichtliche Fehler im Alignment. So wurde unter anderen bei sieben Sequenzen ein Tyrosin an der Stelle 32 als Insertion gewertet, obwohl die manuelle Überprüfung eindeutig eine Substitution erkennen lässt. Da solche Fehler bei den Programmen *ClustalΩ* und *Muscle* nicht erkennbar waren, wurde auf die weitere Verwendung der *ClustalW2*-Alignment-Ergebnisse verzichtet und die anschließenden Analysen ausschließlich mit den Ergebnissen der Programme *ClustalΩ* und *Muscle* durchgeführt.

### 4.5.3 Häufigste Aminosäuren

Mit den Alignment-Ergebnissen der beiden Programme *ClustalΩ* und *Muscle* wurde für jede Stelle im FLC-Peptid die am häufigsten vorkommende Aminosäure bestimmt und die Sequenzen aus den häufigsten Aminosäuren in der Abbildung 4.31 gegenübergestellt. Für die Nummerierung der Stellen im Peptid wurde das in diesem Bereich übliche Kabat-Nummerierungssystem [117] verwendet. Unterschiede zwischen den beiden Sequenzen wurden grau hervorgehoben.

Bei dem *ClustalΩ*-Alignment sind Insertionen an den Stellen zwischen den Aminosäuren 30 und 31 sowie an der Stelle 63, markiert durch die Zusätze a, b und c bzw. a, b, c, d und e aufgetreten. Bei dem *Muscle*-Alignment sind ebenfalls Insertionen im Bereich von 30 bis 31 vorhanden. Die zweite Insertion wurde allerdings im Bereich der Aminosäure 67 gefunden. Der Unterschied lässt sich auf ein nicht eindeutiges Alignment im Bereich 63 bis 67 zurückführen. Bei diesem Bereich handelt es sich um eine Serin-reiche Region, in der eine Insertion vorhanden ist. Die vielen Serine erschweren ein eindeutiges Alignment, sodass *ClustalΩ* die Insertion an der Stelle 63 gesehen hat, während *Muscle* die Insertion an der Stelle 67 postuliert. Aufgrund dieses uneindeutigen Alignments würden Unterschiede bei den relativen Häufigkeiten in diesem Bereich der Sequenz als weniger zuverlässig eingestuft werden. Zusätzlich konnte beim *Muscle*-Alignment an der Stelle 94 eine weitere Insertion identifiziert werden. Dieses zusätzliche Lysin trat allerdings nur in einer Sequenz der Kontrollgruppe auf, sodass diese Stelle bei der Identifizierung von *Hot Spots* keine Rolle spielt. Bei den restlichen Regionen der Sequenz kam es zu keinen Unterschieden zwischen den Alignments.

#### 4.5.4 Relative Häufigkeiten der Aminosäuren

**Entwickeln der Formel** Die Variabilität von Aminosäuresequenzen kann unter anderen mit Hilfe des *Wu-Kabat*-Variabilitätskoeffizienten beschrieben werden [118,119]. Dieser ermöglicht die Variabilität in Form der Abweichung von einer vorgegebenen Sequenz zu berechnen. Die Berechnung des *Wu-Kabat*-Variabilitätskoeffizienten  $W$  erfolgte nach der Formel 4.1, wobei  $N$  die Anzahl der verwendeten Sequenzen,  $k$  die Anzahl an möglichen unterschiedlichen Aminosäuren und  $n$  die Anzahl der Sequenzen mit der häufigsten Aminosäure darstellen.

$$W = \frac{Nk}{n} \quad (4.1)$$

Basierend auf dem *Wu-Kabat*-Variabilitätskoeffizienten wurden die relativen Häufigkeiten  $P$  nach der Formel 4.2 berechnet, wobei  $n$  der Anzahl der Sequenzen mit der häufigsten Aminosäure und  $N^*$  der Anzahl der Sequenzen mit einer Aminosäure an dieser Stelle entsprechen.

$$P = \frac{n}{N^*} \quad (4.2)$$

Gegenüber dem *Wu-Kabat*-Variabilitätskoeffizienten  $W$  weist die Formel zur Berechnung der relativen Häufigkeiten drei Veränderungen auf. Zum einen wurde auf die Verwendung von  $k$  verzichtet, da nur Aminosäuresequenzen miteinander verglichen wurden, die stets 20 unterschiedliche Aminosäuren aufweisen können. Die Verwendung von  $k$  führt daher zu keiner höheren Aussagekraft der berechneten Werte, weshalb darauf verzichtet wurde. Zum zweiten wurde das Verhältnis aus  $n$  und  $N$  umgekehrt. Dies gewährleistet eine bessere Interpretierbarkeit der berechneten Werte, da man anhand den relativen Häufigkeiten leicht erkennen kann, welcher Anteil der Sequenzen die häufigste Aminosäure aufwies. Des Weiteren wurde  $N$  durch  $N^*$  ersetzt. Während der *Wu-Kabat*-Variabilitätskoeffizient  $W$  die Gesamtanzahl der Sequenzen berücksichtigt, wurde bei der Berechnung der relativen Häufigkeiten nur die Anzahl der Sequenzen verwendet, die an dieser Stelle tatsächlich eine Aminosäure aufweisen. Dies berücksichtigt das Auftreten von Insertionen bzw. Lücken in den verwendeten Sequenzen, bei denen nur bei wenigen Sequenzen an dieser Stelle eine Aminosäure zu finden ist. Der *Wu-Kabat*-Variabilitätskoeffizient würde für diese Stellen eine hohe Variabilität bescheinigen, auch wenn an diesen Stellen stets die gleiche Aminosäure auftritt. Die Bestimmung der relativen Häufigkeiten hingegen ermöglicht die Bewertung der Variabilität auch an Stellen, bei denen nur wenige Sequenzen, z. B. aufgrund einer Insertion, eine Aminosäure aufweisen.

**Vergleich der relativen Häufigkeiten** Die berechneten relativen Häufigkeiten zum Auftreten der häufigsten Aminosäure für die Subgruppen Multiples Myelom (MM), AL-Amyloidose (AL) sowie der Kontrollgruppe (CG) wurden einander gegenübergestellt und sind in der Abbildung 4.32 für das *ClustalΩ*-Alignment dargestellt. Dabei wurden die Berechnungen sowohl mit dem *ClustalΩ*- als auch den *Muscle*-Sequenzalignments durchgeführt. Der Vergleich der relativen Häufigkeiten innerhalb der Subgruppen zeigte sowohl bei den Ergebnissen des *ClustalΩ*- als auch den *Muscle*-Sequenzalignments mehr als zehn Stellen in der Sequenz, bei denen sich die Werte der Subgruppen MM oder AL um mehr als 30 %-Punkte von den Werten der Kontrollgruppe unterschieden. Nach dem Entfernen der Stellen, an denen weniger als 20 Sequenzen vorlagen, verblieben vier interessante Stellen, die sowohl bei dem *ClustalΩ*- als auch dem *Muscle*-Sequenzalignments zu finden waren. Es zeigte sich, dass auftretende Unterschiede in den relativen Häufigkeiten zwischen dem *ClustalΩ*- und *Muscle*-Sequenzalignment an Stellen mit Insertionen gefunden werden konnten. Da Inser-

tionen immer nur bei einer geringen Anzahl von Sequenzen auftreten, ist ein eindeutiges Alignment meist nicht möglich. Außerhalb der Insertionsbereiche zeigten die beiden Alignments die gleichen Ergebnisse, weshalb in den folgenden Auswertungen nicht weiter zwischen den Alignments unterschieden wird und die berechneten Werte des *Clustal* $\Omega$ -Sequenzalignments aufgeführt sind. Die berechneten relativen Häufigkeiten für das *Muscle*-Sequenzalignment sind im Anhang in der Abbildung A.43 zu finden.

Die vier interessantesten Unterschiede in den relativen Häufigkeiten zwischen der Kontrollgruppe und den Subgruppen AL-Amyloidose bzw. Multiples Myelom zeigten sich an den Stellen 24, 56, 73 und 83 (Kabat-Nummerierungssystem) in der FLC-Sequenz. Für diese Stellen wurden die relativen Häufigkeiten der häufigsten Aminosäure in der Tabelle 4.5 aufgeführt. Die Werte für die Kontrollgruppe könnten eine begrenzte Zuverlässigkeit aufweisen, da diese anhand von nur 158 Sequenzen ermittelt wurden. Zur Erhöhung der Zuverlässigkeit wurden die berechneten Werte mit tabellierten Werten verglichen, die auf einer wesentlich größeren Stichprobe basieren. Dazu wurden die Häufigkeitsverteilungen des *abYsis*-Webservers<sup>4</sup> verwendet. Mit diesem Webserver können Datenbankanalysen mit Gen- und Proteinsequenzen von Immunglobulinen durchgeführt werden. Zusätzlich werden Häufigkeitsverteilungen angegeben, bei denen für jede Stelle im FLC-Peptid die Häufigkeit aller möglichen Aminosäuren über die Sequenzen aus den Datenbanken Kabat, *IMGT*, *PDB* und *abYsis-EMBL-IG* gemittelt und aufgeführt sind, weshalb die angegebenen Häufigkeitsverteilungen eine hohe Zuverlässigkeit aufweisen sollten. Die *PDB*-Datenbank stellt eine umfassende Proteindatenbank dar, während die anderen drei Sequenzdatenbanken von Immunglobulinen sind, sodass eine Vielzahl von Immunglobulinsequenzen für die Bestimmung von zuverlässigen Häufigkeitsverteilungen der Aminosäuren zur Verfügung standen. Die verwendeten Werte beziehen sich auf den Stand der Datenbanken vom Juli 2013. Der Vergleich mit den in dieser Arbeit berechneten Werte zeigte eine Übereinstimmung bei den Stellen 56 und 73, während bei den Stellen 24 und 83 Unterschiede von mehr als 10 % auftraten. Die Abweichungen bei den Stellen 24 und 83 könnten auf die unterschiedliche Anzahl der Sequenzen aus der *AL-Base*-Datenbank und den Sequenzen aus den Datenbanken Kabat, *IMGT*, *PDB* und

---

<sup>4</sup>Dr. Andrew C.R. Martin, University College London: <http://www.bioinf.org.uk/abysis/searches/distributions/distributions.html>

		FR1																				CDR1									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Kabat-N.:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CG:		88	92	87	90	95	97	100	100	97	66	89	98	99	99	92	100	96	98	99	97	97	89	98	87	91	95	95	42	94	0
MM:		97	97	92	98	98	100	98	100	98	75	92	92	93	95	89	100	98	85	96	96	94	93	100	62	93	96	94	36	88	100
AL:		99	97	87	93	98	100	99	100	96	89	95	98	95	99	95	99	94	88	94	86	97	92	100	54	99	95	93	20	92	0

		CDR1										FR2										CDR2					FR3				
		30a	30b	30c	30d	30e	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
Kabat-N.:		30a	30b	30c	30d	30e	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
CG:		H	S	S	G	S	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q
MM:		0	0	0	0	72	30	57	97	36	99	88	97	95	93	97	97	91	91	99	83	82	99	97	91	50	95	97	47	99	61
AL:		50	100	50	100	41	26	49	91	57	100	94	96	96	82	94	94	82	97	100	78	72	97	91	87	28	91	93	39	99	33

		FR3																													
		56	57	58	59	60	61	62	63	63a	63b	63c	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
Kabat-N.:		56	57	58	59	60	61	62	63	63a	63b	63c	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
CG:		S	G	V	P	S	R	F	S	T	G	N	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D
MM:		82	99	99	98	96	96	99	97	100	100	100	99	95	98	97	97	99	54	97	97	91	96	97	91	89	98	97	92	71	100
AL:		49	100	97	97	93	99	100	88	0	0	0	96	87	94	97	99	96	74	96	91	60	93	96	82	84	97	94	89	81	100

		FR3										CDR3				
		83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95		
Kabat-N.:		83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95		
CG:		F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	Y	P		
MM:		86	96	97	99	94	98	92	89	49	39	64	43	75		
AL:		59	94	92	98	95	100	89	86	57	17	45	14	85		

**Abbildung 4.32: Relative Häufigkeiten der häufigsten Aminosäure nach dem ClustalΩ-Alignment.** Aufgeführt sind die relativen Häufigkeiten in % für das Auftreten der häufigsten Aminosäure in der Kontrollgruppe (CG) sowie in den Subgruppen Multiples Myelom (MM) und AL-Amyloidose (AL). Die Nummerierung der Aminosäureposition in der FLC-Sequenz erfolgte nach dem Kabat-Nummerierungssystem. Hervorgehoben wurden die Stellen, bei denen zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Subgruppen eine Differenz von >30 %-Punkte auftraten. Die heller-markierten Bereiche zeichnen sich durch Insertionen aus, bei denen die Unterschiede nicht auf zuverlässige Ergebnisse hindeuten. Zusätzlich wurden die Bereiche der *Framework Regions* (FR) und der *Complementarity Determining Regions* (CDR) markiert.

**Tabelle 4.5: Relative Häufigkeiten der häufigsten Aminosäuren.** Für die Stellen 24, 56, 73, 83 (Kabat-Nummerierung) wurden die Häufigkeiten angegeben, mit denen die häufigste Aminosäure bei der Kontrollgruppe sowie bei den Subgruppen Multiples Myelom und AL-Amyloidose aufgetreten ist. Die häufigste Aminosäure für jede Stelle ist in der 2. Spalte vermerkt. Zusätzlich ist die Häufigkeit der angegebenen Aminosäure aus der abYsis-Datenbank aufgeführt, welche eine Übersicht über die Häufigkeitsverteilungen der unterschiedlichen Aminosäuren für jede Stelle in der FLC-Sequenz beinhaltet.

Position	Aminosäure	Kontrollgruppe	Mult. Myelom	AL-Amyloidose	abYsis
24	R	87 %	62 %	54 %	47 %
56	S	82 %	49 %	44 %	73 %
73	L	91 %	60 %	60 %	97 %
83	F	86 %	59 %	55 %	39 %

*abYsis-EMBL-IG* zurückzuführen sein. So ist es möglich, dass die kleinere Anzahl an Sequenzen aus der *AL-Base*-Datenbank nicht die wahre Verteilung der Aminosäuren bei gesunden Kontrollprobanden abbildet. Genauso ist es aber möglich, dass die großen Datenbanken vorwiegend aus Sequenzen von Personen mit monoklonalen Gammopathien stammen und nicht die Verteilung von gesunden Kontrollprobanden abbilden. Bei Patienten-Gruppen mit monoklonalen Gammopathien kommt es zu einer Überproduktion von einzelnen Antikörpern, die dann hochkonzentriert im Probenmaterial vorliegen. Dadurch können sie leichter isoliert und analysiert werden, wodurch sie wahrscheinlich häufiger in den Datenbanken auftauchen. Zusätzlich stellen pathogene Sequenzen wahrscheinlich eher das Ziel einer Untersuchung dar, weshalb sie häufiger in den Datenbanken auftreten könnten. Da in den großen Datenbanken jedoch durchgehende Informationen über den genauen Gesundheitszustand des Probengebers fehlen, können die Ursachen für die Abweichungen nicht eindeutig erklärt werden. Aufgrund der Übereinstimmung der Werte bei den Stellen 56 und 73 werden diese beiden Stellen als besonders zuverlässig angesehen.

Der  $\chi^2$ -Test bestätigte dabei signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der MM-Gruppe sowie zwischen der Kontrollgruppe und der AL-Gruppe für die Stellen 56 und 73 mit  $\alpha < 0.1$  %. Zwischen der MM- und AL-Gruppe waren die Unterschiede nicht signifikant.

An der Stelle 56 war die häufigste Aminosäure ein Serin, das am häufigsten durch Threonin ersetzt wurde. Dies geschah mit 39 % signifikant ( $\alpha < 0.1$  %) häufiger bei der AL-Subgruppe als bei der Kontrollgruppe mit 10 %. Zwischen der MM-Gruppe mit 24 % und der Kontrollgruppe konnte nur ein signifikanter Unterschied mit  $\alpha < 1$  % nachgewiesen werden. Bei den Aminosäuren Serin und Threonin handelt es sich jeweils um eine polare Aminosäure mit einer Hydroxygruppe, die sich nur durch eine Methylgruppe voneinander unterscheiden. Da beide Aminosäuren der gleichen Gruppe zugeordnet werden können, werden nur geringe Unterschiede bei dem Einfluss der Aminosäuren auf die Ausprägung der Sekundärstruktur erwartet. Auf der anderen Seite handelt es sich bei dem Threonin durch die zusätzliche Methylgruppe um eine größere Aminosäure als das Serin, sodass eine veränderte Sekundärstruktur auftreten kann, die die Stabilität der FLC beeinflussen könnte.

Darüber hinaus zeigte sich, dass das Serin in der Kontrollgruppe bei 1 % der Sequenzen durch unpolare Aminosäure ersetzt wurde, während dies bei der AL-Gruppe in 7 % bzw. in der MM-Gruppe in 15 % geschah. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der MM-Gruppe waren dabei signifikant ( $\alpha < 0.1$  %), während zwischen den anderen Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Die Substitution einer polaren Aminosäure durch eine unpolare kann zu einer veränderten Sekundärstruktur des Proteins führen, da aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe weniger Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können.

An der Stelle 73 wurde die Aminosäure Leucin hauptsächlich durch die Aminosäure Phenylalanin ersetzt. Bei beiden Aminosäuren handelt es sich um unpolare Aminosäuren, die sich durch eine Phenylgruppe voneinander unterscheiden. Durch die Substitution kommt es zu keiner Ladungsänderung des Proteins. Allerdings kann auch der zusätzliche Platzbedarf der Phenylgruppe die Sekundärstruktur des Proteins verändern und somit die Stabilität des Proteins beeinflussen. Bereits Sanchez *et al.* [120] postulierten, dass die Substitution durch eine hydrophobere Aminosäure die Neigung zur Aggregation erhöht. Die Substitution erfolgte mit 39 % in der AL-Gruppe bzw. 37 % in der MM-Gruppe signifikant ( $\alpha < 0.1$  %) häufiger als in der Kontrollgruppe mit 9 %.

		FR1																														CDR1					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
Kabat-N.:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	L							
CG:	88	92	87	90	95	97	100	100	97	66	89	98	99	99	92	100	96	98	99	97	97	89	98	87	91	95	95	42	94	0							
MM:	97	97	92	98	98	100	98	100	98	75	92	92	93	95	89	100	98	85	96	94	93	100	62	93	96	94	36	88	100								
AL:	99	97	87	93	98	100	99	100	96	89	95	98	95	99	95	99	94	88	94	86	97	92	100	54	99	95	93	20	92	0							
		CDR1																														CDR2			FR3		
Kabat-N.:	30a	30b	30c	30d	30e	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55							
	H	S	S	G	S	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q							
CG:	0	0	0	0	72	30	57	97	36	99	88	97	95	93	97	97	91	91	99	83	82	99	97	91	50	95	97	47	99	61							
MM:	50	100	50	100	41	26	49	91	57	100	94	96	96	82	94	94	82	97	100	78	72	97	91	87	28	91	93	39	99	33							
AL:	100	100	100	100	52	57	56	95	55	100	79	98	96	85	85	95	80	96	100	81	66	95	97	90	26	91	93	25	94	45							
		FR2																														FR3					
Kabat-N.:	56	57	58	59	60	61	62	63	63a	63b	63c	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82							
	S	G	V	P	S	R	F	S	T	G	N	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D							
CG:	82	99	99	98	96	96	99	97	100	100	100	99	95	98	97	97	99	54	97	97	91	96	97	91	89	98	97	92	71	100							
MM:	49	100	97	97	93	99	100	88	0	0	0	96	87	94	97	99	96	74	96	91	60	93	96	82	84	97	94	89	81	100							
AL:	44	97	98	89	92	75	100	96	0	0	0	100	87	94	95	97	97	52	95	85	60	95	100	84	83	97	96	88	83	98							
		FR3																														FR3					
Kabat-N.:	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95																								
	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	Y	P																								
CG:	86	96	97	99	94	98	92	89	49	39	64	43	75																								
MM:	59	94	92	98	95	100	89	86	57	17	45	14	85																								
AL:	55	93	94	97	91	98	97	93	76	23	35	22	90																								
		FR3																														CDR3					

**Abbildung 4.33: Relative Häufigkeiten der häufigsten Aminosäure nach dem ClustalΩ-Alignment.** Aufgeführt sind die relativen Häufigkeiten in % für das Auftreten der häufigsten Aminosäure in der Kontrollgruppe (CG) sowie in den Subgruppen Multiples Myelom (MM) und AL-Amyloidose (AL). Die Nummerierung der Aminosäureposition in der FLC-Sequenz erfolgte nach dem Kabat-Nummerierungssystem. Hervorgehoben wurden die Stellen, bei denen zwischen der Subgruppe Multiples Myelom und AL-Amyloidose eine Differenz von >20 %-Punkte auftraten. Zusätzlich wurden die Bereiche der *Framwork Regions* (FR) und der *Complementarity Determining Regions* (CDR) markiert.

Sowohl die Stelle 56 als auch 73 befinden sich in der Gerüstregion (*Framework Region*) FR3. Gerüstregionen zeichnen sich normalerweise durch eine geringe Variabilität der Aminosäuren aus. Die Vielfalt eines Antikörpers wird eher durch eine große Variabilität in den komplementaritätsbestimmenden Regionen (*Complementarity Determining Region*) CDRs erzeugt, während relativ konstante Gerüstregionen für stabile Proteine verantwortlich sind. Eine Mutation in den Gerüstregionen hat deshalb wahrscheinlich einen größeren Einfluss auf die Stabilität und damit auf die Ausbildung von amyloidogenen Strukturen als Mutationen in den CDR-Regionen. Diese Überlegung wird auch von Dwulet *et al.* [121] und Poshusta *et al.* [122] bestätigt. Inwiefern die beobachteten Substitutionen tatsächlich einen Einfluss auf die Struktur der FLC haben und inwiefern sie sich als Diagnosewerkzeug eignen, müssen weiterführende Studien klären.

**Vergleich zwischen den Subgruppen Multiples Myelom und AL-Amyloidose** Zwischen den Subgruppen MM und AL sind die Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der häufigsten Aminosäure weniger deutlich ausgeprägt, als zwischen der Kontrollgruppe und der MM- bzw. der AL-Gruppe. So konnte nur die Stelle 31 identifiziert werden, an der der Unterschied in den relativen Häufigkeiten größer als 30 %-Punkte waren. Allerdings zeigten sich an den Stellen 61, 70 und 91 Unterschiede in den relativen Häufigkeiten von mehr als 20 %-Punkten zwischen der MM- und der AL-Gruppe. Diese Unterschiede sind in den Abbildungen 4.33 für das *Clustal*Ω- und im Anhang in der Abbildung A.44 für das *Muscle*-Alignment hervorgerufen. Der  $\chi^2$ -Test bestätigte jedoch nur für die Stellen 31 und 61 signifikante Unterschiede mit einem  $\alpha < 0,1$  %, während an den Stellen 70 und 91 nur der kritische  $\chi^2$ -Wert mit einem  $\alpha < 1$  % bzw.  $\alpha < 5$  % überschritten wurde. Da in dieser Varianzanalyse mehr als 100 Stellen im FLC auf signifikante Unterschiede in den relativen Häufigkeiten untersucht wurden, erscheinen nur Unterschiede mit einem  $\alpha < 0,1$  % als zuverlässig. Bereits bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % wird bei 100 Stellen ein fälschlich erkannter Unterschied erwartet. Um dieses möglichst auszuschließen, werden nur Stellen für die weiteren Analysen verwendet, bei denen signifikante Unterschiede mit einem  $\alpha < 0,1$  % vorkamen.

Die Stelle 31 wies bei 57 % der AL-Patienten ein Asparagin auf, während dies nur bei 26 % der MM-Patienten der Fall war. Ein Asparagin an dieser Stelle scheint daher die Produktion

**Tabelle 4.6: Aminosäureverteilung an den Stellen 31, 56, 61 und 73.** Für die durch die Varianzanalyse identifizierten Stellen 31, 56, 61 und 73 in der FLC wurden die absolute und relative Anzahl der vorkommenden Aminosäuren aufgeführt.

Stelle	Aminosäure	Eigenschaft	Multiples Myelom		AL-Amyloidose		Kontrollgruppe	
			Häufigkeit (absolut)	Häufigkeit (relativ)	Häufigkeit (absolut)	Häufigkeit (relativ)	Häufigkeit (absolut)	Häufigkeit (relativ)
31	Asparagin (N)	polar/neutral	18	26 %	54	57 %	-	-
	Glycin (G)	polar/neutral	5	7 %	-	-	-	-
	Threonin (T)	polar/neutral	6	9 %	10	11 %	-	-
	Histidin (H)	basisch	3	4 %	-	-	-	-
	Serin (S)	polar/neutral	20	29 %	8	8 %	-	-
	Asparaginsäure (D)	sauer	6	9 %	8	8 %	-	-
	Tyrosin (Y)	polar/neutral	1	2 %	2	2 %	-	-
	Arginin (R)	basisch	1	2 %	2	2 %	-	-
	Lysin (K)	basisch	6	9 %	4	4 %	-	-
	Isoleucin (I)	unpolar/hydrophob	2	3 %	5	5 %	-	-
	Glutaminsäure (E)	sauer	-	-	1	1 %	-	-
	Alanin (A)	unpolar/hydrophob	-	-	1	1 %	-	-
56	Serin (S)	polar/neutral	33	49 %	42	44 %	125	82 %
	Asparaginsäure (D)	sauer	-	-	-	-	2	1 %
	Arginin (R)	basisch	2	3 %	2	2 %	2	1 %
	Isoleucin (I)	unpolar/hydrophob	4	6 %	3	3 %	1	1 %
	Threonin (T)	polar/neutral	16	24 %	37	39 %	15	10 %

	Cystein (C)	polar/neutral	-	-	-	-	1	1	1 %
	Methionin (M)	unpolar/hydrophob	-	-	-	-	1	1	1 %
	Asparagin (N)	polar/neutral	2	3 %	2	2 %	1	1	1 %
	Glycin (G)	polar/neutral	3	4 %	3	3 %	5	5	3 %
	Alanin (A)	unpolar/hydrophob	5	7 %	3	3 %	-	-	-
	Prolin (P)	unpolar/hydrophob	1	2 %	1	1 %	-	-	-
	Lysin (K)	basisch	1	2 %	2	2 %	-	-	-
61	Arginin (R)	basisch	66	99 %	72	75 %	-	-	-
	Methionin (M)	unpolar/hydrophob	1	1 %	-	-	-	-	-
	Asparagin (N)	polar/neutral	-	-	12	13 %	-	-	-
	Histidin (H)	basisch	-	-	1	1 %	-	-	-
	Lysin (K)	basisch	-	-	6	6 %	-	-	-
	Serin (S)	polar/neutral	-	-	1	1 %	-	-	-
	Isoleucin (I)	unpolar/hydrophob	-	-	1	1 %	-	-	-
	Threonin (T)	polar/neutral	-	-	3	3 %	-	-	-
73	Leucin (L)	unpolar/hydrophob	40	60 %	58	60 %	144	144	91 %
	Phenylalanin (F)	unpolar/hydrophob	25	37 %	37	39 %	14	14	9 %
	Valin (V)	unpolar/hydrophob	-	-	1	1 %	-	-	-
	Isoleucin (I)	unpolar/hydrophob	-	-	-	-	-	-	-
	Serin (S)	polar/neutral	1	2 %	-	-	-	-	-
	Histidin (H)	basisch	1	2 %	-	-	-	-	-

von amyloiden Ablagerungen zu begünstigen. Die genaue Analyse der alternativen Aminosäuren konnte allerdings keine unterschiedlichen Tendenzen zwischen den Gruppen feststellen.

An der Stelle 61 trat bei der MM-Gruppe mit 99 % nahezu immer ein Arginin auf, welches nur einmal durch ein Methionin substituiert wurde. Im Gegensatz dazu kam bei der AL-Gruppe bei 75 % der Probanden ein Arginin vor, das am häufigsten durch ein Asparagin ersetzt wurde (13 %). In der AL-Gruppe wurde das Arginin in 7 % durch eine basische Aminosäure und sogar in 17 % durch eine Aminosäure aus der Gruppe polar/neutrale Aminosäure ersetzt. Das Arginin stellt eine basische Aminosäure dar, die Salzbrücken zu anderen Aminosäuren aufbauen kann, wodurch die Sekundärstruktur eines Proteins beeinflusst wird. Die Substitution durch die zwitterionige eher hydrophile Aminosäure Asparagin verändert die Interaktion mit anderen Aminosäureresten, sodass eine veränderte Sekundärstruktur auftreten kann, die weniger stabil ist und daher eher zu Proteinaggregation neigt.

**Vergleich mit anderen Forschungsgruppen** Der Versuch, amyloidogene Strukturen anhand der Primärstruktur vorherzusagen, wird unabhängig von der AL-Amyloidose neben dem statistischen Vergleich der auftretenden Aminosäuren auf zwei weitere Arten durchgeführt. Einige Arbeitsgruppen nutzen dabei die Tatsache, dass amyloidogene Strukturen meist aus  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen bestehen. So versuchten z. B. Yoon/Welsh [123] die Neigung von  $\alpha$ -Strukturen zur Bildung von  $\beta$ -Strukturen zu berechnen und daraus abzuleiten, welche Peptidsequenzen eine Tendenz zur Aggregation zeigen. Hamodrakas *et al.* [124] identifizierten mit Hilfe von Vorhersageprogrammen Peptidsequenzen, die sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Sekundärstrukturen ausbilden können. Diese Bereiche sahen sie als prädestiniert für die Ausbildung von amyloidenen Strukturen an. Im Gegensatz dazu berechneten Thompson [125] und Zhang [126] anhand der Primärstruktur, welche Regionen stabile  $\beta$ -Strukturen aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen ausbauen können. Das Auftreten von stabilen Wasserstoffbrückenbindungen wurde als deutlicher Hinweis für amyloidogene Strukturen gewertet.

Andere Gruppen versuchten auf die Tendenz zur Ausbildung von amyloidenen Strukturen zu schlussfolgern anhand der Aminosäureeigenschaften, wobei zwei Vorgehensweisen

beobachtet werden können. Bei einer Herangehensweise wird die Neigung zur Aggregation anhand eines Kriteriums festgemacht. So beschrieb Galzitskaya [127, 128] die durchschnittlich zu erwartende Packungsdichte einer Aminosäure als Indikator für die Ausprägung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen. Da der Aggregation von Proteinen jedoch meist komplexere Ursachen zu Grunde liegen, erscheint ein multivektorieller Ansatz, bei dem mehrere Variablen in die Bestimmung der Neigung zur Aggregation herangezogen werden, vielversprechender. So berücksichtigten Pawar *et al.* [129] und Tartaglia *et al.* [130] neben intrinsischen Variablen wie der Hydrophobizität der Aminosäuren auch Umgebungsvariablen bei der Kalkulation zur Vorhersage der Proteinaggregation. Ein weiteres Beispiel für die Verwendung mehrerer Variablen stellt die Arbeit von Garbuzynskiy *et al.* [131] dar, bei der die Berechnung der Neigung zur Amyloidogenität die erwartete Packungsdichte der Aminosäurereste und die erwartete Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit einbeziehen.

Eine andere Herangehensweise zur Identifizierung von Tendenzen zu amyloidogenen Strukturen stellt die Analyse der Peptidsequenz und der Vergleich der vorkommenden Aminosäuren von Patienten mit AL-Amyloidose im Vergleich zu einer Bezugsgruppe dar, wie es auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde. So verglich unter anderen Stevens *et al.* [25, 26] in zwei Studien Sequenzen von AL-Amyloidose-Patienten mit Patienten, die an einer anderen humanen Plasmazell Dyskrasie erkrankt sind bzw. mit Multiplen-Myelom-Patienten. Dabei ist es ihm nicht gelungen, die Konsensusregion zu identifizieren, die spezifisch eine Amyloidose hervorruft. Allerdings konnte er vier Risikofaktoren für eine Amyloidose erkennen. Es konnte durch den Vergleich der vorkommenden Aminosäuren gezeigt werden, dass die Substitution des hochkonservierten Arginins an der Stelle 61 durch eine andere Aminosäure die Wahrscheinlichkeit zur Fibrillenbildung deutlich erhöht. Stevens *et al.* führten dies auf einen Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung einer Salzbrücke zur Aminosäure 81 zurück, wodurch es zu einer Destabilisierung des FLC-Proteins kommt. Diese Hypothese kann durch die in dieser Arbeit berechneten Werte unterstützt werden. So traten bei 96 % der Patienten aus der Kontrollgruppe bzw. 99 % der MM-Patienten ein Arginin an dieser Stelle auf, wohingegen dies nur bei 75 % der AL-Amyloidose-Patienten beobachtet werden konnte. Der Unterschied zwischen der AL-Gruppe und den beiden anderen Subgruppen ist dabei signifikant, auch wenn

an den Stellen 56 bzw. 73 deutlichere Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den AL- bzw. der MM-Subgruppe feststellbar waren.

Hurle *et al.* [27, 28] konnten durch die Analyse von selten auftretenden Aminosäuren ebenfalls die Stelle 61 als kritisch identifizieren. Dazu wurden zunächst mit Hilfe der Kabat-Datenbank für jede Stelle im FLC-Peptid selten vorkommende Aminosäure ermittelt und in einem nachfolgenden Schritt 18  $\kappa$ -AL-Amyloidose-Sequenzen auf das Auftreten dieser seltenen Aminosäuren überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass bei AL-Amyloidose-Sequenzen eine Substitution des Arg61 und des Asp82 deutlich häufiger vorkommt, wodurch die These von Stevens *et al.* unterstützt wird, dass eine Salzbrücke zwischen diesen beiden Aminosäuren zur Stabilität des FLC-Proteins beiträgt.

Darüber hinaus postulierte Stevens *et al.* [26] eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit zur Fibrillenbildung, wenn es zu einer Substitution des Isoleucins an der Stelle 27b gekommen ist bzw. eine Asparaginsäure an der Stelle 31 vorhanden ist. Mit der Substitution des Isoleucins fehlt nach Stevens *et al.* eine relativ große hydrophobe Aminosäure, die im Inneren des Proteins eine stabile Verankerung des CDR1-*loops* und damit ein stabiles Protein gewährleistet hat. Die nach Stevens *et al.* kritische Stelle 27b in der Amyloidbildung kann allerdings anhand der in dieser Arbeit ermittelten Werte nicht unterstützt werden, da bei keiner der untersuchten Sequenzen eine Insertion nach der Aminosäure 27 aufgetreten ist, d. h. dass bei keiner der untersuchten Sequenzen die Aminosäure 27b vorhanden ist. Die Stelle 31 zeigte sich auch in dieser Arbeit als eine kritische Stelle, allerdings traten hier bei der AL-Subgruppe im Vergleich zur MM-Gruppe signifikant häufiger ein Asparagin auf, während Stevens *et al.* das signifikant häufigere Auftreten von der Asparaginsäure an dieser Stelle beschreibt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten sich die Stellen 31 und 61 als kritisch bei der Ausbildung von amyloidogenen Strukturen erwiesen haben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es an den Stelle 56 bzw. 73 deutliche Unterschiede in den FLC-Sequenzen zwischen gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit Multiplen Myelom bzw. AL-Amyloidose auftreten. Diese Stellen wurden bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die freien Antikörperleichtketten von jeweils drei Patienten mit Multiplen Myelom bzw. mit Multiplen Myelom und AL-Amyloidose auf das Auftreten von posttranslationalen Modifikationen mit der Hilfe von MS/MS-Spektren analysiert. Beide Patientengruppen zeichnen sich durch eine Überproduktion von monoklonalen Antikörperleichtketten aus, wobei diese bei Multiplen-Myelom-Patienten löslich und bei den AL-Amyloidose-Patienten unlöslich vorliegen. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Löslichkeit der Antikörperleichtketten könnte das Vorhandensein von posttranslationalen Modifikationen sein.

Zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Messungen wurden die FLCs aus den Knochenmarksüberständen der Patienten isoliert. Dafür wurde eine 2-Schritt-Aufarbeitungsmethode etabliert, bei der mit Hilfe einer Affinitätschromatographie und einer präparativen SDS-PAGE die FLCs aus einer komplexen Matrix isoliert werden konnten, bei der die FLCs nicht das Hauptprotein bilden. Dies stellt eine Weiterentwicklung der bekannten Verfahren dar, da es die Analyse von FLCs aus verschiedenen Probenmaterialien ermöglicht, während andere Gruppen die FLCs meist nur aus dem Urin der Patienten isolieren konnten, in dem die FLCs die Hauptkomponente waren.

In einem zweiten Schritt konnten die Aminosäuresequenzen aller sechs Patientenproben mittels einer FLC-spezifischen PCR ermittelt werden. Diese konnten zusätzlich mit Hilfe der massenspektrometrischen Messungen verifiziert werden, wobei sich eine Sequenzabdeckung zwischen 92 % und 100 % ergab.

Die Suche nach posttranslationalen Modifikationen ergab bei allen sechs Patienten unabhängig von dem Krankheitsbild eine Sulfonierung als PTM am Cystein C194, deren Identität und Lokalisation durch HCD- und ETD-Messungen bestätigt werden konnte. Dabei trat diese PTM bei verschiedenen Peptiden sowohl nach dem Trypsin- als auch dem Chymotrypsinverdau der Proben auf, wodurch eine hohe Zuverlässigkeit der Ergebnisse angenommen werden kann. Eine Sulfonierung an einem Cystein wurde ebenfalls durch Connors *et al.* [10] bei AL-Amyloidose-Patienten beschrieben. Diese Arbeitsgruppe identifizierte die PTM allerdings am Cystein C214, während in dieser Arbeit die Sulfonierung am Cystein C194 gefunden werden konnte. Darüber hinaus trat diese PTM auch bei den Multiplen-Myelom-Patienten auf. Dieser Sachverhalt ist bis jetzt noch nicht beschrieben worden.

Neben der Sulfonierung konnte eine Methylierung bei allen sechs Patienten am Cystein C194 erkannt werden, welche bei freien Leichtketten bisher noch nicht veröffentlicht wurde. Auch diese konnte bei mehreren Peptiden sowohl bei den Trypsin- als auch Chymotrypsinverdauten Proben gefunden werden, weshalb diese PTM ebenfalls als zuverlässig angesehen wird. Sowohl bei der Sulfonierung als auch bei der Methylierung konnte keine krankheitsspezifische Tendenz bezüglich der Identifikation oder Lokalisation der posttranslationalen Modifikationen erkannt werden. Zuverlässige Hinweise auf eine krankheitsspezifische Identifikation und Lokalisation wären auch nur bei einer höheren Anzahl an Proben zu erwarten.

Außerdem konnten bei den Patienten SP 1070, WS 1199 und GI 1206 eine GlcNAc-Glykosylierung im *N*-terminalen Bereich der variablen Region in den HCD-MS-Spektren identifiziert werden. Eine genaue Lokalisation der Glykosylierung konnte jedoch nicht erfolgen, da die PTM in der HCD-Fragmentierung abgespalten wurde. Passende ETD-Spektren mit der GlcNAc-Glykosylierung konnten nicht gefunden werden.

In einem weiteren Schritt wurden mittels Varianzanalyse Sequenzen von AL-Amyloidose- und Multiplen-Myelom-Patienten sowie von Kontrollprobanden hinsichtlich der Verteilung der Aminosäuren statistisch analysiert. Dafür wurden für jede Stelle in der FLC-Sequenz die häufigsten Aminosäuren bestimmt und für die drei Subgruppen die relativen Häufigkeiten des Auftretens der häufigsten Aminosäure ermittelt. Auf die Verwendung von Sequenzen

von Patienten mit Multiplen Myelom und gleichzeitiger AL-Amyloidose musste aufgrund von einer zu geringen Anzahl von verfügbaren Sequenzen verzichtet werden. Bei dem Vergleich der krankhaften Subgruppen Multiples Myelom bzw. AL-Amyloidose mit der Kontrollgruppe zeigten sich signifikante Unterschiede an den Stellen 56 und 73 in der FLC-Sequenz, bei denen die Aminosäuren Serin bzw. Leucin in der Kontrollgruppe signifikanter häufiger auftraten als in der Multiplen-Myelom- oder AL-Amyloidose-Subgruppe. Das Fehlen dieser Aminosäuren an diesen Stellen könnte bei noch nicht charakterisierten Patienten einen Hinweis auf eine Erkrankung geben. Allerdings müssen erst weiterführende Studien mit deutlich mehr Patienten die Eignung dieser beiden Stellen als Biomarker zeigen. Bei dem Vergleich der Multiplen-Myelom-Subgruppe mit den Sequenzen der AL-Amyloidose-Gruppe stachen die Stellen 31 und 61 hervor. An der Stelle 31 trat bei der AL-Amyloidose-Subgruppe signifikant häufiger die Aminosäure Asparagin auf, weshalb diese Aminosäure eine Aggregation der FLCs begünstigen könnte. Die Stelle 31 wurde auch von anderen Gruppen als kritisch bei der Akkumulation der FLCs beschrieben [25]. Allerdings förderte bei Stevens *et al.* [25] eine Asparaginsäure die Aggregation, während in dieser Arbeit vermehrt das Asparagin bei AL-Amyloidose-Sequenzen aufgetreten ist. Darüber hinaus konnte die Stelle 61 identifiziert werden, bei der bei Multiplen-Myelom-Patienten signifikant häufiger ein Arginin auftritt als bei AL-Amyloidose-Patienten, sodass das Fehlen des Arginins an dieser Stelle eine Akkumulation begünstigen könnte. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Arbeiten von Hurle *et al.* [27, 28], welcher das Fehlen einer Salzbrücke vom Arginin R61 zur Asparaginsäure D82 als mögliche Ursache für die Akkumulation aufführte.



## 6 Summary

This work analyzed posttranslational modifications of pathological free light chains (FLC) from patients who suffer from multiple myeloma or multiple myeloma and AL amyloidosis. Both patient groups show an overproduction of free light chains which are soluble in multiple myeloma patients and insoluble in AL amyloidosis patients. One reason for the different solubility of the free light chains may be the appearance of posttranslational modifications.

In order to identify posttranslational modifications FLCs from bone marrow supernatant were isolated and mass spectrometrically analyzed using Orbitrap technology. All measurements were done with three samples of each patient subgroup. For the FLC purification a 2-step method was established which isolates FLCs with affinity chromatography and preparative SDS-PAGE. This method enables the purification of the FLCs from a complex matrix where the FLCs may not be the main component.

Before mass spectrometric analyses the amino acid sequences of the FLCs were determined via PCR using FLC-specific primers. The subsequent mass spectrometric analyses verified between 92 % and 100 % of the amino acid sequences.

The analysis of posttranslational modifications identified for each patient a sulfonation at cysteine C194 whose identity and localization were verified with HCD and ETD fragmentation mass spectrometry technology. A similar cysteine sulfonation of FLCs was found by Connors *et al.* [10] who identified an identical PTM on cysteine C214 in FLCs from AL amyloidosis patients. However, a sulfonation on cysteine C194 and in FLCs from multiple myeloma patients was not published before.

Furthermore, a methylation of cysteine C194 was found for each sample. As for the sulfonation, no disease-specific appearance of methylation could be revealed. This may be a consequence of a limited number of available samples.

In addition, a GlcNAc-glycosylation in the *N*-terminus of the variable region was found for the patients SP 1070, WS 1199 and GI 1206. An exact localization of the PTM was not possible because of the loss of the PTM during HCD fragmentation and the lack of convenient ETD spectra.

Moreover FLC sequences were analyzed statistically for the distribution of amino acids. Therefore, a multiple sequence alignment with sequences from multiple myeloma and AL amyloidosis patients as with sequences from healthy control group individuals was done. Subsequently, for each position in FLC sequence the most frequent amino acids were determined and the frequencies of being the most frequent amino acid for each subgroup were calculated. As a result, positions 56 and 73 were identified where serine respectively leucine occur statistically significantly more often in the control group than in the multiple myeloma or the AL amyloidosis subgroup. The comparison of the frequencies of the multiple myeloma and AL amyloidosis subgroup revealed significant differences at the positions 31 and 61. At the position 31 in AL amyloidosis subgroup asparagine appears more often than in the multiple myeloma subgroup which may indicate that asparagine at this position enhances the bias to FLC accumulation. The position 31 was also described as influential by Stevens *et al.* [25], although in his studies an aspartic acid at this position increases the bias to aggregation.

At position 61 an arginine exists more often in the multiple myeloma than in the AL amyloidosis subgroup where the missing of an arginine at this position seems to enhance the tendency for FLC accumulation. This result is consistent with the findings by Hurler *et al.* [27,28] and may be a result of a missing salt bridge from arginine R61 to aspartic acid D82.

# 7 Abkürzungsverzeichnis

## 7.1 Allgemein

<b>Abb</b>	Abbildung
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AL</b>	<i>AL(Amyloid Light Chain)</i> -Amyloidose
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>aX</b>	Acetylierte Aminosäure
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Fötales Kälberserum
<b>CAD</b>	Kollisionsaktivierte Dissoziation
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i> , Komplementäre DNA
<b>CDR</b>	<i>Complementarity Determining Region</i> , Hypervariable Region
<b>ca.</b>	circa
<b>CG</b>	<i>Control Group</i> , Kontrollgruppe
<b>C<sub>H</sub></b>	Konstante Region der schweren Ig-Kette
<b>CI</b>	Chemische Ionisation
<b>CID</b>	Kollisionsinduzierte Dissoziation
<b>C<sub>L</sub></b>	Konstante Region der leichten Ig-Kette

<b>C-Segment</b>	<i>Constant</i> -Segment, Konstantes Segment
<b>cX</b>	Carbamidomethylierte Aminosäure
<b>Da</b>	Dalton
<b>DHB</b>	Dihydroxybenzoesäure
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>D-Segment</b>	<i>Diversity</i> -Segment, Segment für die Vielfalt der Antikörper
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>e</b>	Elementarladung
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Dissociation</i> , Elektroneneinfangdissoziation
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EI</b>	Elektronenstoßionisation
<b><math>E_{kin}</math></b>	Kinetische Energie
<b>ESI</b>	Elektrosprayionisation
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> , und andere
<b>ETD</b>	<i>Electron Transfer Dissociation</i> , Dissoziation durch Elektronenübertragung
<b>eV</b>	Elektronenvolt
<b>FAB</b>	<i>Fast Atom Bombardment</i>
<b>FLC</b>	<i>Free Light Chain</i> , Freie Immunglobulinketten
<b>FR</b>	<i>Framework Region</i> , Gerüstregion
<b>FT-ICR</b>	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer</i> , Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer
<b>°C</b>	Grad Celsius

---

<b>g</b>	Gramm
<b>GalNAc</b>	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -Acetylglucosamin
<b>HAT</b>	Histon-Acetyl-transferasen
<b>HCD</b>	<i>Higher-energy Collisional Dissociation</i> , Dissoziation durch hochenergetische Kollision
<b>HDAC</b>	Histon-Deacetylasen
<b>HexNAc</b>	<i>N</i> -Acetylhexosamin
<b>HVR</b>	<i>Hypervariable Region</i> , Hypervariable Region
<b>IAA</b>	Iodacetamid
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IT</b>	Ionenfalle
<b>J-Segment</b>	<i>Joining</i> -Segment, Verbindendes Segment
<b>KAT</b>	Lysin-Acetyltransferasen
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KDAC</b>	Lysin-Deacetylasen
<b>l</b>	Liter (Einheit) bzw. Länge (Formelzeichen)
<b>LCMS</b>	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> , Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
<b>L-Segment</b>	<i>Leader</i> -Segment, Anfangsegment
<b>m</b>	Meter (Einheit) bzw. Masse (Formelzeichen)
<b>M</b>	Molar (Einheit)

<b>MALDI</b>	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MGUS</b>	Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MM</b>	Multiplres Myelom
<b>MM/AL</b>	Multiplres Myelom mit AL-Amyloidose-Beteiligung
<b>MOPS</b>	Morpholino-Propansulfonsäure
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MSn</b>	Mehrstufige Massenspektrometrie, Tandemmassenspektrometrie
<b>MS/MS</b>	Tandemmassenspektrometrie
<b>mX</b>	Methylierte Aminosäure
<b>m/z</b>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
<b>NAT</b>	<i>N</i> -Acetyltransferase
<b>nm</b>	Nanometer
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<b>ppm</b>	<i>Parts Per Million</i> , 1 Teil von 1 Million
<b>PTM</b>	Posttranslationale Modifikation
<b>QToF</b>	<i>Quadrupol-Time of Flight</i> , Quadrupol in Kombination mit Flugzeitanalysator
<b>rf</b>	<i>Radio Frequency</i> , Radiofrequenz

---

<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	<i>Rounds Per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<b>SAP</b>	Serum Amyloid P-Komponente
<b>SAM</b>	S-Adenosylmethionin
<b>SCX</b>	<i>Strong Cation Exchange Chromatography</i> , Starke Kationenaustauschchromatographie
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>sX</b>	Sulfonierte Aminosäure
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA
<b>ToF</b>	<i>Time of Flight</i> , Flugzeitanalysator
<b>TQ</b>	Triple Quadrupol
<b>U</b>	Spannung
<b>u. a.</b>	unter anderem/anderen
<b>v</b>	Geschwindigkeit
<b>V<sub>H</sub></b>	Variable Region der schweren Ig-Kette
<b>V<sub>L</sub></b>	Variable Region der leichten Ig-Kette
<b>V-Segment</b>	Variables Segment
<b>z</b>	Ladung
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>ω</b>	Winkelgeschwindigkeit

## 7.2 Aminosäuren

<b>A</b>	Alanin (Ala)
<b>C</b>	Cystein (Cys)
<b>D</b>	Asparaginsäure (Asp)
<b>E</b>	Glutaminsäure (Glu)
<b>F</b>	Phenylalanin (Phen)
<b>G</b>	Glycin (Gly)
<b>H</b>	Histidin (His)
<b>I</b>	Isoleucin (Ile)
<b>K</b>	Lysin (Lys)
<b>L</b>	Leucin (Leu)
<b>M</b>	Methionin (Met)
<b>N</b>	Asparagin (Asn)
<b>P</b>	Prolin (Pro)
<b>Q</b>	Glutamin (Gln)
<b>R</b>	Arginin (Arg)
<b>S</b>	Serin (Ser)
<b>T</b>	Threonin (Thr)
<b>V</b>	Valin (Val)
<b>W</b>	Tryptophan (Trp)
<b>Y</b>	Tyrosin (Tyr)
<b>X</b>	als Platzhalter für Aminosäure

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Kyle, R. und Wheatley, K. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*, 121(5):749–757, 2003.
- [2] Axelsson, U.; Bachmann, R. und Hällén, J. Frequency of Pathological Proteins (M-components) in 6,995 Sera from an Adult Population. *Acta Medica Scandinavica*, 179(2):235–247, 1966.
- [3] Kyle, R. A.; Finkelstein, S.; Elveback, L. R. und Kurland, L. T. Incidence of monoclonal proteins in a Minnesota community with a cluster of multiple myeloma. *Blood*, 40(5):719–724, 1972.
- [4] Saleun, J.; Vicariot, M.; Deroff, P. und Morin, J. Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistere, France. *J Clin Pathol*, 35(1):63–68, 1982.
- [5] Blade, J.; Lopez-Guillermo, A.; Rozman, C.; Cervantes, F.; Salgado, C.; Aguilar, J. L.; Vives-Corrons, J. L. und Montserrat, E. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*, 81(3):391–4, 1992.
- [6] Kyle, R. A. und Greipp, P. R. Smoldering Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 302(24):1347–1349, 1980.
- [7] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V. Leitlinie für Multiples Myelom. <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/multiples-myelom>, September 2013.

- [8] Katalinic, A. und Pritzkeleit, R. Hochrechnung des Instituts für Krebs epidemiologie e.V., Lübeck für icd10: C90 auf Basis der Daten der Krebsregister BY, BR, HB, HH, MV, NI, NW (Reg.Bez. Münster) SL, SN, SH (2005-2009). <http://www.GEKID.de>, 2013.
- [9] Einsele, H.; Schäfer, H.-J.; Hebart, H.; Bader, P.; Meisner, C.; Plasswilm, L.; Liebisch, P.; Bamberg, M.; Faul, C. und Kanz, L. Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning. *Br J Haematol*, 121(3):411–418, 2003.
- [10] Connors, L.; Jiang, Y.; Budnik, M.; Théberge, R.; Prokaeva, T.; Bodi, K.; Seldin, D.; Costello, C. und Skinner, M. Heterogeneity in Primary Structure, Post-Translational Modifications, and Germline Gene Usage of Nine Full-Length Amyloidogenic kappa1 Immunoglobulin Light Chains. *Biochemistry*, 46(49):14259–14271, 2007.
- [11] Subcommittee, W.-I. N. Nomenclature of amyloid and amyloidosis. *Bull World Health Organ*, 71:105–110, 1993.
- [12] Falk, R. H.; Comenzo, R. L. und Skinner, M. The Systemic Amyloidoses. *N Engl J Med*, 337(13):898–909, 1997.
- [13] Akpek, G. und Comenzo, R. L. Primary (AL) amyloidosis: A concise review. *Turk J Cancer*, 31:5–14, 2001.
- [14] Sanchorawala, D. V. Light-Chain (AL) Amyloidosis: Diagnosis and Treatment. *JASN*, 1:1331–41, 2006.
- [15] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e, V. Leitlinie für AL-Amyloidose. <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/amyloidose-leichtketten-al-amyloidose>, September 2013.
- [16] Kyle, R.; Linos, A.; Beard, C.; Linke, R.; Gertz, M.; O'Fallon, W. und Kurland, L. Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood*, 79(7):1817–1822, 1992.

- [17] Libbey, C. A.; Skinner, M. und Cohen, A. S. Use of abdominal fat tissue aspirate in the diagnosis of systemic amyloidosis. *Archives of internal medicine*, 143(8):1549, 1983.
- [18] Ansari-Lari, M. A. und Ali, S. Z. Fine-needle aspiration of abdominal fat pad for amyloid detection: A clinically useful test? *Diagn Cytopathol*, 30(3):178–181, 2004.
- [19] Schönland, S. O. Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der Amyloidosen. *Dtsch Arztebl International*, 103(34-35):A–2237–, 2006.
- [20] Kyle, R. A.; Therneau, T. M.; Rajkumar, S. V.; Offord, J. R.; Larson, D. R.; Plevak, M. F. und Melton III, L. J. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 346(8):564–569, 2002.
- [21] Skinner, M.; Sanchorawala, V.; Seldin, D. C.; Dember, L. M.; Falk, R. H.; Berk, J. L.; Anderson, J. J.; O'Hara, C.; Finn, K. T. und Libbey, C. A. High-dose melphalan and autologous stem-cell transplantation in patients with AL amyloidosis: an 8-year study. *Ann. Intern. Med.*, 140(2):85–93, 2004.
- [22] Dispenzieri, A.; Kyle, R. A.; Lacy, M. Q.; Therneau, T. M.; Larson, D. R.; Plevak, M. F.; Rajkumar, S. V.; Fonseca, R.; Greipp, P. R. und Witzig, T. E. Superior survival in primary systemic amyloidosis patients undergoing peripheral blood stem cell transplantation: a case-control study. *Blood*, 103(10):3960–3963, 2004.
- [23] Janeway, C. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland [u.a.], New York, NY [u.a.], 2005.
- [24] Taussig, M. J. Molecular genetics of immunoglobulins. *Immunology*, 64:7–16, 1988.
- [25] Stevens, F. J.; Myatt, E. A.; Chang, C.-H.; Westholm, F. A.; Eulitz, M.; Weiss, D. T.; Murphy, C.; Solomon, A. und Schiffer, M. A Molecular Model for Self-Assembly of Amyloid Fibrils: Immunoglobulin Light Chains. *Biochemistry*, 34(34):10697–10702, 1995.
- [26] Stevens, F. J. Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains. *Amyloid*, 7(3):200–211, 2000.

- [27] Hurle, M. R.; Helms, L. R.; Li, L.; Chan, W. und Wetzel, R. A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(12):5446–5450, 1994.
- [28] Helms, L. R. und Wetzel, R. Specificity of Abnormal Assembly in Immunoglobulin Light Chain Deposition Disease and Amyloidosis. *J Mol Biol*, 257(1):77 – 86, 1996.
- [29] Baden, E. M.; Sikkink, L. A. und Ramirez-Alvarado, M. Light chain amyloidosis—current findings and future prospects. *Curr Protein Pept Sci*, 10(5):500, 2009.
- [30] Lim, A.; Wally, J.; Walsh, M. T.; Skinner, M. und Costello, C. E. Identification and location of a cysteinyl posttranslational modification in an amyloidogenic  $\kappa$ 1 light chain protein by electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 295(1):45–56, 2001.
- [31] Omtvedt, L. A.; Bailey, D.; Renouf, D. V.; Davies, M. J.; Paramonov, N. A.; Haavik, S.; Husby, G.; Sletten, K. und Hounsell, E. F. Glycosylation of immunoglobulin light chains associated with amyloidosis. *Amyloid*, 7(4):227–244, 2000.
- [32] Larsen, M. R.; Trelle, M. B.; Thingholm, T. E. und Jensen, O. N. Analysis of post-translational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques*, 40(6):790, 2006.
- [33] Witze, E. S.; Old, W. M.; Resing, K. A. und Ahn, N. G. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *N Methods*, 4(10):798–806, 2007.
- [34] Strott, C. A. Sulfonation and molecular action. *Endocrine Reviews*, 23(5):703–732, 2002.
- [35] Medzihradzky, K.; Darula, Z.; Perlson, E.; Fainzilber, M.; Chalkley, R.; Ball, H.; Greenbaum, D.; Bogyo, M.; Tyson, D. und Bradshaw, R. O-sulfonation of serine and threonine Mass spectrometric detection and characterization of a new posttranslational modification in diverse proteins throughout the eukaryotes. *Mol Cell Proteomics*, 3(5):429–440, 2004.

- [36] Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. Unimod: Protein modifications for mass spectrometry. *Proteomics*, 4(6):1534–1536, 2004.
- [37] Lottspeich, F. H. *Bioanalytik*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 2006.
- [38] Boersema, P. J.; Mohammed, S. und Heck, A. J. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 44(6):861–878, 2009.
- [39] Paik, W. K. und Kim, S. Protein methylation. *Science*, 174(4005):114–119, 1971.
- [40] Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S. und Gatto, G. J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angw Chem Int Ed*, 44(45):7342–7372, 2005.
- [41] Clarke, S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol*, 5(6):977–983, 1993.
- [42] Bedford, M. T. und Richard, S. Arginine methylation: an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*, 18(3):263–272, 2005.
- [43] Rice, J. C. und Allis, C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3):263–273, 2001.
- [44] Chiang, P.; Gordon, R.; Tal, J.; Zeng, G.; Doctor, B.; Pardhasaradhi, K. und McCann, P. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*, 10(4):471–480, 1996.
- [45] Zhao, P.; Viner, R.; Teo, C. F.; Boons, G.-J.; Horn, D. und Wells, L. Combining high-energy c-trap dissociation and electron transfer dissociation for protein o-glcnac modification site assignment. *J. Proteome Res.*, 10(9):4088–4104, 2011.
- [46] Love, D. C. und Hanover, J. A. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "ö-glcnac code". *Sci. Signal.*, 2005(312):re13, 2005.
- [47] Hanover, J. A.; Krause, M. W. und Love, D. C. The hexosamine signaling pathway: O-glcnac cycling in feast or famine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1800(2):80–95, 2010.
- [48] Hanover, J. A. Glycan-dependent signaling: O-linked n-acetylglucosamine. *The FASEB Journal*, 15(11):1865–1876, 2001.

- [49] Khidekel, N.; Ficarro, S. B.; Clark, P. M.; Bryan, M. C.; Swaney, D. L.; Rexach, J. E.; Sun, Y. E.; Coon, J. J.; Peters, E. C. und Hsieh-Wilson, L. C. Probing the dynamics of o-glcnaC glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat. Chem. Biol.*, 3(6):339–348, 2007.
- [50] Rexach, J. E.; Clark, P. M. und Hsieh-Wilson, L. C. Chemical approaches to understanding o-glcnaC glycosylation in the brain. *Nat. Chem. Biol.*, 4(2):97–106, 2008.
- [51] Glozak, M. A.; Sengupta, N.; Zhang, X. und Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363:15–23, 2005.
- [52] Karve, T. M. und Cheema, A. K. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids*, 2011, 2011.
- [53] Arnesen, T. Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS Biol*, 9(5):e1001074, 2011.
- [54] Yang, X.-J. und Seto, E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, 31(4):449–461, 2008.
- [55] Sadoul, K.; Wang, J.; Diagouraga, B. und Khochbin, S. The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *BioMed Res Int*, 2011, 2010.
- [56] Choudhary, C.; Kumar, C.; Gnad, F.; Nielsen, M. L.; Rehman, M.; Walther, T. C.; Olsen, J. V. und Mann, M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325(5942):834–840, 2009.
- [57] Levine, R. L.; Moskovitz, J. und Stadtman, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB L*, 50(4-5):301–307, 2000.
- [58] Stadtman, E. R.; Moskovitz, J. und Levine, R. L. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal*, 5(5):577–582, 2003.
- [59] Liang, X.; Kaya, A.; Zhang, Y.; Le, D. T.; Hua, D. und Gladyshev, V. N. Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins. *BMC Biochem*, 13(1):21, 2012.

- [60] Bodi, K.; Prokaeva, T.; Spencer, B.; Eberhard, M.; Connors, L. H. und Seldin, D. C. AL-Base: a visual platform analysis tool for the study of amyloidogenic immunoglobulin light chain sequences. *Amyloid*, 16(1):1–8, 2009.
- [61] Mann, M.; Hendrickson, R. C. und Pandey, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annu Rev Biochem*, 70(1):437–473, 2001.
- [62] El-Aneed, A.; Cohen, A. und Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectrosc Rev*, 44(3):210–230, 2009.
- [63] Mann, M. und Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 21(3):255–261, 2003.
- [64] Schweppe, R. E.; Haydon, C. E.; Lewis, T. S.; Resing, K. A. und Ahn, N. G. The characterization of protein post-translational modifications by mass spectrometry. *Acc Chem Res*, 36(6):453–461, 2003.
- [65] Scigelova, M. und Makarov, A. Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6(S2):16–21, 2006.
- [66] Schwartz, J. C.; Senko, M. W. und Syka, J. E. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 13(6):659 – 669, 2002.
- [67] Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M. und Graham Cooks, R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, 40(4):430–443, 2005.
- [68] Huang, T.-Y. und McLuckey, S. A. Gas-phase chemistry of multiply charged bioions in analytical mass spectrometry. *Annu Rev Anal Chem*, 3:365, 2010.
- [69] Quan, L. und Liu, M. CID, ETD and HCD Fragmentation to Study Protein Post-Translational Modifications. *Mod Chem Appl*, 2013.
- [70] Wiesner, J.; Premisler, T. und Sickmann, A. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics*, 8(21):4466–4483, 2008.

- [71] Frese, C. K.; Altelaar, A. M.; Hennrich, M. L.; Nolting, D.; Zeller, M.; Griep-Raming, J.; Heck, A. J. und Mohammed, S. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J Proteom Res*, 10(5):2377–2388, 2011.
- [72] Paizs, B. und Suhai, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.*, 24(4):508–548, 2005.
- [73] Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L. und Breci, L. A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom*, 35(12):1399–1406, 2000.
- [74] Syka, J. E.; Coon, J. J.; Schroeder, M. J.; Shabanowitz, J. und Hunt, D. F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(26):9528–9533, 2004.
- [75] Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L. und McLafferty, F. W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J Am Chem Soc*, 120(13):3265–3266, 1998.
- [76] Coon, J. J.; Syka, J. E.; Schwartz, J. C.; Shabanowitz, J. und Hunt, D. F. Anion dependence in the partitioning between proton and electron transfer in ion/ion reactions. *Int J Mass*, 236(1):33–42, 2004.
- [77] Stone, M. J.; Chuang, S.; Hou, X.; Shoham, M. und Zhu, J. Z. Tyrosine sulfation: an increasingly recognised post-translational modification of secreted proteins. *N Biotechnol*, 25(5):299–317, 2009.
- [78] Tholey, A.; Reed, J. und Lehmann, W. D. Electrospray tandem mass spectrometric studies of phosphopeptides and phosphopeptide analogues. *J Mass Spectrom*, 34(2):117–123, 1999.
- [79] DeGnove, J. und Qin, J. Fragmentation of phosphopeptides in an ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*, 9(11):1175–1188, 1998.

- [80] Olsen, J. V. und Macek, B. High accuracy mass spectrometry in large-scale analysis of protein phosphorylation. In *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, Seiten 131–142. Springer, 2009.
- [81] Medzihradszky, K.; Guan, S.; Maltby, D. und Burlingame, A. Sulfopeptide fragmentation in electron-capture and electron-transfer dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom*, 18(9):1617–1624, 2007.
- [82] Chi, A.; Huttenhower, C.; Geer, L. Y.; Coon, J. J.; Syka, J. E.; Bai, D. L.; Shabanowitz, J.; Burke, D. J.; Troyanskaya, O. G. und Hunt, D. F. Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(7):2193–2198, 2007.
- [83] Welschhof, M.; Terness, P.; Kolbinger, F.; Zewe, M.; Dübel, S.; Dörsam, H.; Hain, C.; Finger, M.; Jung, M.; Moldenhauer, G.; Hayashi, N.; Little, M. und Opelz, G. Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. *J Immunol Meth*, 179(2):203 – 214, 1995.
- [84] Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; de Castro, E.; Duvaud, S.; Flegel, V.; Fortier, A.; Gasteiger, E.; Grosdidier, A.; Hernandez, C.; Ioannidis, V.; Kuznetsov, D.; Liechti, R.; Moretti, S.; Mostaguir, K.; Redaschi, N.; Rossier, G.; Xenarios, I. und Stockinger, H. ExpASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*, 2012.
- [85] Consortium, T. U. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, 40(D1):D71–D75, 2012.
- [86] Giudicelli, V.; Chaume, D. und Lefranc, M.-P. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res*, 33(suppl 1):D256–D261, 2005.
- [87] Cottrell, J. S. und London, U. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551–3567, 1999.

- [88] Eng, J. K.; McCormack, A. L. und Yates, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*, 5(11):976–989, 1994.
- [89] Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li, M.; Doherty-Kirby, A. und Lajoie, G. Peaks: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17(20):2337–2342, 2003.
- [90] Zhang, J.; Xin, L.; Shan, B.; Chen, W.; Xie, M.; Yuen, D.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Lajoie, G. A. und Ma, B. Peaks db: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol. Cell. Proteomics*, 11(4):M111–010587, 2012.
- [91] Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.; Gibson, T. und Higgins, D. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948, 2007.
- [92] Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D. und Higgins, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7(1), 2011.
- [93] Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5):1792–1797, 2004.
- [94] Sedlmeier, P. und Renkewitz, F. *Forschungsmethoden und Statistik in der Psychologie*. Psychologie. Pearson Studium, München [u.a.], 2008.
- [95] Köhler, W.; Schachtel, G. und Voleske, P. *Biostatistik : Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin [u.a.], 3., aktualisierte und erw. aufl. Auflage, 2002.
- [96] Hatters, D. M. und Howlett, G. J. The structural basis for amyloid formation by plasma apolipoproteins: a review. *Eur Biophys J*, 31(1):2–8, 2002.

- [97] Stewart, C. R.; Haw, A.; Lopez, R.; McDonald, T. O.; Callaghan, J. M.; McConville, M. J.; Moore, K. J.; Howlett, G. J. und O'Brien, K. D. Serum amyloid P colocalizes with apolipoproteins in human atheroma: functional implications. *J Lipid Res*, 48(10):2162–2171, 2007.
- [98] Pepys, M.; Herbert, J.; Hutchinson, W.; Tennent, G.; Lachmann, H.; Gallimore, J.; Lovat, L.; Bartfai, T.; Alanine, A. und Hertel, C. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417(6886):254–259, 2002.
- [99] Pepys, M. B.; Booth, D.; Hutchinson, W.; Gallimore, J.; Collins, I. und Hohenester, E. Amyloid P component. A critical review. *Amyloid*, 4(4):274–295, 1997.
- [100] Pepys, M.; Dyck, R.; De Beer, F.; Skinner, M. und Cohen, A. Binding of serum amyloid P-component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin Exp Immunol*, 38(2):284, 1979.
- [101] Tennent, G. A.; Lovat, L. und Pepys, M. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(10):4299–4303, 1995.
- [102] Hutchinson, W. L.; Hohenester, E. und Pepys, M. B. Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum. *Mol Med*, 6(6):482, 2000.
- [103] Gunzburg, M. J.; Perugini, M. A. und Howlett, G. J. Structural basis for the recognition and cross-linking of amyloid fibrils by human apolipoprotein e. *J Biol Chem*, 282(49):35831–35841, 2007.
- [104] A novel approach for the purification and proteomic analysis of pathogenic immunoglobulin free light chains from serum. *Biochim Biophys Acta*, 1814(3):409 – 419, 2011.
- [105] Mikesch, L. M.; Ueberheide, B.; Chi, A.; Coon, J. J.; Syka, J. E.; Shabanowitz, J. und Hunt, D. F. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1764(12):1811–1822, 2006.
- [106] Coon, J.; Syka, J.; Shabanowitz, J. und Hunt, D. Tandem mass spectrometry for peptide and protein sequence analysis. *BioTechniques*, 38(4):519–521, 2005.

- [107] Lapko, V. N.; Smith, D. L. und Smith, J. B. Identification of an artifact in the mass spectrometry of proteins derivatized with iodoacetamide. *J. Mass Spectrom.*, 35(4):572–575, 2000.
- [108] Gurd, F. R. [34a] Carboxymethylation. In *Enzyme Structure, Part B*, Band 25 von *Methods Enzymol.*, Seiten 424 – 438. Academic Press, 1972.
- [109] Krüger, R.; Hung, C.-W.; Edelson-Averbukh, M. und Lehmann, W. D. Iodoacetamide-alkylated methionine can mimic neutral loss of phosphoric acid from phosphopeptides as exemplified by nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight parent ion scanning. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(12):1709–1716, 2005.
- [110] Joshi, H.; Steentoft, C.; Schjoldager, K.-B.; Vakhrushev, S.; Wandall, H. und Clausen, H. Protein O-GalNAc Glycosylation: The Most Complex and Differentially Regulated PTM. In Endo, T.; Seeberger, P. H.; Hart, G. W.; Wong, C.-H. und Taniguchi, N., Herausgeber, *Glycoscience: Biology and Medicine*, Seiten 1 – 14. Springer Japan, 2014.
- [111] Helbig, A. O.; Gauci, S.; Raijmakers, R.; van Breukelen, B.; Slijper, M.; Mohammed, S. und Heck, A. J. Profiling of n-acetylated protein termini provides in-depth insights into the n-terminal nature of the proteome. *Mol Cell Proteomics*, 9(5):928–939, 2010.
- [112] Trelle, M. B. und Jensen, O. N. Utility of immonium ions for assignment of  $\epsilon$ -N-acetyllysine-containing peptides by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 80(9):3422–3430, 2008.
- [113] Schey, K. L. und Finley, E. L. Identification of peptide oxidation by tandem mass spectrometry. *Acc Chem Res*, 33(5):299–306, 2000.
- [114] Morand, K.; Talbo, G. und Mann, M. Oxidation of peptides during electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 7(8):738–743, 1993.
- [115] Froelich, J. M. und Reid, G. E. The origin and control of ex vivo oxidative peptide modifications prior to mass spectrometry analysis. *Proteomics*, 8(7):1334–1345, 2008.

- [116] Perdivara, I.; Deterding, L. J.; Przybylski, M. und Tomer, K. B. Mass spectrometric identification of oxidative modifications of tryptophan residues in proteins: chemical artifact or post-translational modification? *J Am Soc Mass Spectrom*, 21(7):1114–1117, 2010.
- [117] Lefranc, M.-P.; Pommié, C.; Ruiz, M.; Giudicelli, V.; Foulquier, E.; Truong, L.; Thouvenin-Contet, V. und Lefranc, G. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol*, 27(1):55 – 77, 2003.
- [118] Wu, T. T. und Kabat, E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med.*, 132:211–250, 1970.
- [119] Garcia-Boronat, M.; Diez-Rivero, C. M.; Reinherz, E. L. und Reche, P. A. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic Acids Res*, 36(Web-Server-Issue):35–41, 2008.
- [120] de Groot, N. S.; Pallares, I.; Aviles, F. X.; Vendrell, J. und Ventura, S. Prediction of “hot spots” of aggregation in disease-linked polypeptides. *BMC Struct Biol*, (1):18, 2005.
- [121] Dwulet, F. E.; Strako, K. und Benson, M. D. Amino Acid Sequence of a  $\lambda$  VI Primary (AL) Amyloid Protein (WLT). *Scand J Immunol*, 22(6):653–660, 1985.
- [122] Poshusta, T. L.; Sikkink, L. A.; Leung, N.; Clark, R. J.; Dispenzieri, A. und Ramirez-Alvarado, M. Mutations in specific structural regions of immunoglobulin light chains are associated with free light chain levels in patients with AL amyloidosis. *PLoS One*, 4(4):e5169, 2009.
- [123] Yoon, S. und Welsh, W. J. Detecting hidden sequence propensity for amyloid fibril formation. *Protein Sci*, 13(8):2149–2160, 2004.
- [124] Hamodrakas, S. J.; Liappa, C. und Iconomidou, V. A. Consensus prediction of amyloidogenic determinants in amyloid fibril-forming proteins. *Int J Biolo Macromolec*, 41(3):295 – 300, 2007.

- [125] Thompson, M. J.; Sievers, S. A.; Karanicolas, J.; Ivanova, M. I.; Baker, D. und Eisenberg, D. The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(11):4074–4078, 2006.
- [126] Zhang, Z.; Chen, H. und Lai, L. Identification of amyloid fibril-forming segments based on structure and residue-based statistical potential. *Bioinformatics*, 23(17):2218–2225, 2007.
- [127] Galzitskaya, O.; Garbuzynskiy, S. und Lobanov, M. A search for amyloidogenic regions in protein chains. *Mol Biol*, 40(5):821–828, 2006.
- [128] Galzitskaya, O. V.; Garbuzynskiy, S. O. und Lobanov, M. Y. Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains. *PLoS Comput Biol*, 2(12):e177, 2006.
- [129] Pawar, A. P.; Dubay, K. F.; Zurdo, J.; Chiti, F.; Vendruscolo, M. und Dobson, C. M. Prediction of “aggregation-prone” and “aggregation-susceptible” regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol*, 350(2):379–392, 2005.
- [130] Tartaglia, G. G.; Pawar, A. P.; Campioni, S.; Dobson, C. M.; Chiti, F. und Vendruscolo, M. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *J Mol Biol*, 380(2):425–436, 2008.
- [131] Garbuzynskiy, S. O.; Lobanov, M. Y. und Galzitskaya, O. V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics*, 26(3):326–332, 2010.
- [132] Bellotti, V.; Mangione, P. und Merlini, G. Review: Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis—The Archetype of Structural and Pathogenic Variability. *J Struct Biol*, 130(2–3):280 – 289, 2000.
- [133] Comenzo, R. L. How I treat amyloidosis. *Blood*, 114(15):3147–3157, 2009.
- [134] Merlini, G. und Bellotti, V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N Engl J Med*, 349(6):583–596, 2003.

- [135] Westermark, P.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Cohen, A. S.; Frangione, B.; Ikeda, S.-I.; Masters, C. L.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. und Sipe, J. D. A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid*, 14(3):179–183, 2007.
- [136] Hieter, P. A.; Max, E. E.; Seidman, J.; Jr., J. V. M. und Leder, P. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and j region genes conserve homology in functional segments. *Cell*, 22(1, Part 1):197 – 207, 1980.
- [137] Bolanos-Garcia, V. M. und Miguel, R. N. On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 83(1):47–68, 2003.
- [138] Olsen, J. V.; Macek, B.; Lange, O.; Makarov, A.; Horning, S. und Mann, M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods*, 4(9):709–712, 2007.
- [139] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V. Leitlinie Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz. <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/monoklonale-gammopathie-unklarer-signifikanz-mgus>, August 2010.
- [140] Nørregaard Jensen, O. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, 8(1):33–41, 2004.
- [141] Seo, J. und Lee, K.-J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol*, 37(1):35–44, 2004.
- [142] Bakken, V.; Helgaker, T. und Uggerud, E. Models of fragmentations induced by electron attachment to protonated peptides. *Eur J Mass Spectrom*, 10(5):625–638, 2004.
- [143] Nichols, A. M. und White, F. M. Manual validation of peptide sequence and sites of tyrosine phosphorylation from MS/MS spectra. In *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, Seiten 143–160. Springer, 2009.

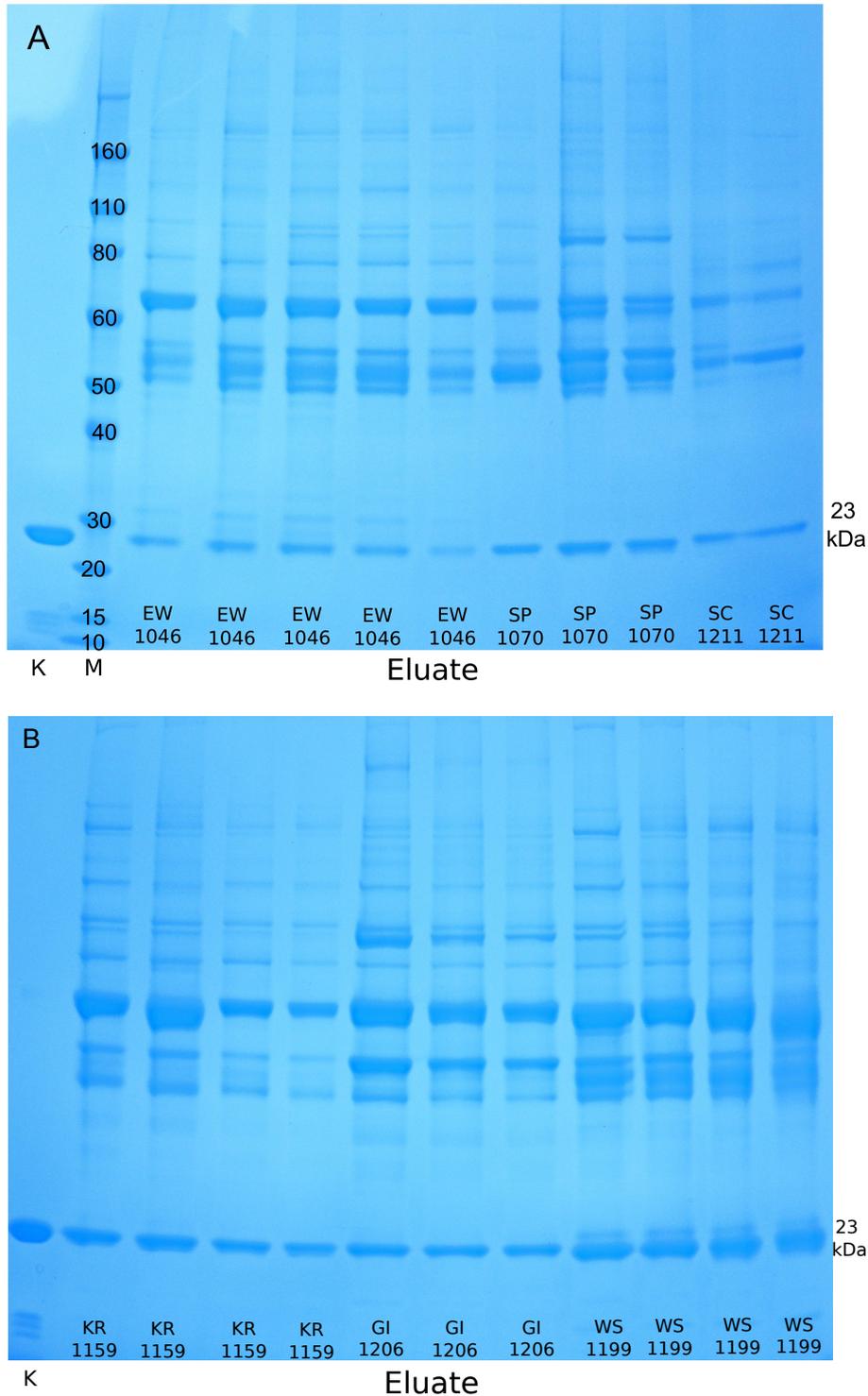
- [144] Jeffers, V. und Sullivan, W. J. Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell*, 11(6):735–742, 2012.
- [145] Lundby, A.; Lage, K.; Weinert, B. T.; Bekker-Jensen, D. B.; Secher, A.; Skovgaard, T.; Kelstrup, C. D.; Dmytriiev, A.; Choudhary, C. und Lundby, C. Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Reports*, 2(2):419–431, 2012.
- [146] Plevoda, B. und Sherman, F. N $\alpha$ -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem*, 275(47):36479–36482, 2000.
- [147] Dwulet, F. E.; Connor, T. P. O. und Benson, M. D. Polymorphism in a kappa I primary (AL) amyloid protein (BAN). *Mol Immunol*, 23(1):73 – 78, 1986.
- [148] Fink, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des*, 3(1):R9 – R23, 1998.
- [149] Hamodrakas, S. J. Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies. *FEBS J*, 278(14):2428–2435, 2011.
- [150] Lesk, A. M. *Introduction to bioinformatics*. Oxford Univ. Press, Oxford [u.a.], 3. ed. Auflage, 2008.
- [151] Shannon, C. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst Tech J*, 27:379–423, 623–656, 1948.
- [152] Simpson, E. Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148):688, 1949.
- [153] Tzotzos, S. und Doig, A. J. Amyloidogenic sequences in native protein structures. *Protein Sci*, 19(2):327–348, 2010.
- [154] Rousseau, F.; Schymkowitz, J. und Serrano, L. Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? *Curr Opin Struct Biol*, 16(1):118 – 126, 2006.
- [155] Amster, I. J. Fourier transform mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 31(12):1325–1337, 1996.

- [156] Bunkenborg, J. und Matthiesen, R. Interpretation of Collision-Induced Fragmentation Tandem Mass Spectra of Posttranslationally Modified Peptides. In Matthiesen, R., Herausgeber, *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*, Band 367 von *Methods in Molecular Biology*, Seiten 169–194. Humana Press, 2007. 10.1385/1-59745-275-0:169.
- [157] Ens, W. und Standing, K. G. Hybrid Quadrupole/Time-of-Flight-Mass Spectrometers for Analysis of Biomolecules. In Burlingame, A. L., Herausgeber, *Biological Mass Spectrometry*, Band 402 von *Methods in Enzymology*, Seiten 49–78. Academic Press, 2005.
- [158] Chernushevich, I. V.; Loboda, A. V. und Thomson, B. A. An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 36(8):849–865, 2001.
- [159] Glish, G. L. und Burinsky, D. J. Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 19(2):161–172, 2008.
- [160] Gross, M. L. und Rempel, D. L. Fourier transform mass spectrometry. *Science*, 226(4672):261–268, 1984.
- [161] Kinter, M. und Sherman, N. E. *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*. Wiley-Interscience series on mass spectrometry. Wiley-Interscience, 2000.
- [162] March, R. E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*, 32(4):351–369, 1997.
- [163] Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L. und Jackson, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev*, 17(1):1–35, 1998.
- [164] Scigelova, M.; Hornshaw, M.; Giannakopoulos, A. und Makarov, A. Fourier transform mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 10(7):M111–009431, 2011.



# A Anhang

## A.1 SDS-PAGE-Gele



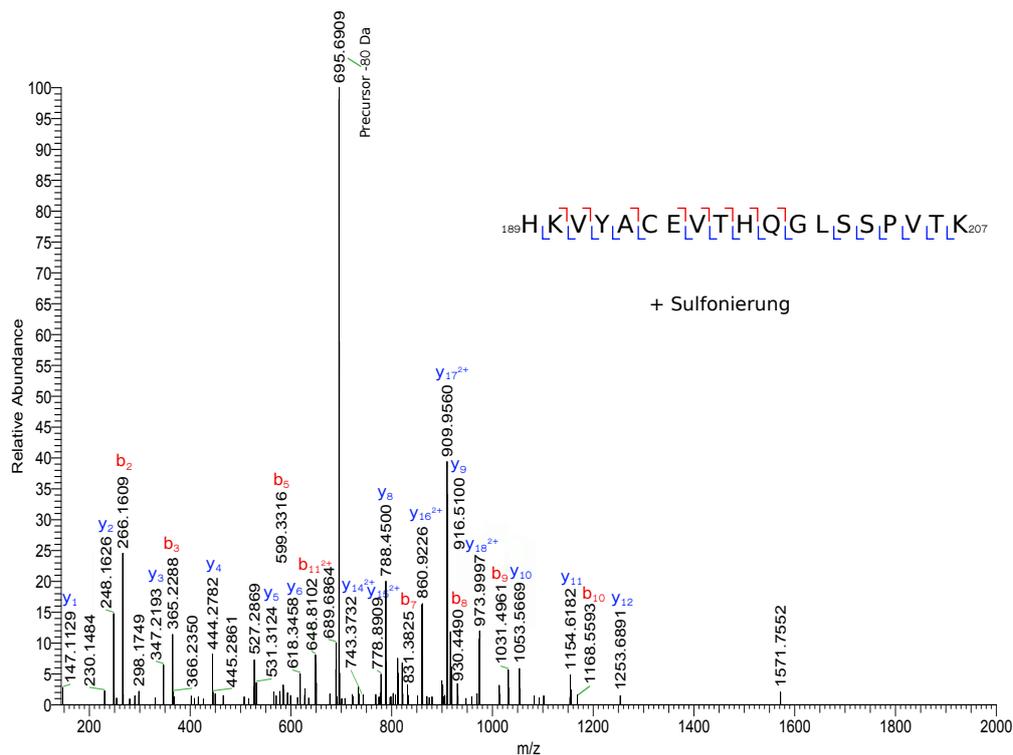
**Abbildung A.1: SDS-PAGE-Gel der Eluate der Affinitätschromatographie zur Isolierung der freien Antikörperleichtketten aus dem Knochenmarksüberstand.** In dem Gel A wurden die Eluate der Proben EW 1046, SP 1070 und SC 1211 zusammen mit einem Größenmarker M und einem  $\kappa$ -Standard  $\kappa$  bzw. im Gel B die Eluate der Proben KR 1159, GI 1206 und WS 1199 zusammen mit einem  $\kappa$ -Standard  $\kappa$  aufgetragen. Die Größenangaben bei dem Marker sind in kDa dargestellt.

## A.2 Spektren

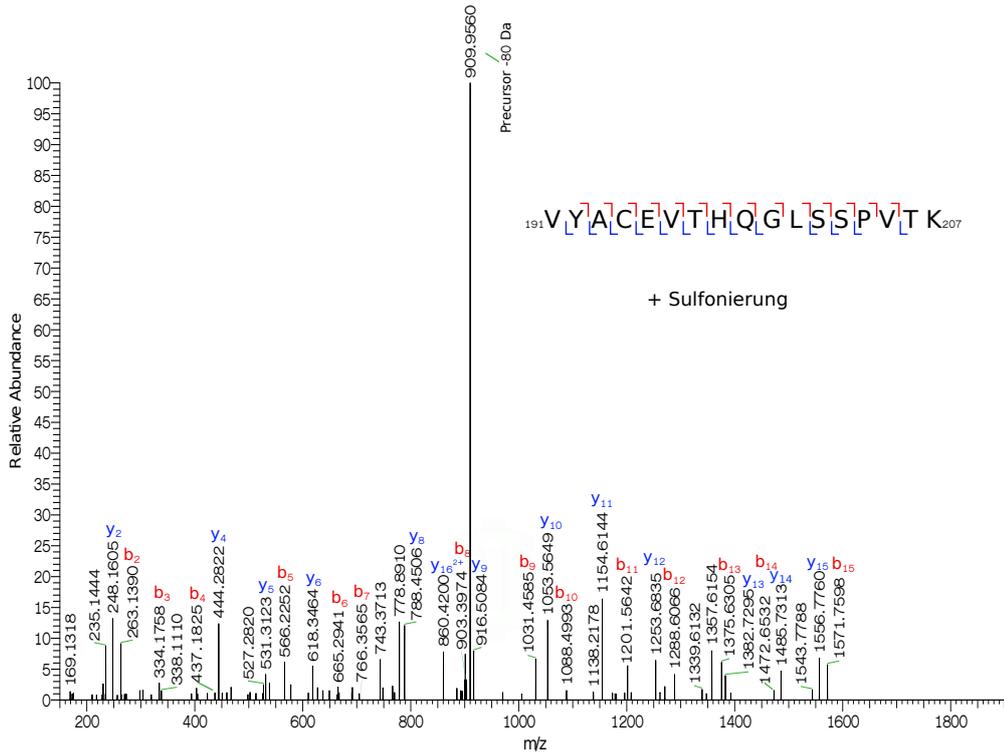
### A.2.1 Sulfonierungen

#### A.2.1.1 Sulfonierung am Cystein C194

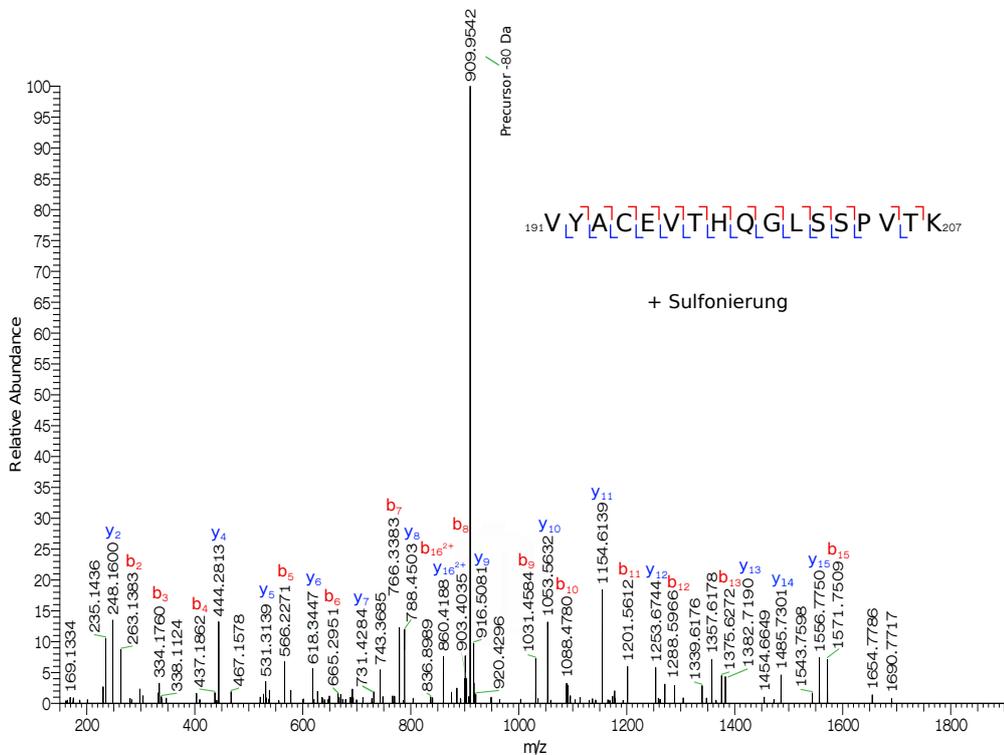
## HCD-Spektren für die Sulfonierung am Cystein C194



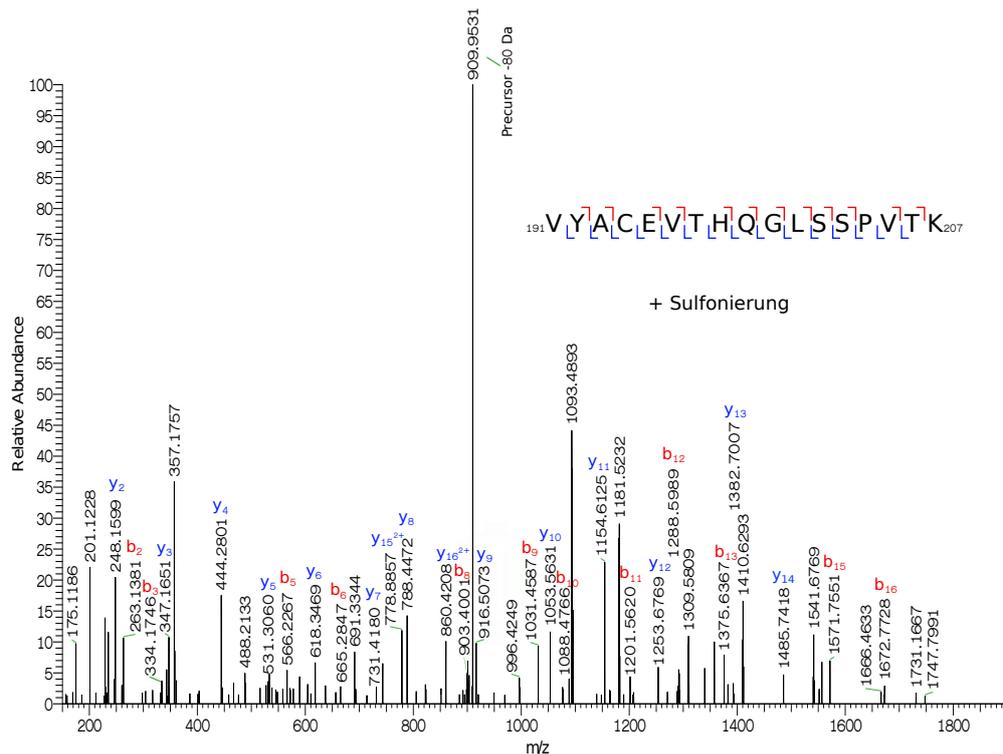
**Abbildung A.2:** HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids HKVYACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 722.34 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup> und entstammt der Probe EW 1046. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2164.00 Da.



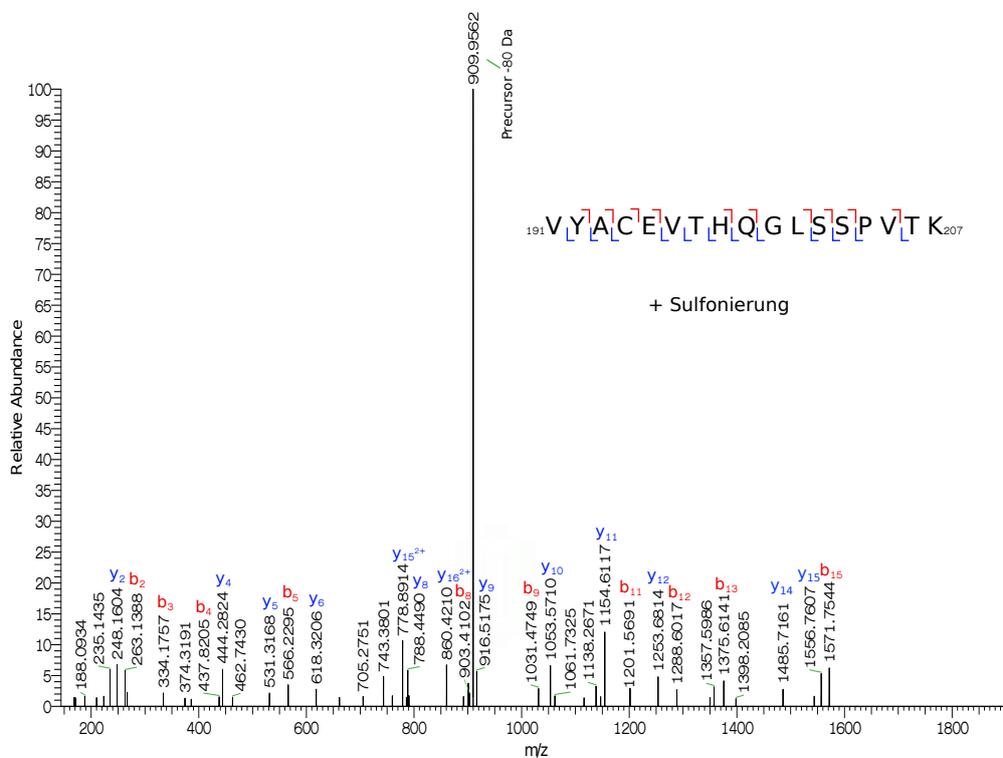
**Abbildung A.3:** HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids VYACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 949.93 Da und einer Ladung von 2<sup>+</sup> und entstammt der Probe GI 1206. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1897.85 Da.



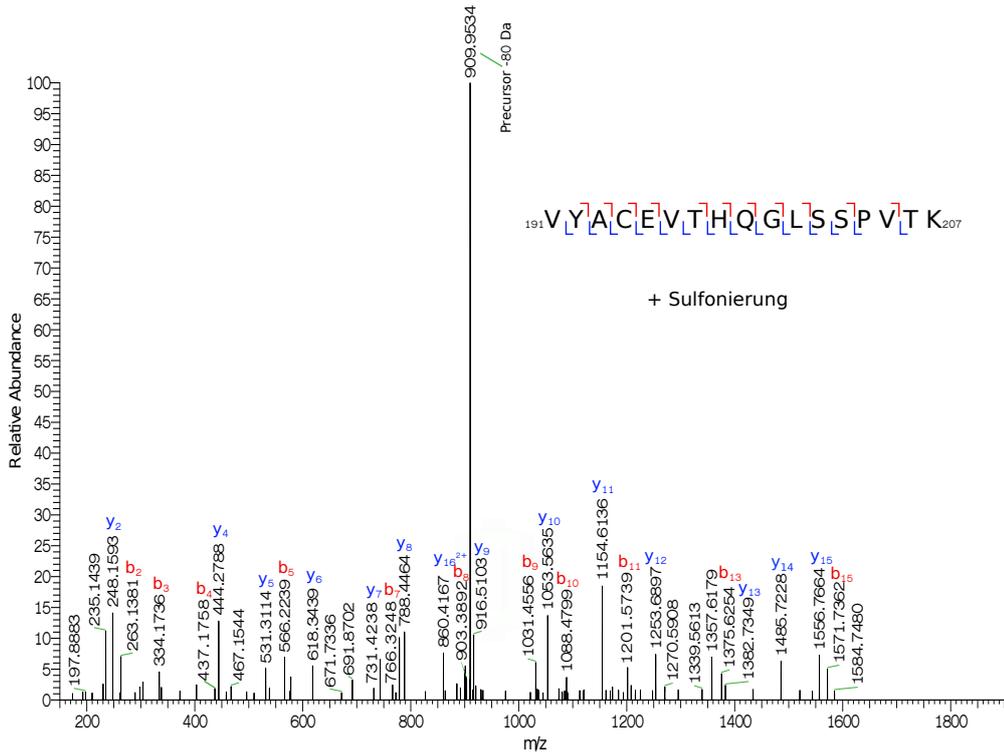
**Abbildung A.4:** HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids VYACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 949.93 Da und einer Ladung von 2<sup>+</sup> und entstammt der Probe SC 1211. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1897.85 Da.



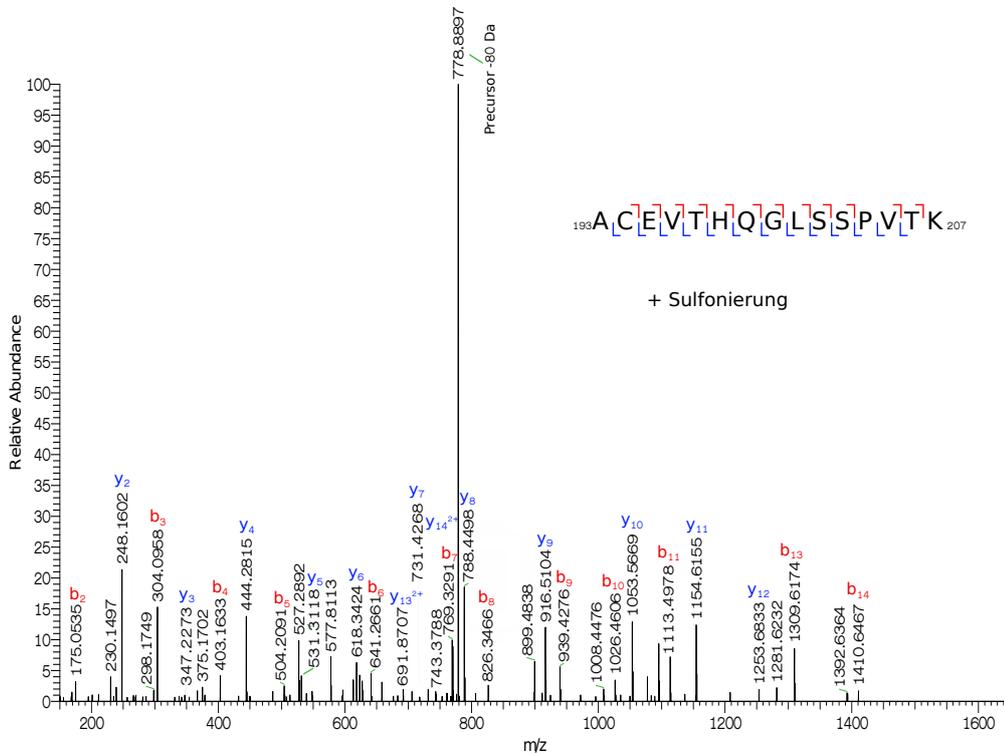
**Abbildung A.5:** HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids VYACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 949.93 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe WS 1199. Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1897.85 Da.



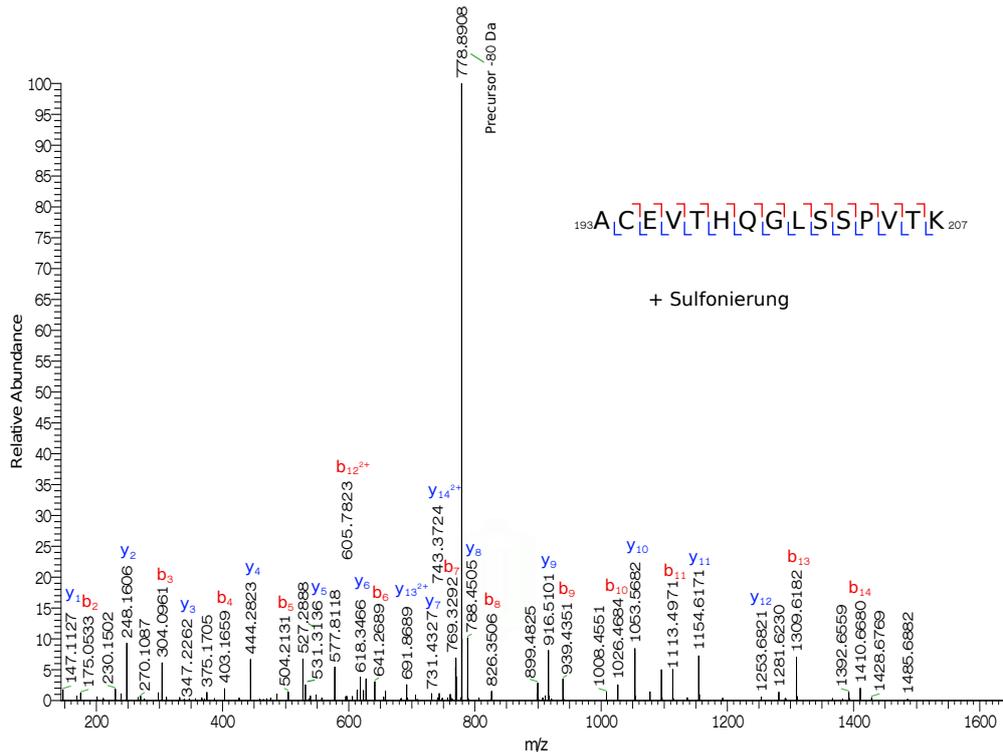
**Abbildung A.6:** HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids VYACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 949.93 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe EW 1046. Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1897.85 Da.



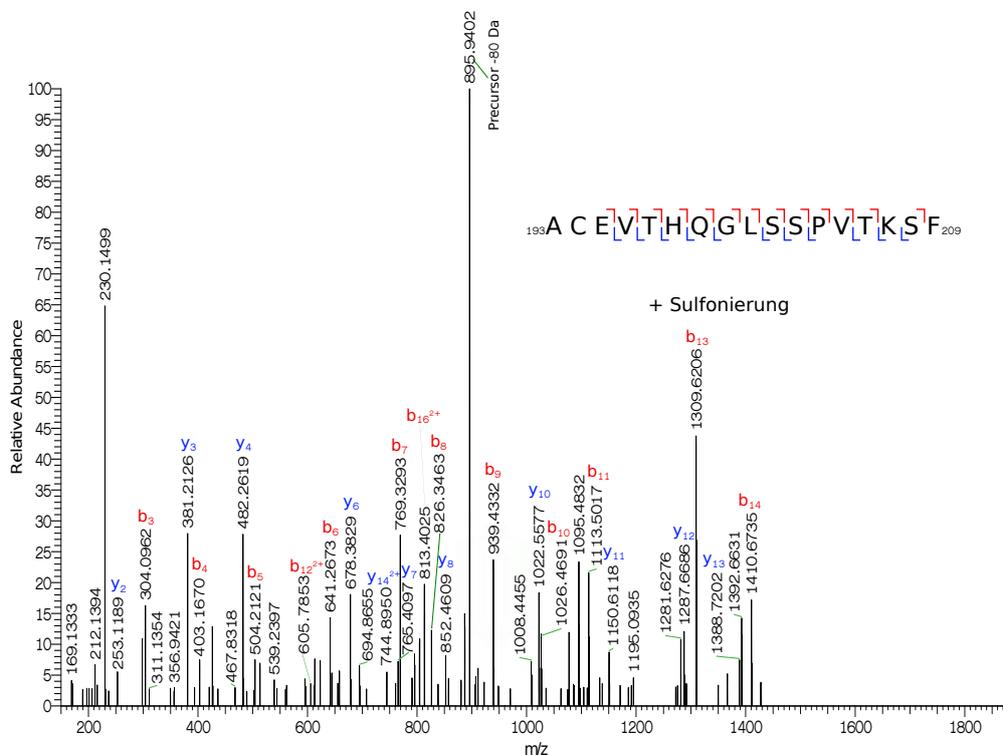
**Abbildung A.7:** HCD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids VYACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 949.94 Da und einer Ladung von 2<sup>+</sup> und entstammt der Probe KR 1159. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1897.87 Da.



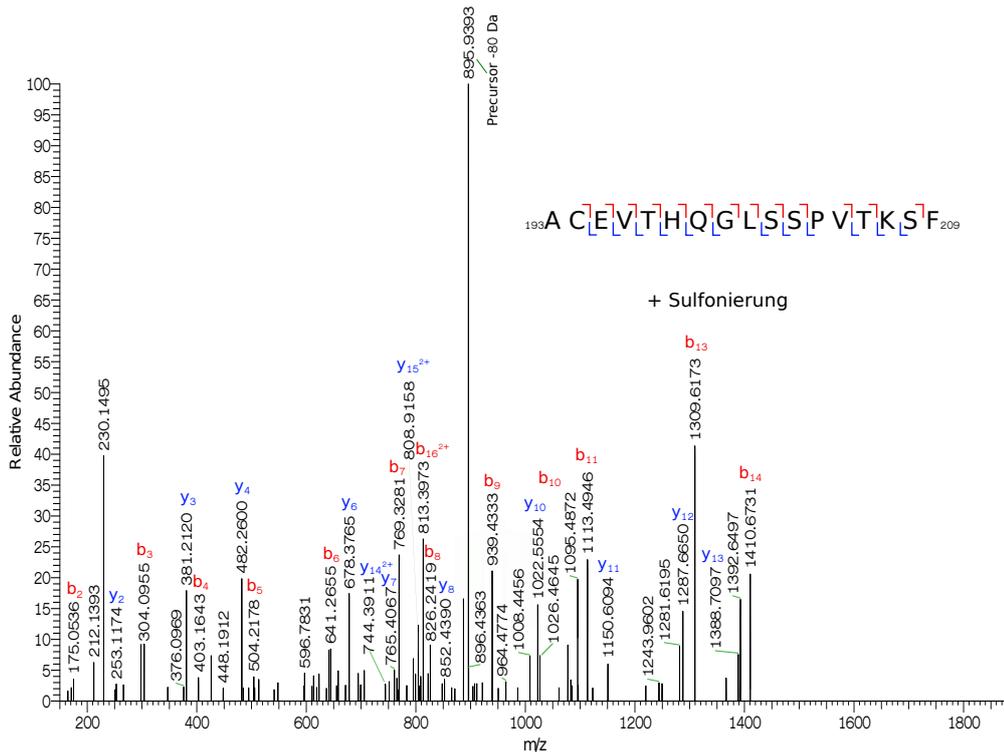
**Abbildung A.8:** HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 818.87 Da und einer Ladung von 2<sup>+</sup> und entstammt der Probe SC 1211. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1637.73 Da.



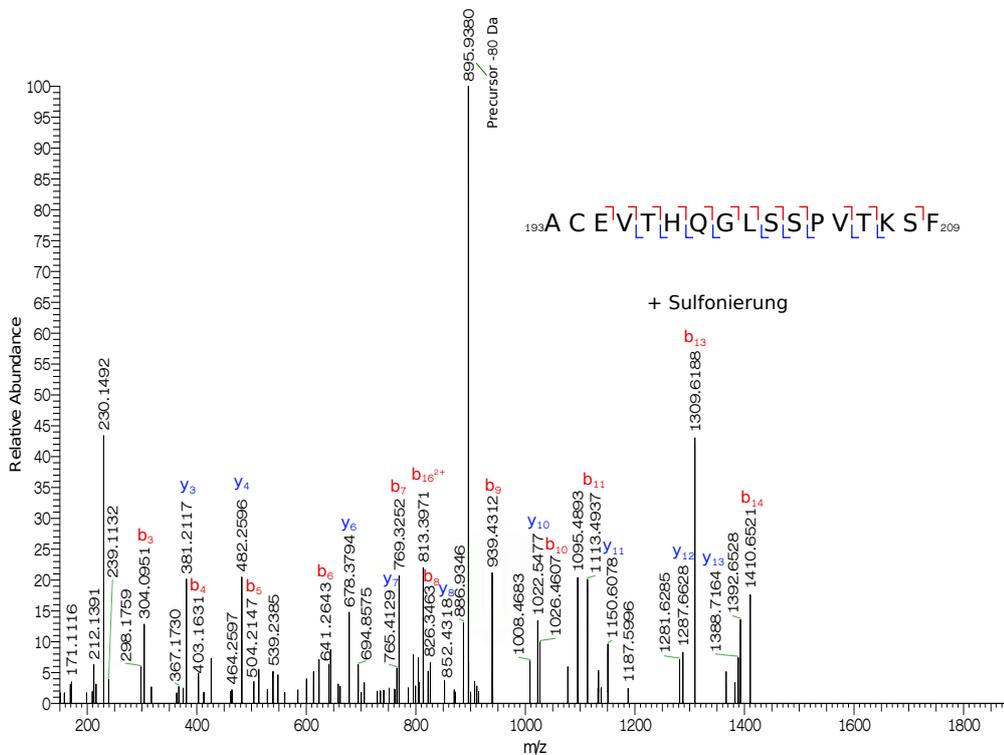
**Abbildung A.9:** HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 818.87 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe KR 1159. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1637.73 Da.



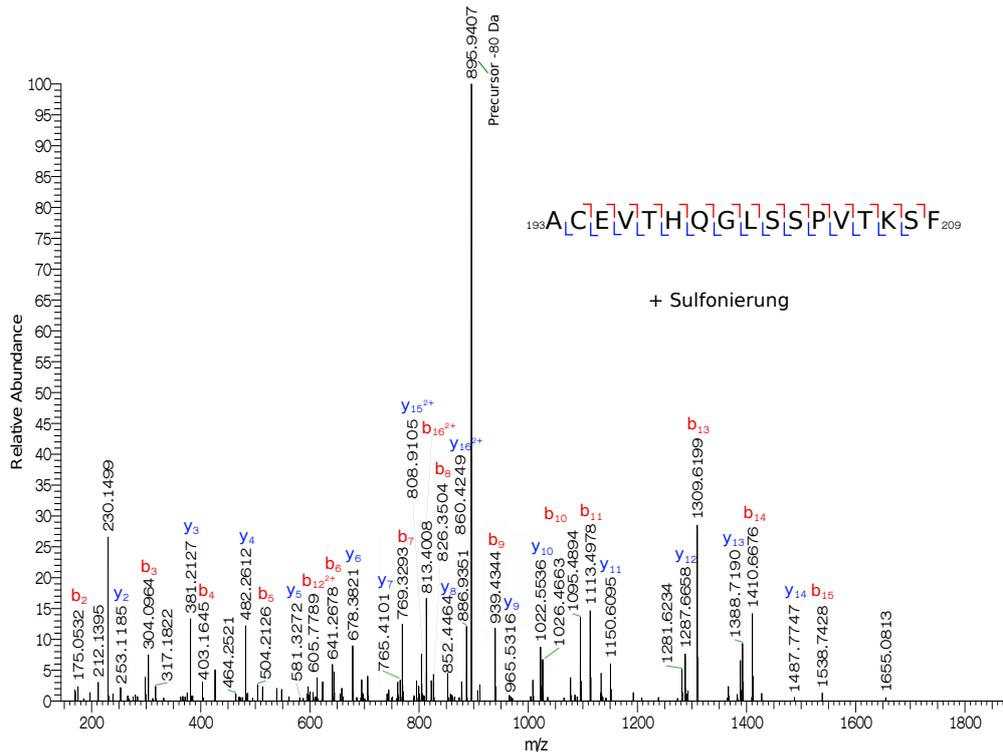
**Abbildung A.10:** HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTKSF mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 935.92 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe GI 1206. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1869.83 Da.



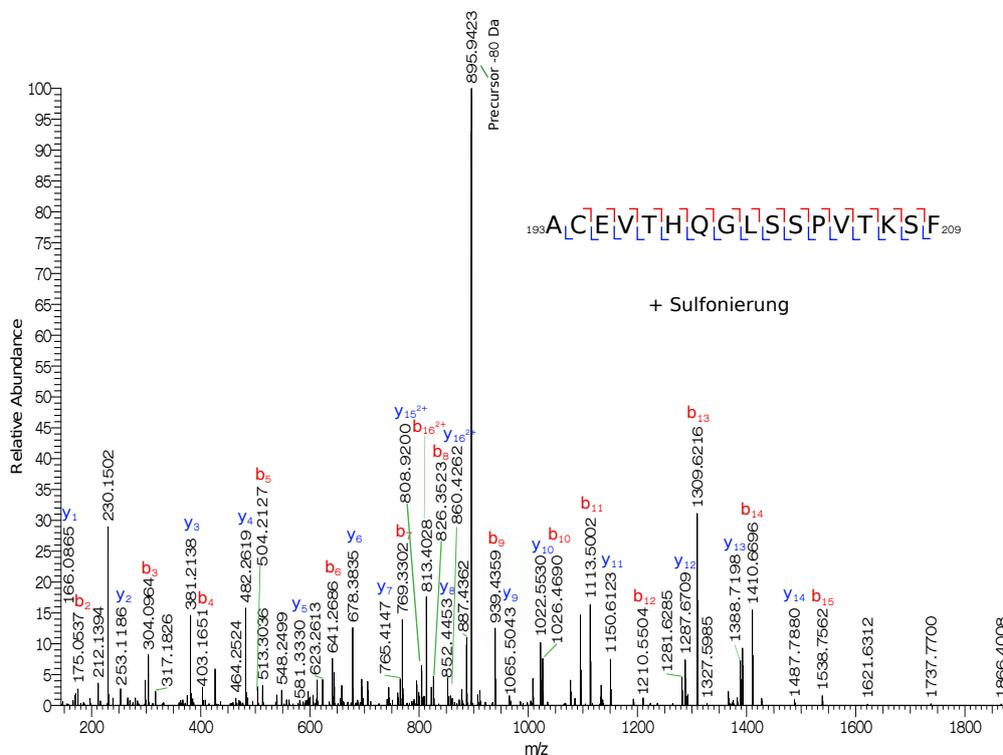
**Abbildung A.11: HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTKSF mit einer Sulfonierung am Cystein C194.** Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 935.92 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe SC 1211. Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1869.83 Da.



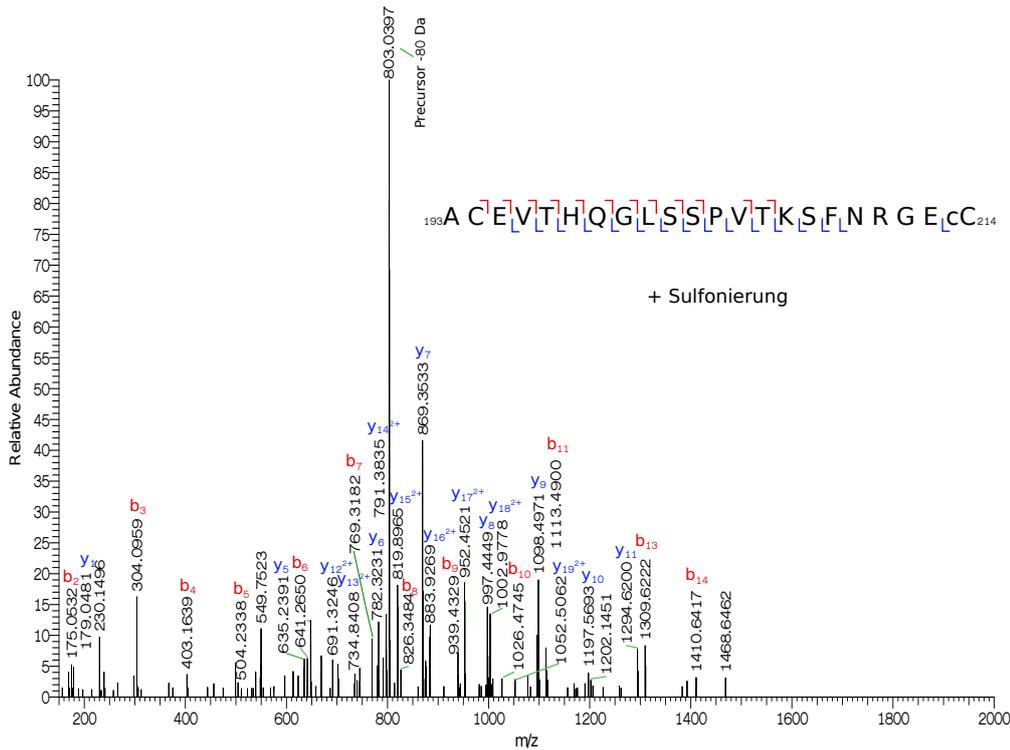
**Abbildung A.12: HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTKSF mit einer Sulfonierung am Cystein C194.** Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem  $m/z$  von 935.92 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe WS 1199. Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 1869.83 Da.



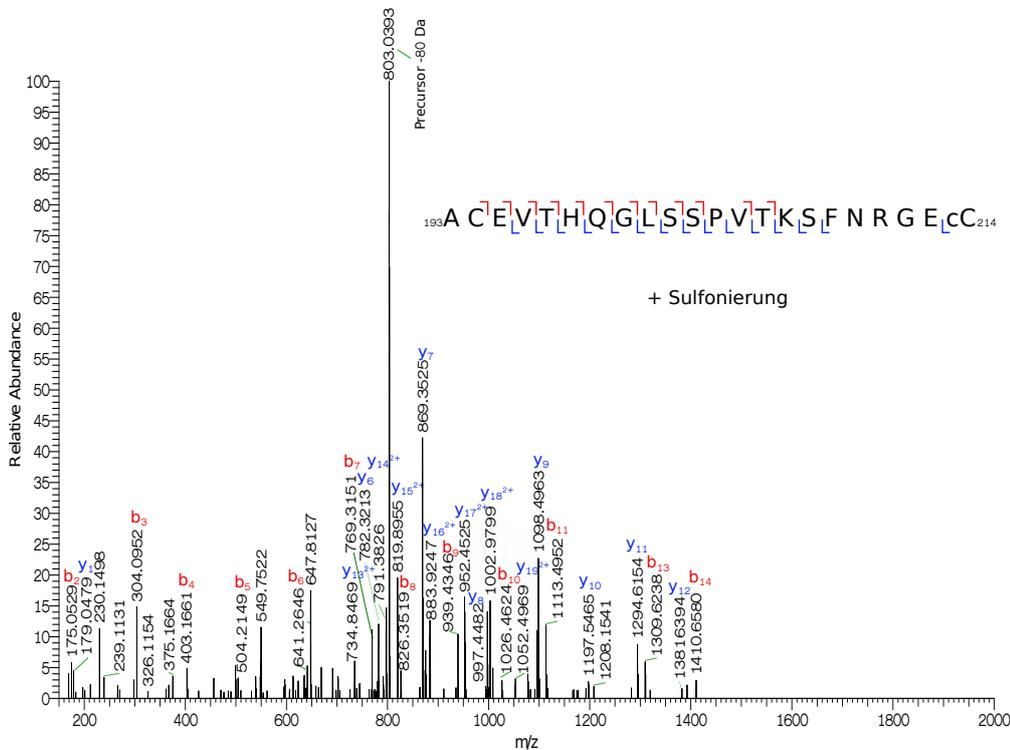
**Abbildung A.13:** HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTKSF mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 935.92 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe EW 1046. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1869.83 Da.



**Abbildung A.14:** HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTKSF mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 935.92 Da und einer Ladung von  $2^+$  und entstammt der Probe KR 1159. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1869.83 Da.

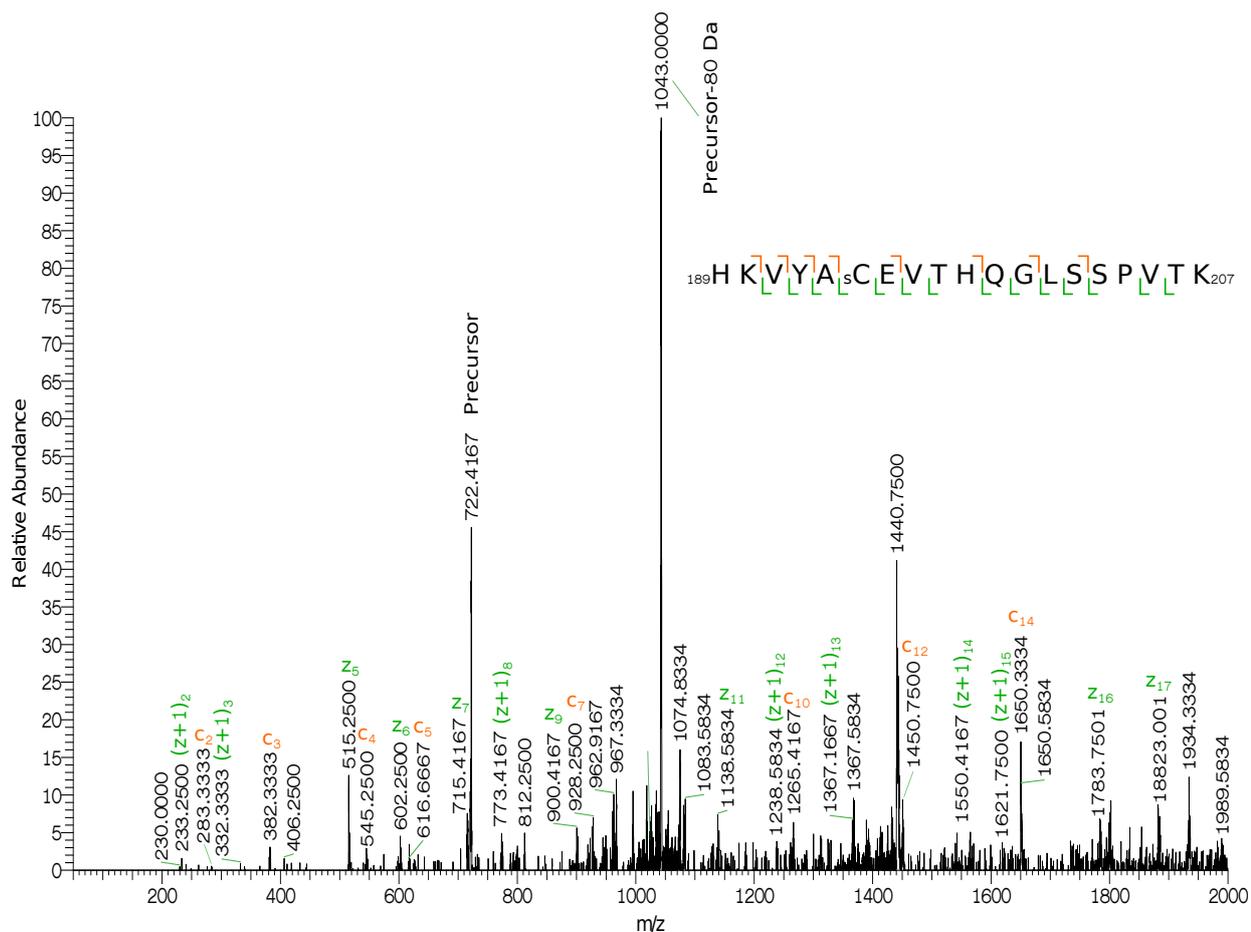


**Abbildung A.15:** HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTKSFNR-GEcC mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 829.69 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup> und entstammt der Probe SC 1211. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2486.05 Da.



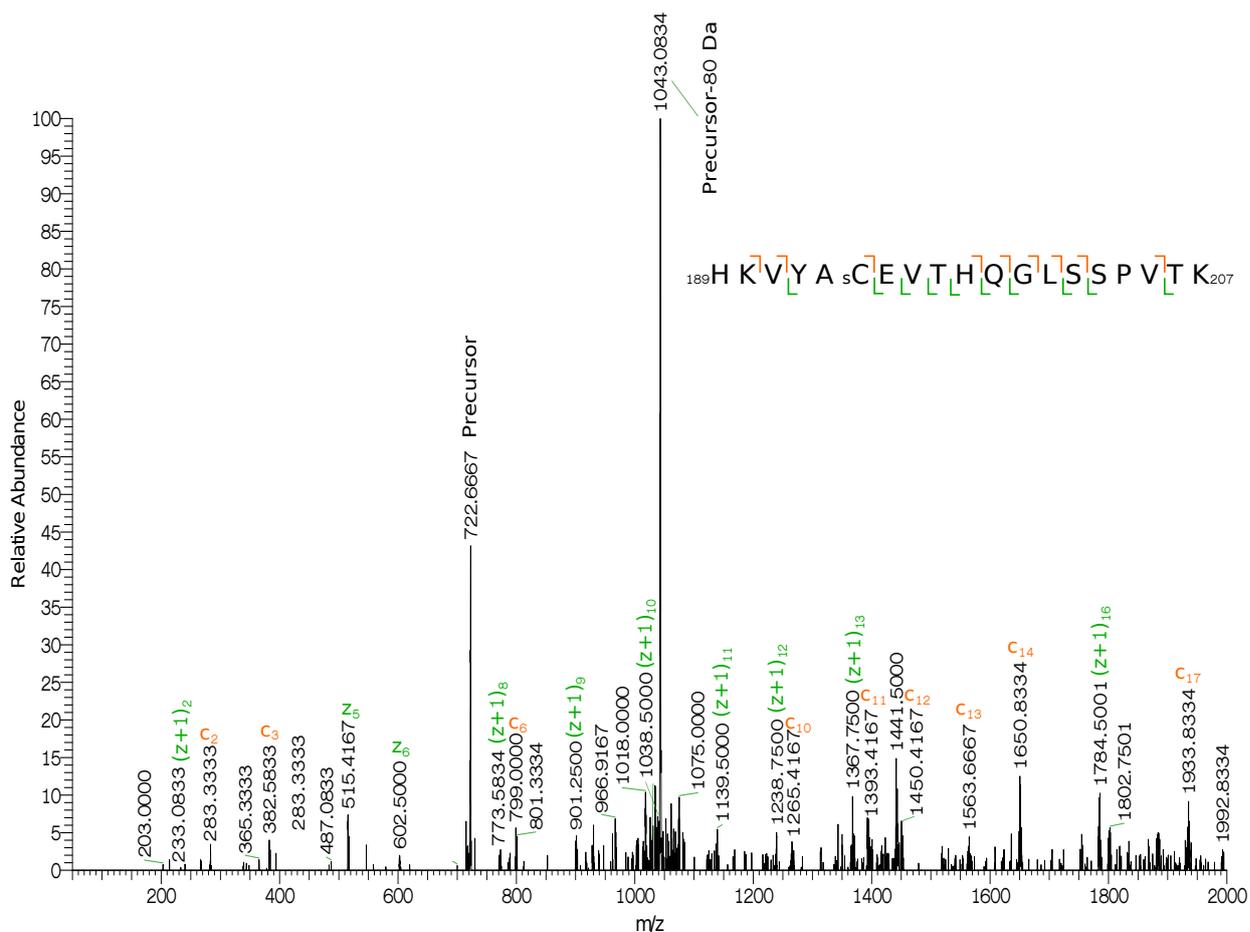
**Abbildung A.16:** HCD-Spektrum des chymotrypsinverdauten Peptids ACEVTHQGLSSPVTKSFNR-GEcC mit einer Sulfonierung am Cystein C194. Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 830.03 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup> und entstammt der Probe WS 1199. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2487.07 Da.

## ETD-Spektren für die Sulfonierung am Cystein C194



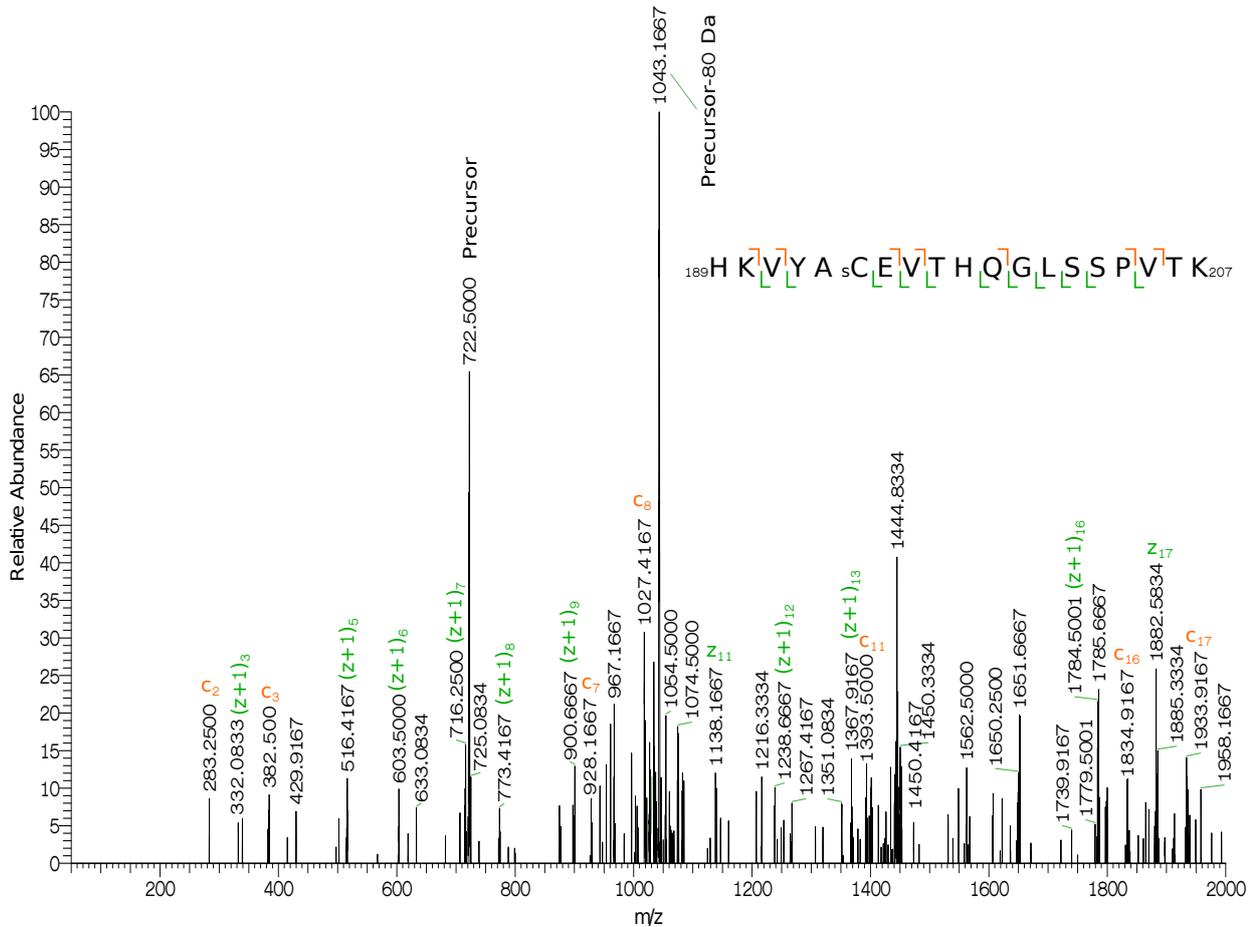
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z	(z+1)	c	z	(z+1)						
155.0927	1	H 19	235.0495	1	H 19						
283.1877	2	K 18	363.1445	2	K 18						
382.2561	3	V 17	462.2129	3	V 17						
545.3194	4	Y 16	625.2762	4	Y 16						
616.3566	5	A 15	696.3134	5	A 15						
719.3657	6	C 14	799.3225	6	C 14						
848.4083	7	E 13	928.3651	7	E 13						
947.4767	8	V 12	1027.4335	8	V 12						
1048.5244	9	T 11	1128.4812	9	T 11						
1185.5833	10	H 10	1265.5401	10	H 10						
1313.6419	11	Q 9	1393.5987	11	Q 9						
1370.6634	12	G 8	1450.6202	12	G 8						
1483.7474	13	L 7	1563.7042	13	L 7						
1570.7795	14	S 6	1650.7363	14	S 6						
1657.8115	15	S 5	1737.7683	15	S 5						
1754.8643	16	P 4	1834.8211	16	P 4						
1853.9327	17	V 3	1933.8895	17	V 3						
1954.9804	18	T 2	2034.9372	18	T 2						
-	19	K 1	-	19	K 1						

**Abbildung A.17: ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids HKVYA<sub>5</sub>CEVTHQGLSSPVT<sub>K</sub> mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SC 1211.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 722.01 und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



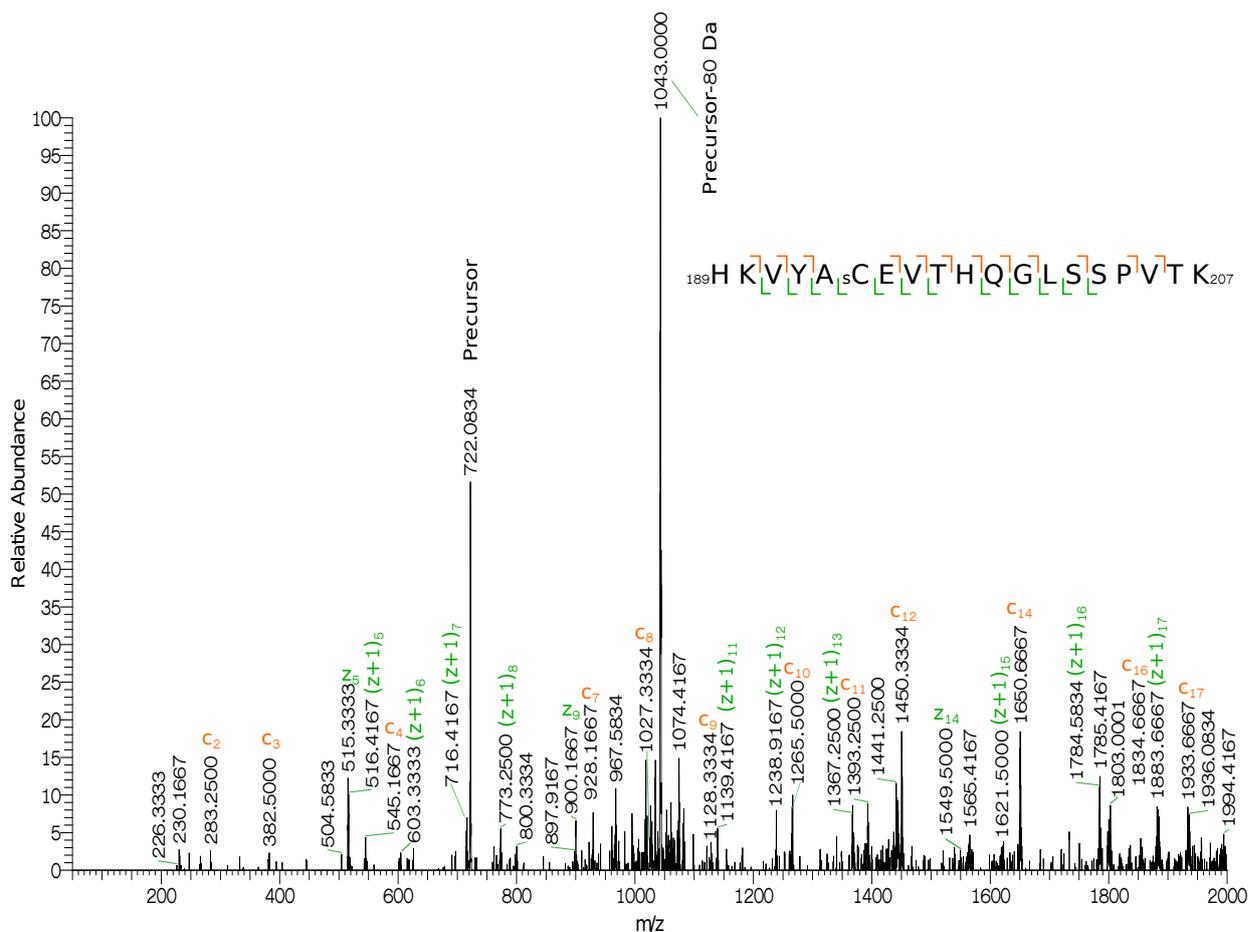
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z		z	(z+1)		c	z		z	(z+1)	
155.0927	1	H	19	-	-	235.0495	1	H	19	-	
283.1877	2	K	18	1930.9817	1931.9895	363.1445	2	K	18	2010.9385	2011.9463
382.2561	3	V	17	1802.8867	1803.8945	462.2129	3	V	17	1882.8435	1883.8513
545.3194	4	Y	16	1703.8183	1704.8261	625.2762	4	Y	16	1783.7751	1784.7829
616.3566	5	A	15	1540.7550	1541.7628	696.3134	5	A	15	1620.7118	1621.7196
719.3657	6	C	14	1469.7179	1470.7257	799.3225	6	C	14	1549.6747	1550.6825
848.4083	7	E	13	1366.7087	1367.7165	928.3651	7	E	13	1446.6655	1447.6733
947.4767	8	V	12	1237.6661	1238.6739	1027.4335	8	V	12	1317.6229	1318.6307
1048.5244	9	T	11	1138.5977	1139.6055	1128.4812	9	T	11	1218.5545	1219.5623
1185.5833	10	H	10	1037.5500	1038.5578	1265.5401	10	H	10	1117.5068	1118.5146
1313.6419	11	Q	9	900.4911	901.4989	1393.5987	11	Q	9	980.4479	981.4557
1370.6634	12	G	8	772.4325	773.4403	1450.6202	12	G	8	852.3893	853.3971
1483.7474	13	L	7	715.4111	716.4189	1563.7042	13	L	7	795.3679	796.3757
1570.7795	14	S	6	602.3270	603.3348	1650.7363	14	S	6	682.2838	683.2916
1657.8115	15	S	5	515.2950	516.3028	1737.7683	15	S	5	595.2518	596.2596
1754.8643	16	P	4	428.2629	429.2707	1834.8211	16	P	4	508.2197	509.2275
1853.9327	17	V	3	331.2102	332.2180	1933.8895	17	V	3	411.1670	412.1748
1954.9804	18	T	2	232.1418	233.1496	2034.9372	18	T	2	312.0986	313.1064
-	19	K	1	131.0941	132.1019	-	19	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.18:** ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids HKVYA<sub>s</sub>CEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten WS 1199. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 722.35 und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



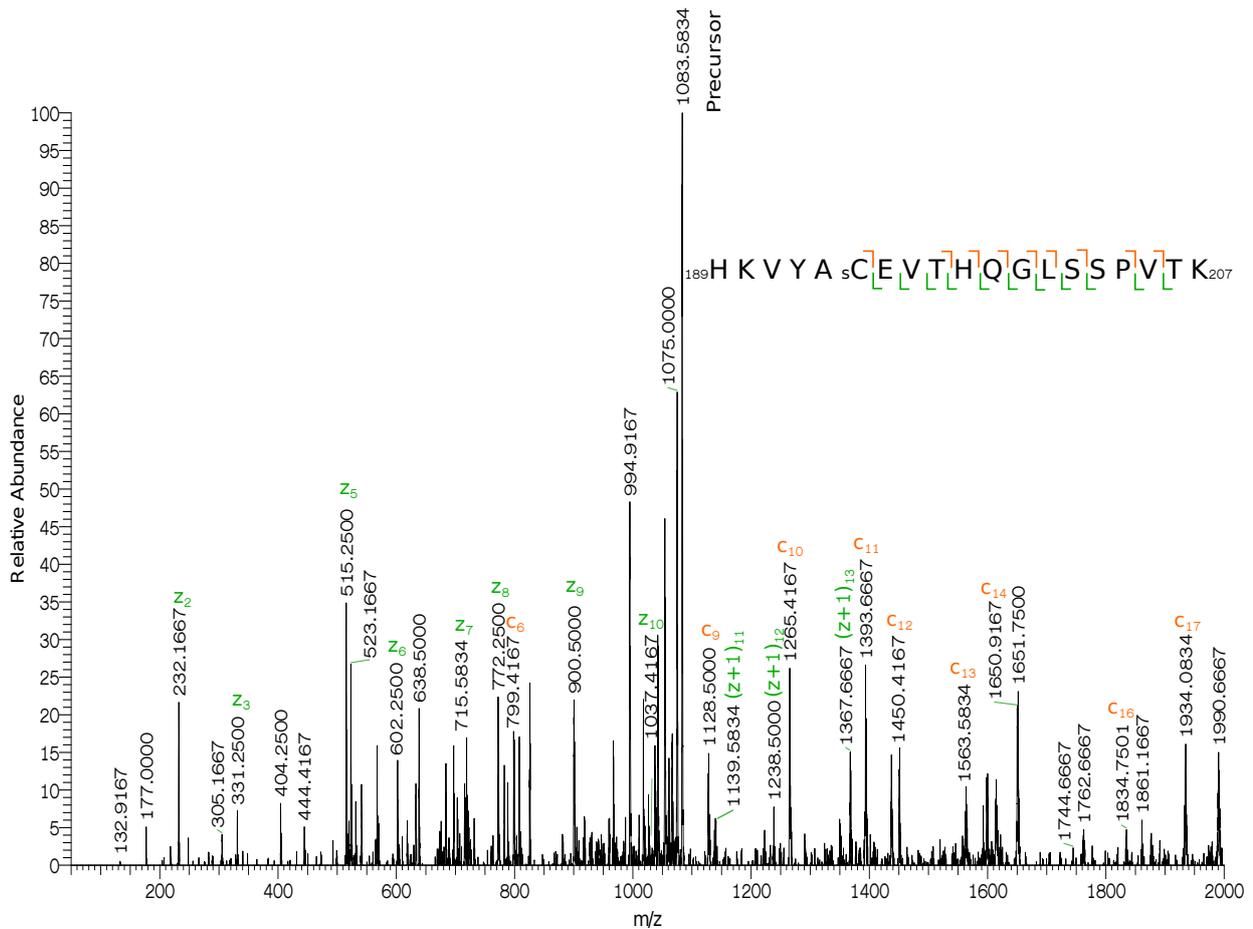
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z			(z+1)		c	z			(z+1)	
155.0927	1	H	19	-	-	235.0495	1	H	19	-	-
283.1877	2	K	18	1930.9817	1931.9895	363.1445	2	K	18	2010.9385	2011.9463
382.2561	3	V	17	1802.8867	1803.8945	462.2129	3	V	17	1882.8435	1883.8513
545.3194	4	Y	16	1703.8183	1704.8261	625.2762	4	Y	16	1783.7751	1784.7829
616.3566	5	A	15	1540.7550	1541.7628	696.3134	5	A	15	1620.7118	1621.7196
719.3657	6	C	14	1469.7179	1470.7257	799.3225	6	C	14	1549.6747	1550.6825
848.4083	7	E	13	1366.7087	1367.7165	928.3651	7	E	13	1446.6655	1447.6733
947.4767	8	V	12	1237.6661	1238.6739	1027.4335	8	V	12	1317.6229	1318.6307
1048.5244	9	T	11	1138.5977	1139.6055	1128.4812	9	T	11	1218.5545	1219.5623
1185.5833	10	H	10	1037.5500	1038.5578	1265.5401	10	H	10	1117.5068	1118.5146
1313.6419	11	Q	9	900.4911	901.4989	1393.5987	11	Q	9	980.4479	981.4557
1370.6634	12	G	8	772.4325	773.4403	1450.6202	12	G	8	852.3893	853.3971
1483.7474	13	L	7	715.4111	716.4189	1563.7042	13	L	7	795.3679	796.3757
1570.7795	14	S	6	602.3270	603.3348	1650.7363	14	S	6	682.2838	683.2916
1657.8115	15	S	5	515.2950	516.3028	1737.7683	15	S	5	595.2518	596.2596
1754.8643	16	P	4	428.2629	429.2707	1834.8211	16	P	4	508.2197	509.2275
1853.9327	17	V	3	331.2102	332.2180	1933.8895	17	V	3	411.1670	412.1748
1954.9804	18	T	2	232.1418	233.1496	2034.9372	18	T	2	312.0986	313.1064
-	19	K	1	131.0941	132.1019	-	19	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.19: ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids HKVYAsCEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten EW 1046.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 722.35 und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



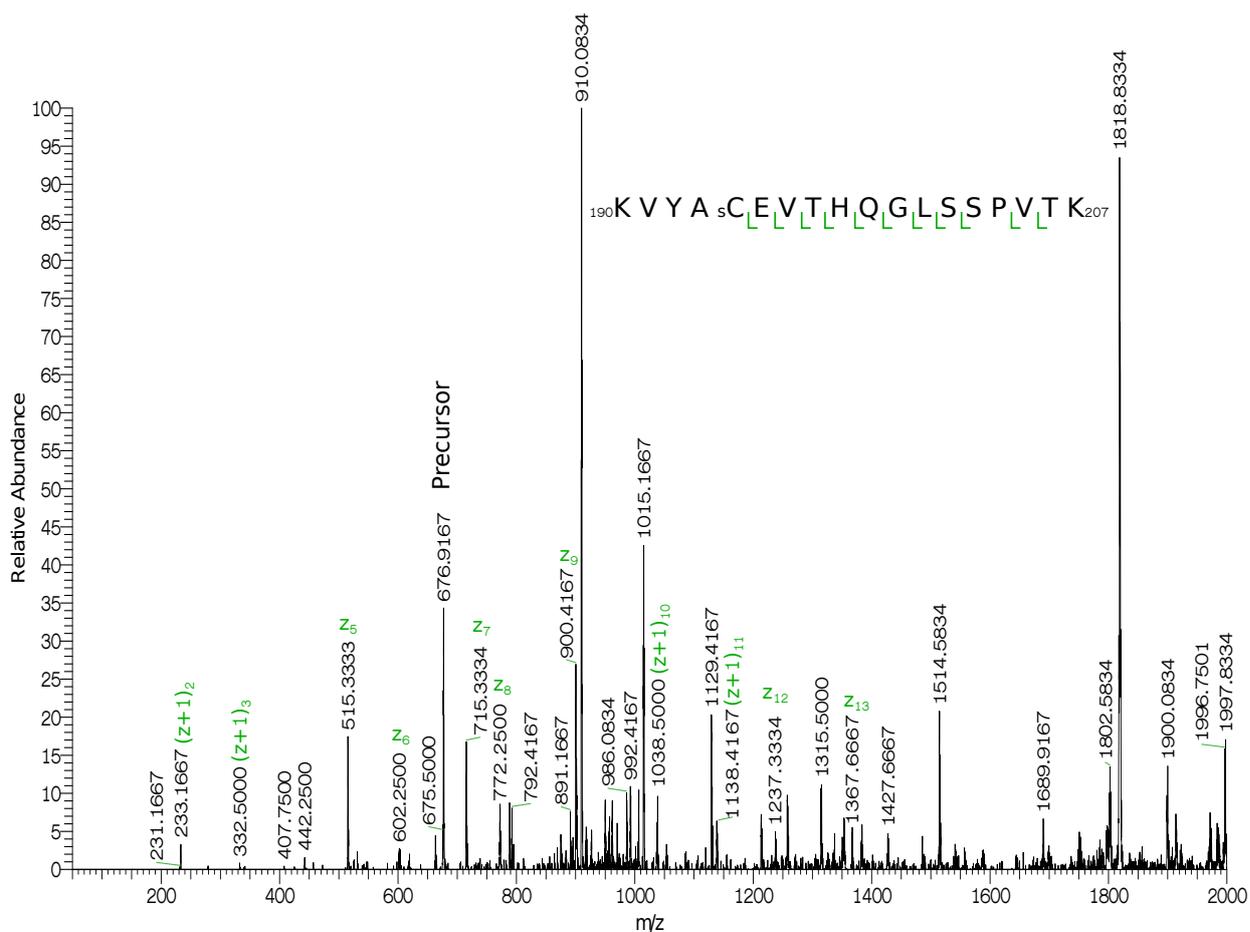
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z		(z+1)			c	z		(z+1)		
155.0927	1	H	19	-	-	235.0495	1	H	19	-	-
283.1877	2	K	18	1930.9817	1931.9895	363.1445	2	K	18	2010.9385	2011.9463
382.2561	3	V	17	1802.8867	1803.8945	462.2129	3	V	17	1882.8435	1883.8513
545.3194	4	Y	16	1703.8183	1704.8261	625.2762	4	Y	16	1783.7751	1784.7829
616.3566	5	A	15	1540.7550	1541.7628	696.3134	5	A	15	1620.7118	1621.7196
719.3657	6	C	14	1469.7179	1470.7257	799.3225	6	C	14	1549.6747	1550.6825
848.4083	7	E	13	1366.7087	1367.7165	928.3651	7	E	13	1446.6655	1447.6733
947.4767	8	V	12	1237.6661	1238.6739	1027.4335	8	V	12	1317.6229	1318.6307
1048.5244	9	T	11	1138.5977	1139.6055	1128.4812	9	T	11	1218.5545	1219.5623
1185.5833	10	H	10	1037.5500	1038.5578	1265.5401	10	H	10	1117.5068	1118.5146
1313.6419	11	Q	9	900.4911	901.4989	1393.5987	11	Q	9	980.4479	981.4557
1370.6634	12	G	8	772.4325	773.4403	1450.6202	12	G	8	852.3893	853.3971
1483.7474	13	L	7	715.4111	716.4189	1563.7042	13	L	7	795.3679	796.3757
1570.7795	14	S	6	602.3270	603.3348	1650.7363	14	S	6	682.2838	683.2916
1657.8115	15	S	5	515.2950	516.3028	1737.7683	15	S	5	595.2518	596.2596
1754.8643	16	P	4	428.2629	429.2707	1834.8211	16	P	4	508.2197	509.2275
1853.9327	17	V	3	331.2102	332.2180	1933.8895	17	V	3	411.1670	412.1748
1954.9804	18	T	2	232.1418	233.1496	2034.9372	18	T	2	312.0986	313.1064
-	19	K	1	131.0941	132.1019	-	19	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.20:** ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids HKVYAsCEVTHQGLSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SP 1070. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 722.34 und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



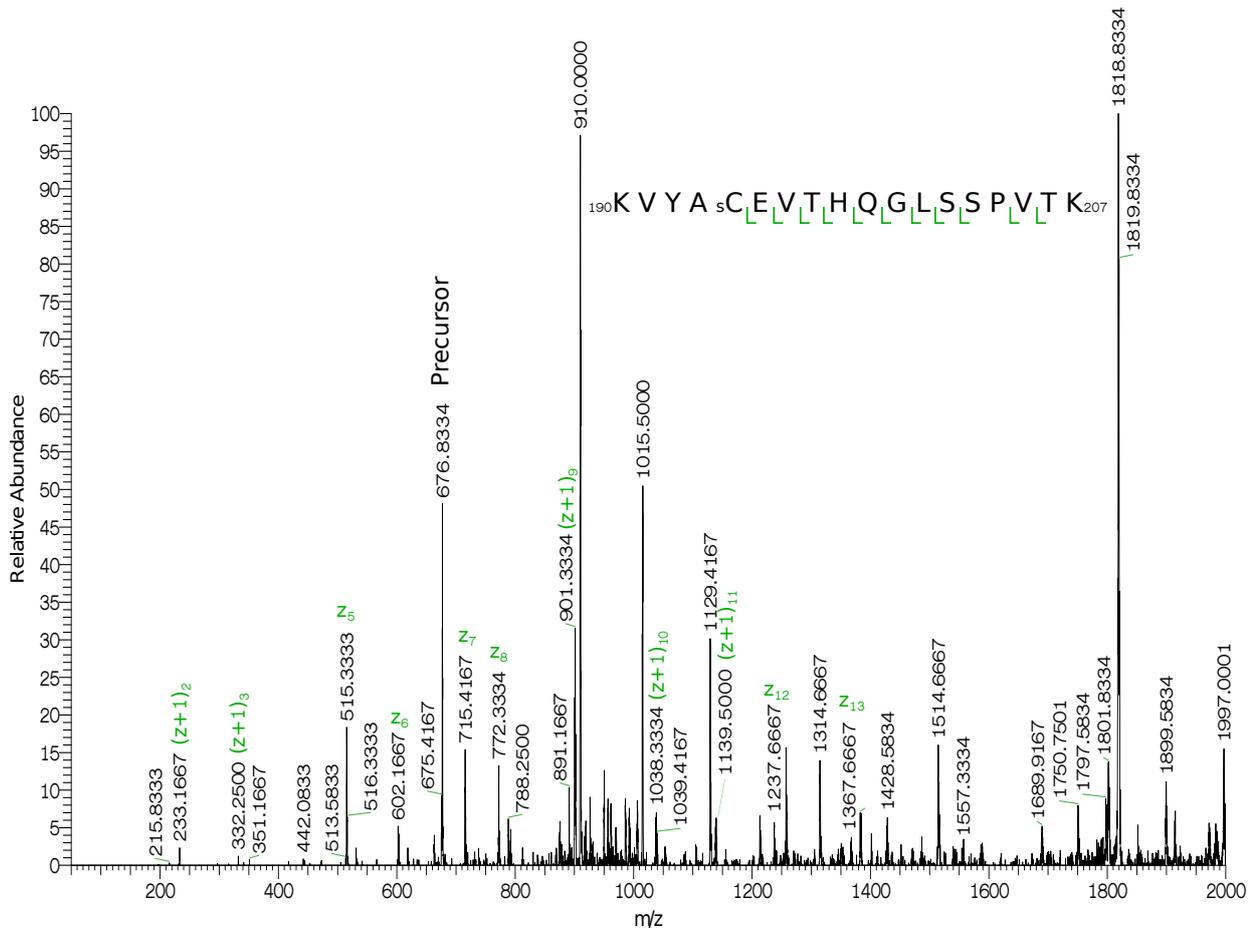
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)
155.0927	1	H	19	-	-	235.0495	1	H	19	-	-
283.1877	2	K	18	1930.9817	1931.9895	363.1445	2	K	18	2010.9385	2011.9463
382.2561	3	V	17	1802.8867	1803.8945	462.2129	3	V	17	1882.8435	1883.8513
545.3194	4	Y	16	1703.8183	1704.8261	625.2762	4	Y	16	1783.7751	1784.7829
616.3566	5	A	15	1540.7550	1541.7628	696.3134	5	A	15	1620.7118	1621.7196
719.3657	6	C	14	1469.7179	1470.7257	799.3225	6	C	14	1549.6747	1550.6825
848.4083	7	E	13	1366.7087	1367.7165	928.3651	7	E	13	1446.6655	1447.6733
947.4767	8	V	12	1237.6661	1238.6739	1027.4335	8	V	12	1317.6229	1318.6307
1048.5244	9	T	11	1138.5977	1139.6055	1128.4812	9	T	11	1218.5545	1219.5623
1185.5833	10	H	10	1037.5500	1038.5578	1265.5401	10	H	10	1117.5068	1118.5146
1313.6419	11	Q	9	900.4911	901.4989	1393.5987	11	Q	9	980.4479	981.4557
1370.6634	12	G	8	772.4325	773.4403	1450.6202	12	G	8	852.3893	853.3971
1483.7474	13	L	7	715.4111	716.4189	1563.7042	13	L	7	795.3679	796.3757
1570.7795	14	S	6	602.3270	603.3348	1650.7363	14	S	6	682.2838	683.2916
1657.8115	15	S	5	515.2950	516.3028	1737.7683	15	S	5	595.2518	596.2596
1754.8643	16	P	4	428.2629	429.2707	1834.8211	16	P	4	508.2197	509.2275
1853.9327	17	V	3	331.2102	332.2180	1933.8895	17	V	3	411.1670	412.1748
1954.9804	18	T	2	232.1418	233.1496	2034.9372	18	T	2	312.0986	313.1064
-	19	K	1	131.0941	132.1019	-	19	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.21: ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids HKVYAsCEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten KR 1159.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 541.77 und einer Ladung von 4<sup>+</sup>. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



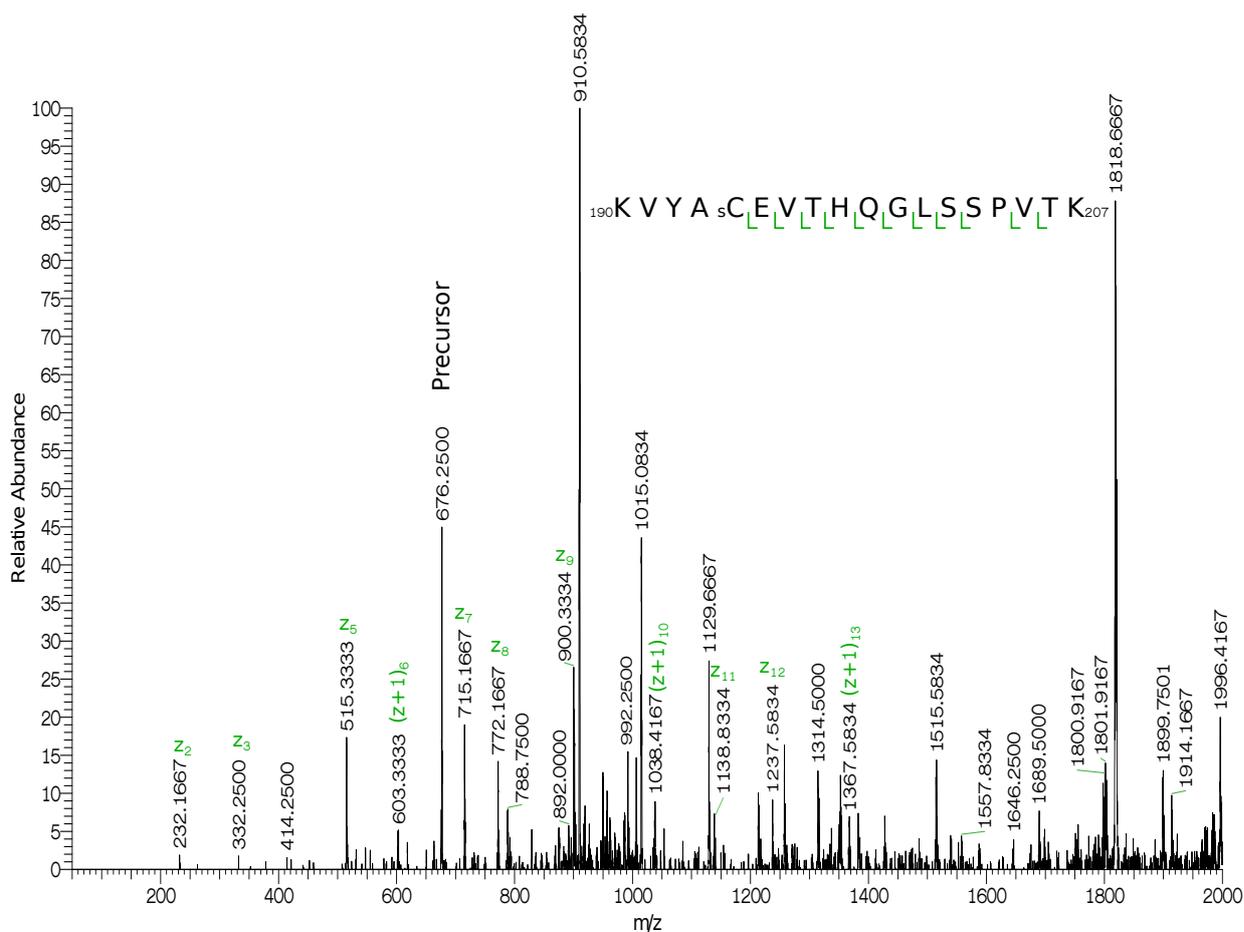
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z		(z+1)			c	z		(z+1)		
146.1288	1	K	18	-	-	226.0856	1	K	18	-	-
245.1972	2	V	17	1802.8867	1803.8945	325.1540	2	V	17	1882.8435	1883.8513
408.2605	3	Y	16	1703.8183	1704.8261	488.2173	3	Y	16	1783.7751	1784.7829
479.2976	4	A	15	1540.7550	1541.7628	559.2544	4	A	15	1620.7118	1621.7196
582.3068	5	C	14	1469.7179	1470.7257	662.2636	5	C	14	1549.6747	1550.6825
711.3494	6	E	13	1366.7087	1367.7165	791.3062	6	E	13	1446.6655	1447.6733
810.4178	7	V	12	1237.6661	1238.6739	890.3746	7	V	12	1317.6229	1318.6307
911.4655	8	T	11	1138.5977	1139.6055	991.4223	8	T	11	1218.5545	1219.5623
1048.5244	9	H	10	1037.5500	1038.5578	1128.4812	9	H	10	1117.5068	1118.5146
1176.583	10	Q	9	900.4911	901.4989	1256.5398	10	Q	9	980.4479	981.4557
1233.6045	11	G	8	772.4325	773.4403	1313.5613	11	G	8	852.3893	853.3971
1346.6885	12	L	7	715.4111	716.4189	1426.6453	12	L	7	795.3679	796.3757
1433.7206	13	S	6	602.3270	603.3348	1513.6774	13	S	6	682.2838	683.2916
1520.7526	14	S	5	515.2950	516.3028	1600.7094	14	S	5	595.2518	596.2596
1617.8054	15	P	4	428.2629	429.2707	1697.7622	15	P	4	508.2197	509.2275
1716.8738	16	V	3	331.2102	332.2180	1796.8306	16	V	3	411.1670	412.1748
1817.9214	17	T	2	232.1418	233.1496	1897.8782	17	T	2	312.0986	313.1064
-	18	K	1	131.0941	132.1019	-	18	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.22:** ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids KQVYA<sub>s</sub>CEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten GI 1206. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 676.98 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2027.92 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



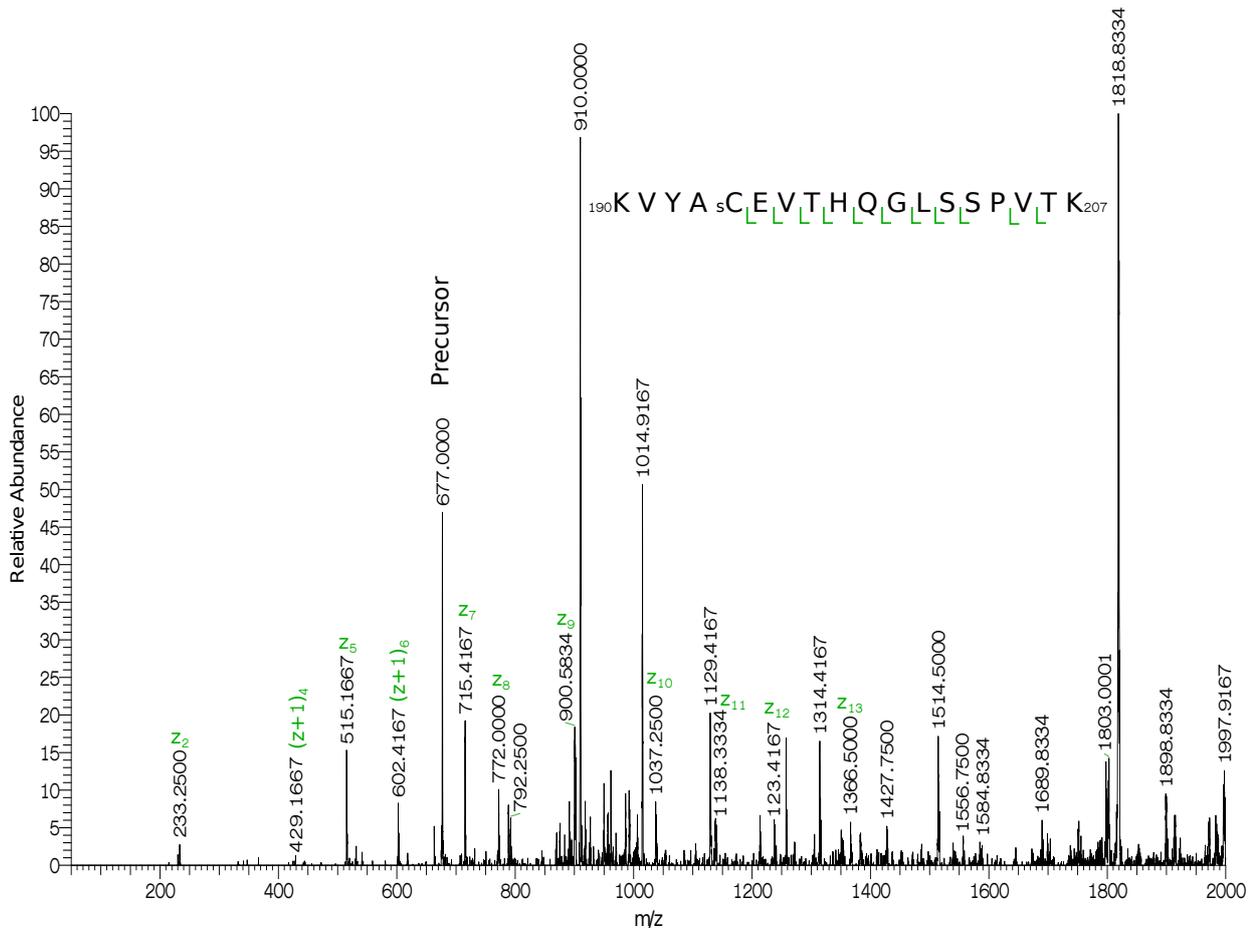
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c			z	(z+1)		c		z	(z+1)		
146.1288	1	K	18	-	-	226.0856	1	K	18	-	-
245.1972	2	V	17	1802.8867	1803.8945	325.1540	2	V	17	1882.8435	1883.8513
408.2605	3	Y	16	1703.8183	1704.8261	488.2173	3	Y	16	1783.7751	1784.7829
479.2976	4	A	15	1540.7550	1541.7628	559.2544	4	A	15	1620.7118	1621.7196
582.3068	5	C	14	1469.7179	1470.7257	662.2636	5	C	14	1549.6747	1550.6825
711.3494	6	E	13	1366.7087	1367.7165	791.3062	6	E	13	1446.6655	1447.6733
810.4178	7	V	12	1237.6661	1238.6739	890.3746	7	V	12	1317.6229	1318.6307
911.4655	8	T	11	1138.5977	1139.6055	991.4223	8	T	11	1218.5545	1219.5623
1048.5244	9	H	10	1037.5500	1038.5578	1128.4812	9	H	10	1117.5068	1118.5146
1176.583	10	Q	9	900.4911	901.4989	1256.5398	10	Q	9	980.4479	981.4557
1233.6045	11	G	8	772.4325	773.4403	1313.5613	11	G	8	852.3893	853.3971
1346.6885	12	L	7	715.4111	716.4189	1426.6453	12	L	7	795.3679	796.3757
1433.7206	13	S	6	602.3270	603.3348	1513.6774	13	S	6	682.2838	683.2916
1520.7526	14	S	5	515.2950	516.3028	1600.7094	14	S	5	595.2518	596.2596
1617.8054	15	P	4	428.2629	429.2707	1697.7622	15	P	4	508.2197	509.2275
1716.8738	16	V	3	331.2102	332.2180	1796.8306	16	V	3	411.1670	412.1748
1817.9214	17	T	2	232.1418	233.1496	1897.8782	17	T	2	312.0986	313.1064
-	18	K	1	131.0941	132.1019	-	18	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.23: ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids KQVYAsCEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SC 1211.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem  $m/z$  von 676.65 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse  $[M]$  von 2026.93 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die  $m/z$  der  $z$ -,  $(z+1)$ - und  $c$ -Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



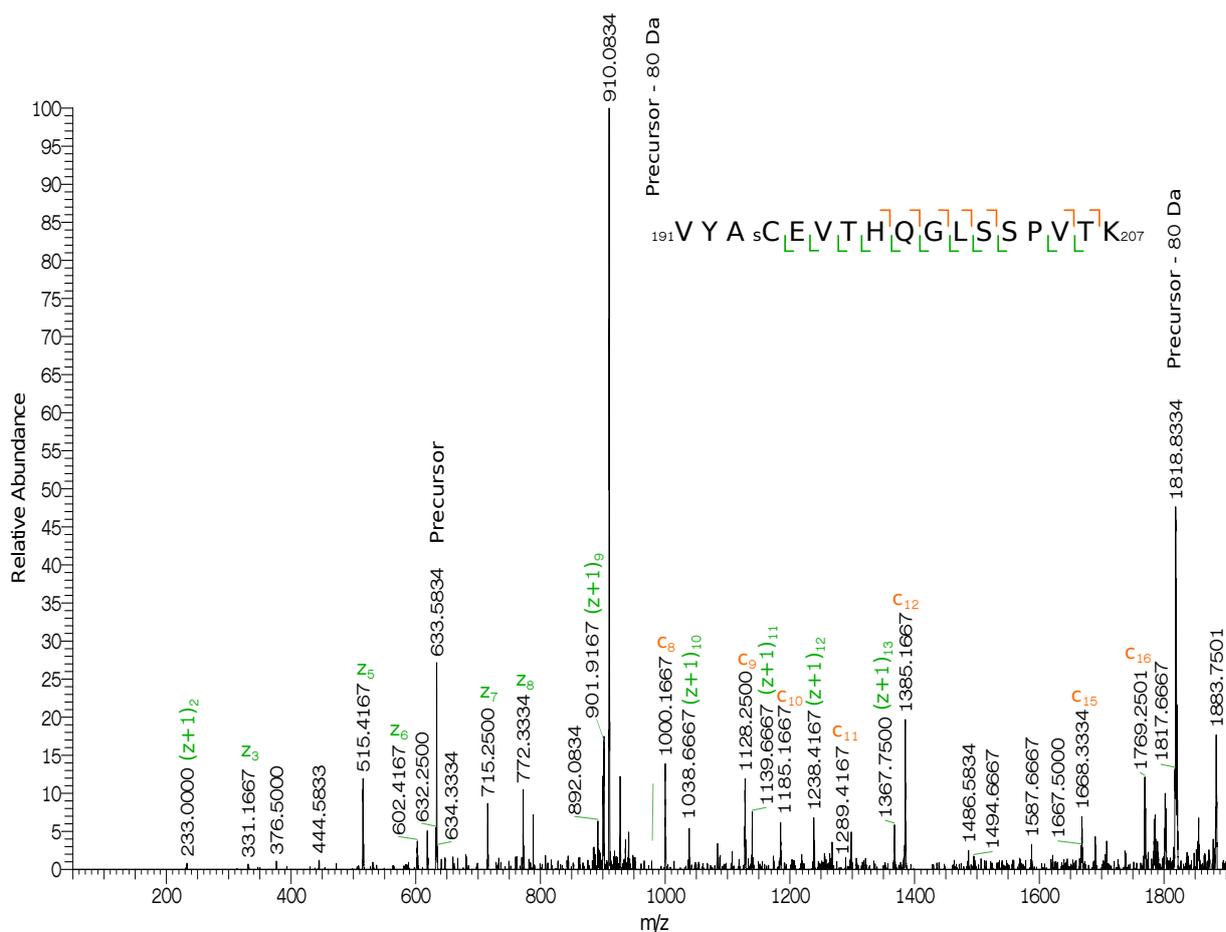
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)
146.1288	1	K	18	-	-	226.0856	1	K	18	-	-
245.1972	2	V	17	1802.8867	1803.8945	325.1540	2	V	17	1882.8435	1883.8513
408.2605	3	Y	16	1703.8183	1704.8261	488.2173	3	Y	16	1783.7751	1784.7829
479.2976	4	A	15	1540.7550	1541.7628	559.2544	4	A	15	1620.7118	1621.7196
582.3068	5	C	14	1469.7179	1470.7257	662.2636	5	C	14	1549.6747	1550.6825
711.3494	6	E	13	1366.7087	1367.7165	791.3062	6	E	13	1446.6655	1447.6733
810.4178	7	V	12	1237.6661	1238.6739	890.3746	7	V	12	1317.6229	1318.6307
911.4655	8	T	11	1138.5977	1139.6055	991.4223	8	T	11	1218.5545	1219.5623
1048.5244	9	H	10	1037.5500	1038.5578	1128.4812	9	H	10	1117.5068	1118.5146
1176.583	10	Q	9	900.4911	901.4989	1256.5398	10	Q	9	980.4479	981.4557
1233.6045	11	G	8	772.4325	773.4403	1313.5613	11	G	8	852.3893	853.3971
1346.6885	12	L	7	715.4111	716.4189	1426.6453	12	L	7	795.3679	796.3757
1433.7206	13	S	6	602.3270	603.3348	1513.6774	13	S	6	682.2838	683.2916
1520.7526	14	S	5	515.2950	516.3028	1600.7094	14	S	5	595.2518	596.2596
1617.8054	15	P	4	428.2629	429.2707	1697.7622	15	P	4	508.2197	509.2275
1716.8738	16	V	3	331.2102	332.2180	1796.8306	16	V	3	411.1670	412.1748
1817.9214	17	T	2	232.1418	233.1496	1897.8782	17	T	2	312.0986	313.1064
-	18	K	1	131.0941	132.1019	-	18	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.24:** ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids KQVYA<sub>s</sub>CEVTHQGLSSPVT<sub>K</sub> mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten WS 1199. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 676.98 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2027.92 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



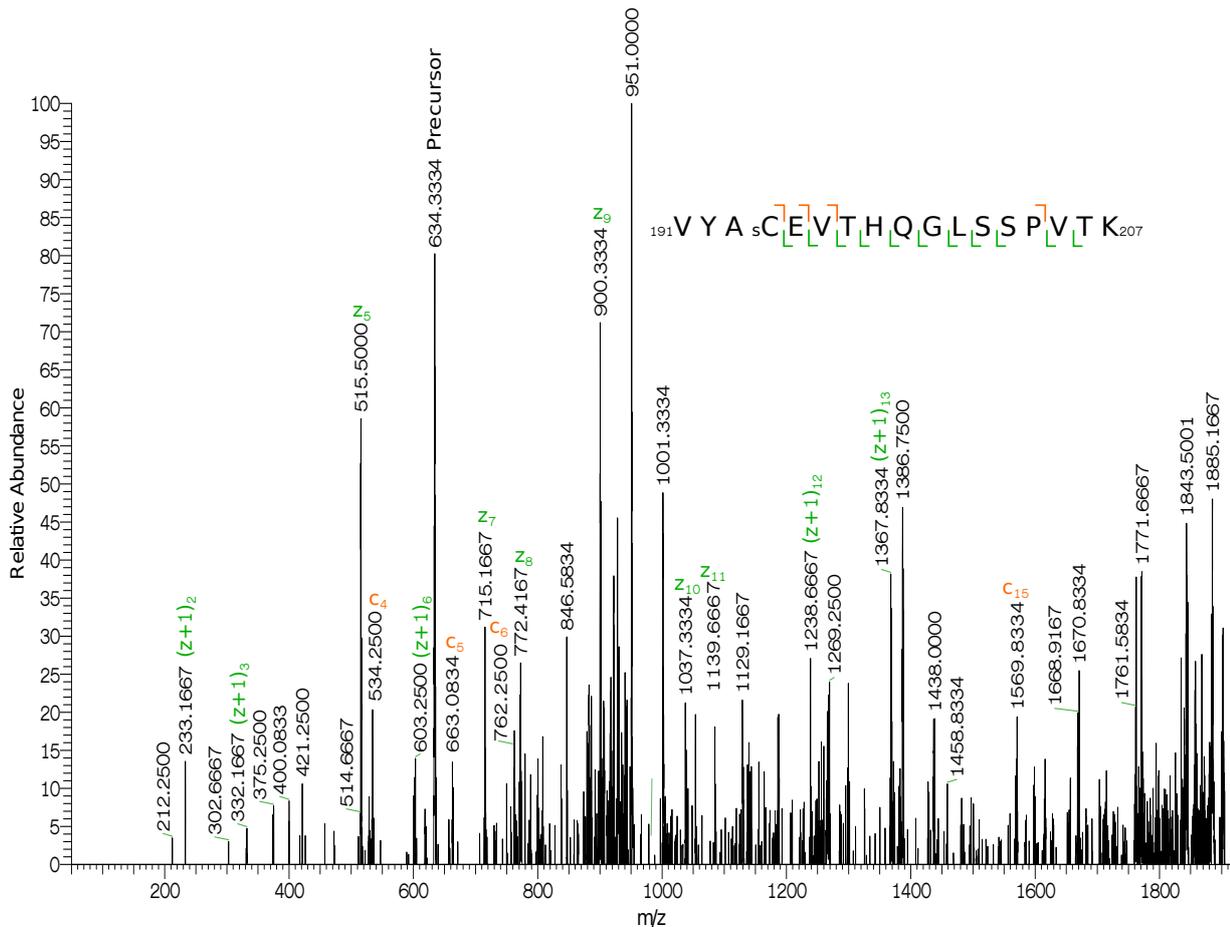
Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)
146.1288	1	K	18	-	-	226.0856	1	K	18	-	-
245.1972	2	V	17	1802.8867	1803.8945	325.1540	2	V	17	1882.8435	1883.8513
408.2605	3	Y	16	1703.8183	1704.8261	488.2173	3	Y	16	1783.7751	1784.7829
479.2976	4	A	15	1540.7550	1541.7628	559.2544	4	A	15	1620.7118	1621.7196
582.3068	5	C	14	1469.7179	1470.7257	662.2636	5	C	14	1549.6747	1550.6825
711.3494	6	E	13	1366.7087	1367.7165	791.3062	6	E	13	1446.6655	1447.6733
810.4178	7	V	12	1237.6661	1238.6739	890.3746	7	V	12	1317.6229	1318.6307
911.4655	8	T	11	1138.5977	1139.6055	991.4223	8	T	11	1218.5545	1219.5623
1048.5244	9	H	10	1037.5500	1038.5578	1128.4812	9	H	10	1117.5068	1118.5146
1176.583	10	Q	9	900.4911	901.4989	1256.5398	10	Q	9	980.4479	981.4557
1233.6045	11	G	8	772.4325	773.4403	1313.5613	11	G	8	852.3893	853.3971
1346.6885	12	L	7	715.4111	716.4189	1426.6453	12	L	7	795.3679	796.3757
1433.7206	13	S	6	602.3270	603.3348	1513.6774	13	S	6	682.2838	683.2916
1520.7526	14	S	5	515.2950	516.3028	1600.7094	14	S	5	595.2518	596.2596
1617.8054	15	P	4	428.2629	429.2707	1697.7622	15	P	4	508.2197	509.2275
1716.8738	16	V	3	331.2102	332.2180	1796.8306	16	V	3	411.1670	412.1748
1817.9214	17	T	2	232.1418	233.1496	1897.8782	17	T	2	312.0986	313.1064
-	18	K	1	131.0941	132.1019	-	18	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.25: ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids KVYAsCEVTHQGLSSPVTK mit einer Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 676.65 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2026.93 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.



Ohne Sulfonierung						Mit Sulfonierung					
c			z	(z+1)		c			z	(z+1)	
117.1022	1	V	17	-	-	197.0590	1	V	17	-	
280.1656	2	Y	16	1703.8183	1704.8261	360.1224	2	Y	16	1783.7751	
351.2027	3	A	15	1540.7550	1541.7628	431.1595	3	A	15	1620.7118	
454.2119	4	C	14	1469.7179	1470.7257	534.1687	4	C	14	1549.6747	
583.2545	5	E	13	1366.7087	1367.7165	663.2113	5	E	13	1446.6655	
682.3229	6	V	12	1237.6661	1238.6739	762.2797	6	V	12	1317.6229	
783.3706	7	T	11	1138.5977	1139.6055	863.3274	7	T	11	1218.5545	
920.4295	8	H	10	1037.5500	1038.5578	1000.3863	8	H	10	1117.5068	
1048.4880	9	Q	9	900.4911	901.4989	1128.4448	9	Q	9	980.4479	
1105.5095	10	G	8	772.4325	773.4403	1185.4663	10	G	8	852.3893	
1218.5936	11	L	7	715.4111	716.4189	1298.5504	11	L	7	795.3679	
1305.6256	12	S	6	602.3270	603.3348	1385.5824	12	S	6	682.2838	
1392.6558	13	S	5	515.2950	516.3028	1472.6126	13	S	5	595.2518	
1489.7104	14	P	4	428.2630	429.2708	1569.6672	14	P	4	508.2198	
1588.7788	15	V	3	331.2102	332.2180	1668.7356	15	V	3	411.1670	
1689.8265	16	T	2	232.1418	233.1496	1769.7833	16	T	2	312.0986	
-	17	K	1	131.0941	132.1019	-	17	K	1	211.0509	

**Abbildung A.26: ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids VYACEVTHQGLSSPVTK mit einer wahrscheinlichen Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 633.63 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1897.87 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.

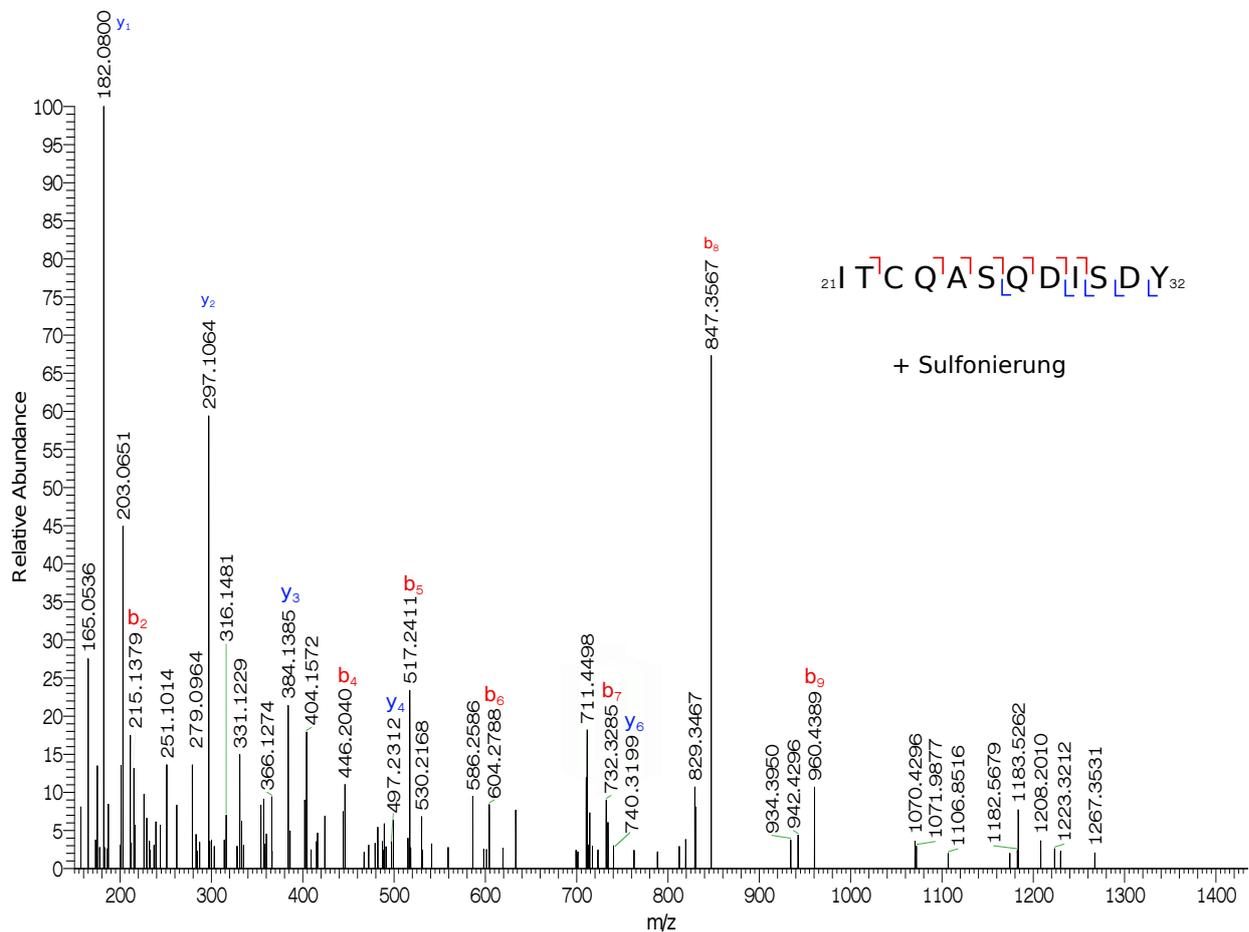


c	Ohne Sulfonierung					Mit Sulfonierung					
	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)	c	z	(z+1)		
117.1022	1	V	17	-	-	197.0590	1	V	17	-	-
280.1656	2	Y	16	1703.8183	1704.8261	360.1224	2	Y	16	1783.7751	1784.7829
351.2027	3	A	15	1540.7550	1541.7628	431.1595	3	A	15	1620.7118	1621.7196
454.2119	4	C	14	1469.7179	1470.7257	534.1687	4	C	14	1549.6747	1550.6825
583.2545	5	E	13	1366.7087	1367.7165	663.2113	5	E	13	1446.6655	1447.6733
682.3229	6	V	12	1237.6661	1238.6739	762.2797	6	V	12	1317.6229	1318.6307
783.3706	7	T	11	1138.5977	1139.6055	863.3274	7	T	11	1218.5545	1219.5623
920.4295	8	H	10	1037.5500	1038.5578	1000.3863	8	H	10	1117.5068	1118.5146
1048.4880	9	Q	9	900.4911	901.4989	1128.4448	9	Q	9	980.4479	981.4557
1105.5095	10	G	8	772.4325	773.4403	1185.4663	10	G	8	852.3893	853.3971
1218.5936	11	L	7	715.4111	716.4189	1298.5504	11	L	7	795.3679	796.3757
1305.6256	12	S	6	602.3270	603.3348	1385.5824	12	S	6	682.2838	683.2916
1392.6558	13	S	5	515.2950	516.3028	1472.6126	13	S	5	595.2518	596.2596
1489.7104	14	P	4	428.2630	429.2708	1569.6672	14	P	4	508.2198	509.2276
1588.7788	15	V	3	331.2102	332.2180	1668.7356	15	V	3	411.1670	412.1748
1689.8265	16	T	2	232.1418	233.1496	1769.7833	16	T	2	312.0986	313.1064
-	17	K	1	131.0941	132.1019	-	17	K	1	211.0509	212.0587

**Abbildung A.27: ETD-Spektrum des trypsinverdauten Peptids VYACEVTHQGLSSPVTK mit einer wahrscheinlichen Sulfonierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten KR 1159.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit dem m/z von 634.32 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1899.94 Da. Zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sulfonierung wurden die m/z der z-, (z+1)- und c-Ionen sowohl ohne als auch mit Sulfonierung dargestellt. Die im Spektrum gefundenen Ionen wurden in der Tabelle grün bzw. orange markiert.

## A.2.1.2 Sulfonierung am Cystein C23

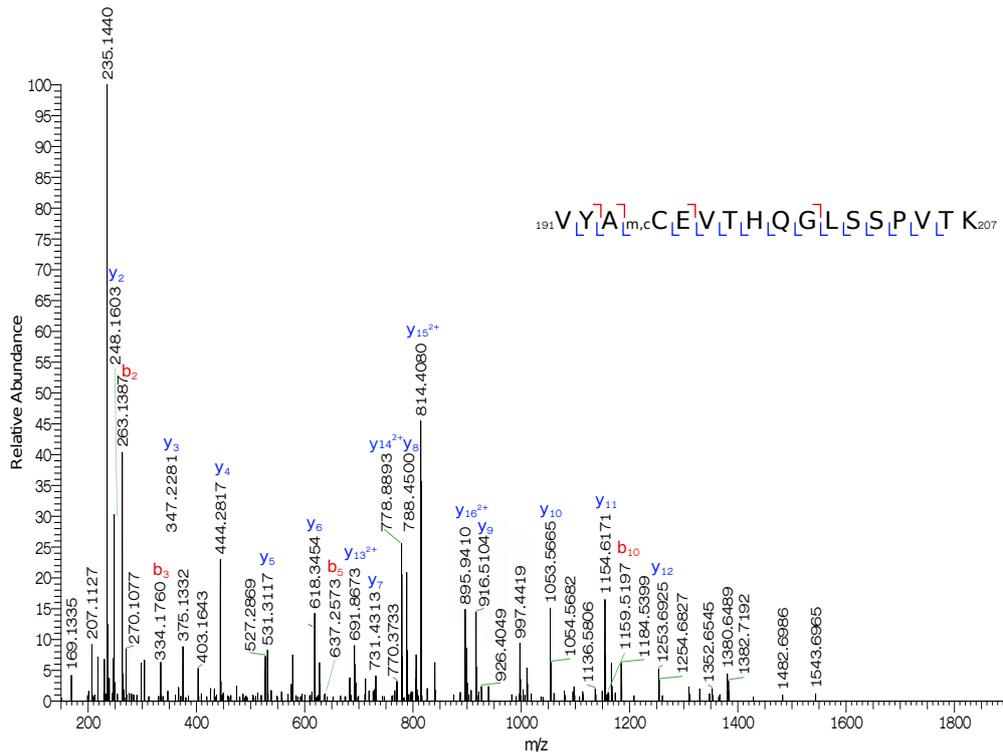
# Thermolysin-Spektrum für die Sulfonierung am Cystein C23



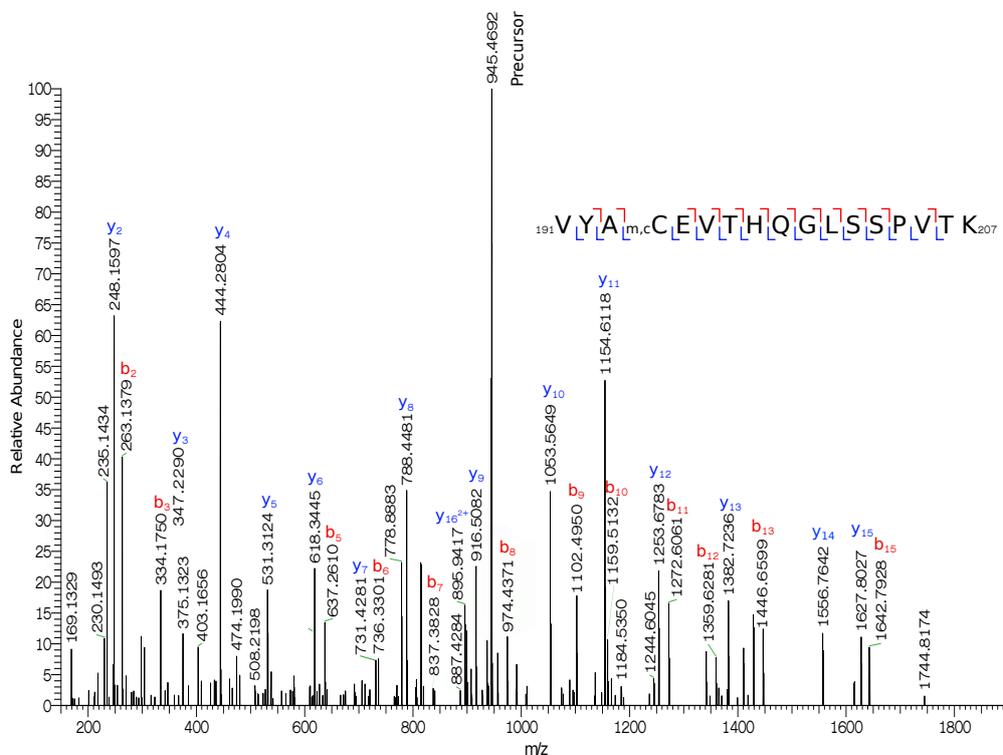
**Abbildung A.28: HCD-Spektrum des Thermolysin-verdauten Peptids ITCQASQDISDY mit einer Sulfonierung am Cystein C23.** Dieses Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 712.27 Da und einer Ladung von 2<sup>+</sup> und entstammt der Probe SP 1070. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1422.53.00 Da.

## **A.2.2 Methylierungen**

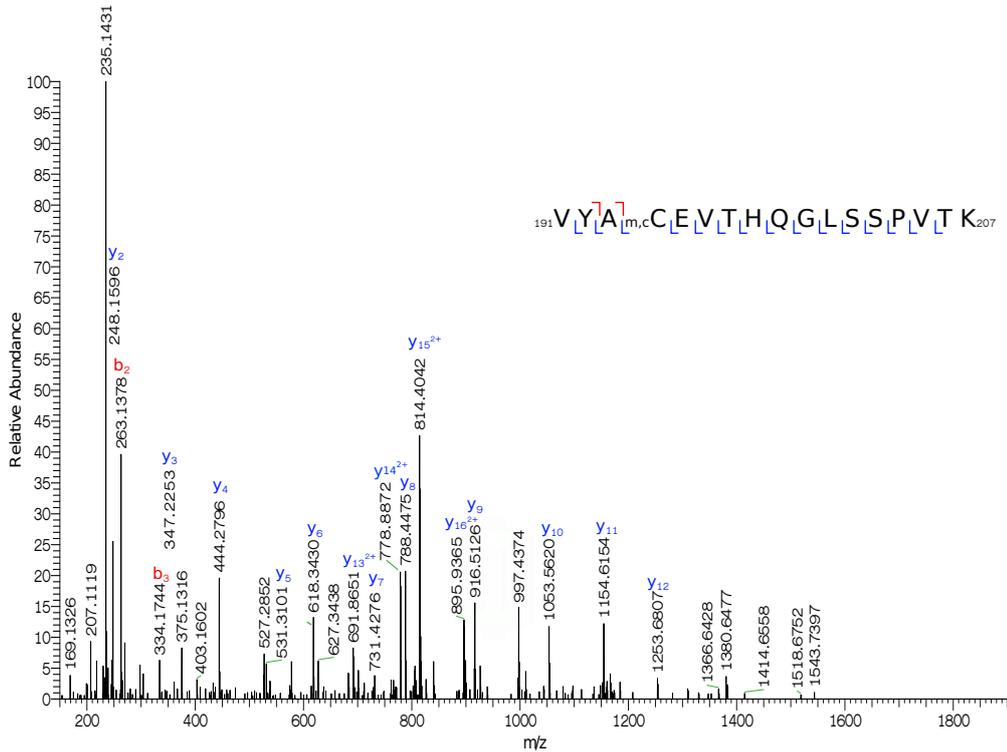
HCD-Spektren für die Methylierung am Cystein C194



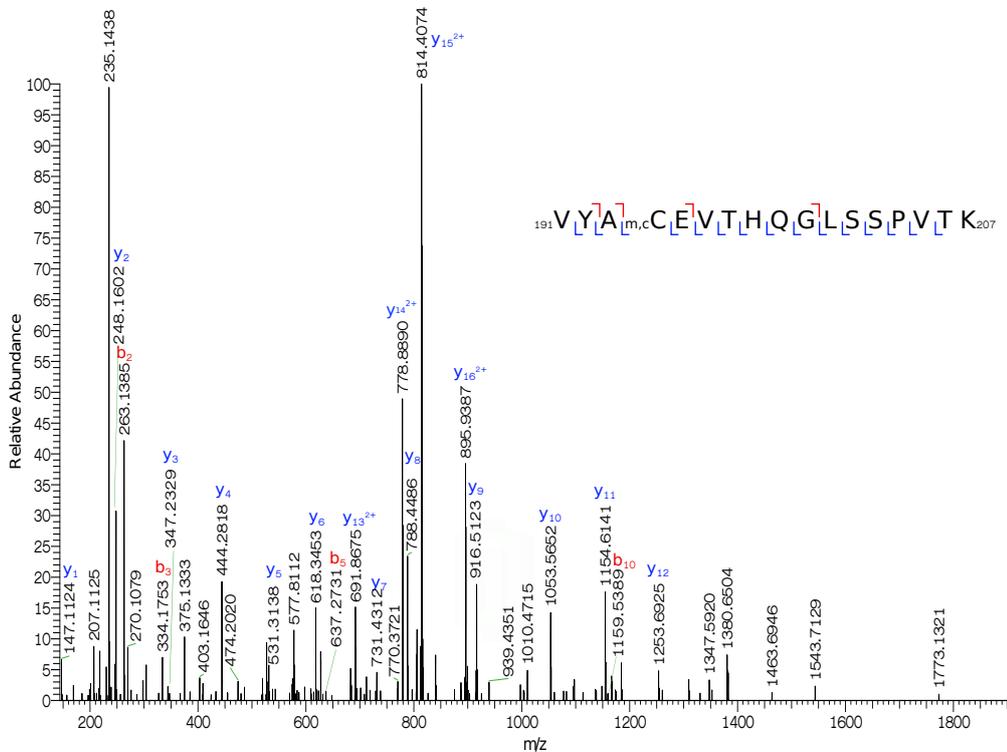
**Abbildung A.29:** MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides VYAm,cCEVTHQGLSSPVT K mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten GI 1206. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 630.99 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1889.95 Da.



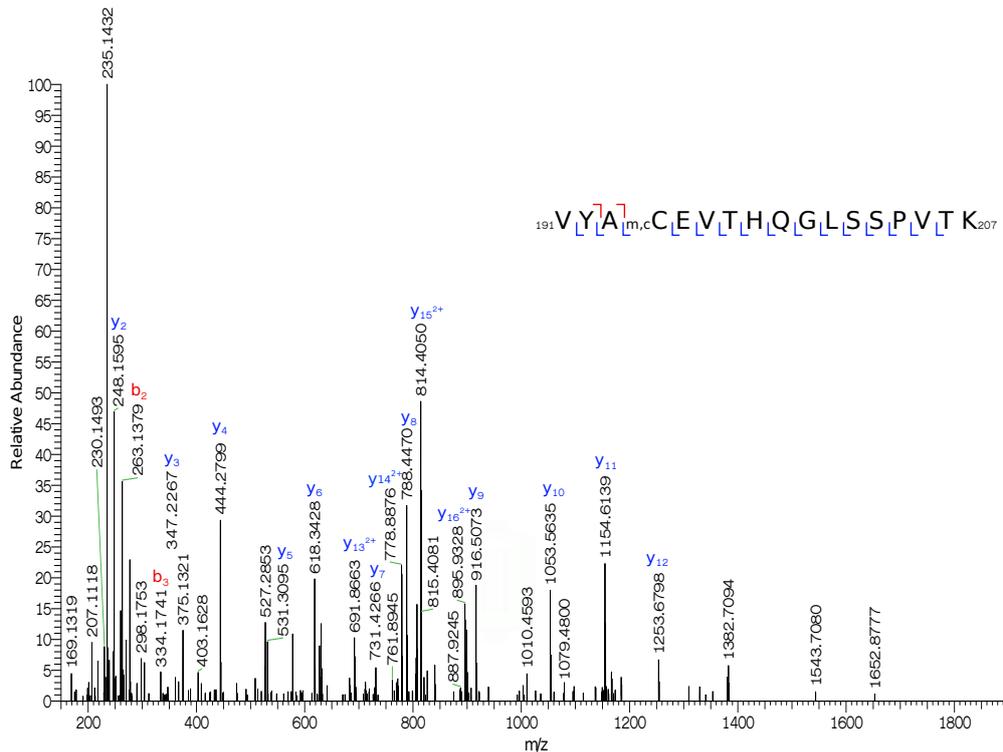
**Abbildung A.30:** MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides VYAm,cCEVTHQGLSSPVT K mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SC 1211. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 945.47 Da und einer Ladung von 2<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1889.95 Da.



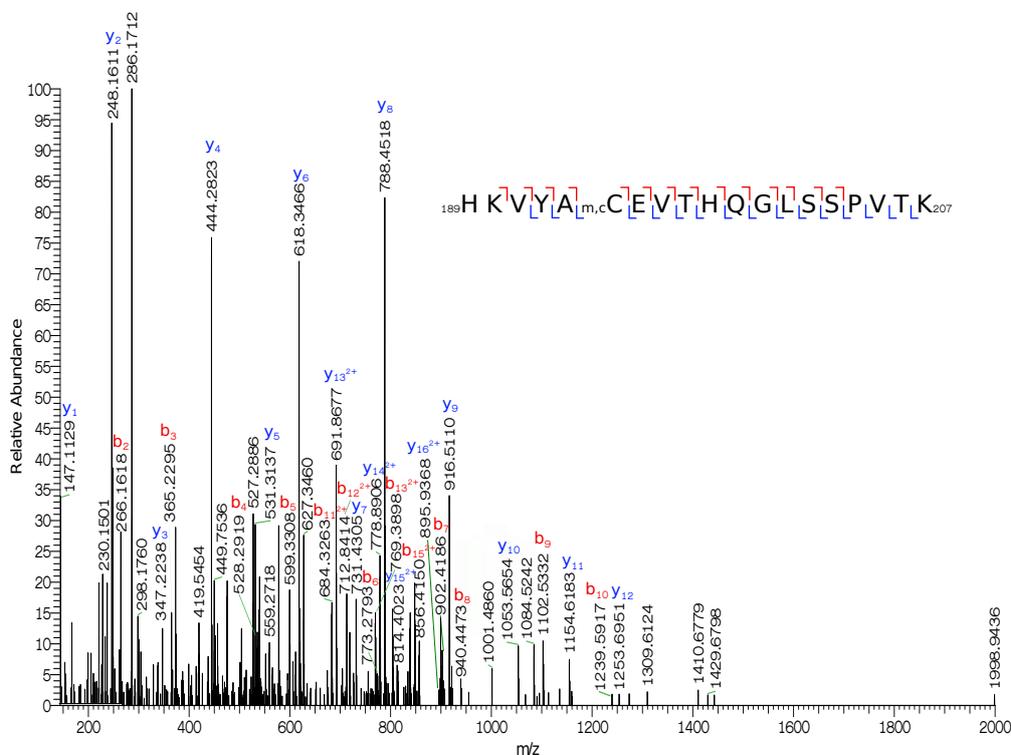
**Abbildung A.31:** MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides VYAm,cCEVTHQGLSSPVT K mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten WS 1199. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 630.98 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1889.95 Da.



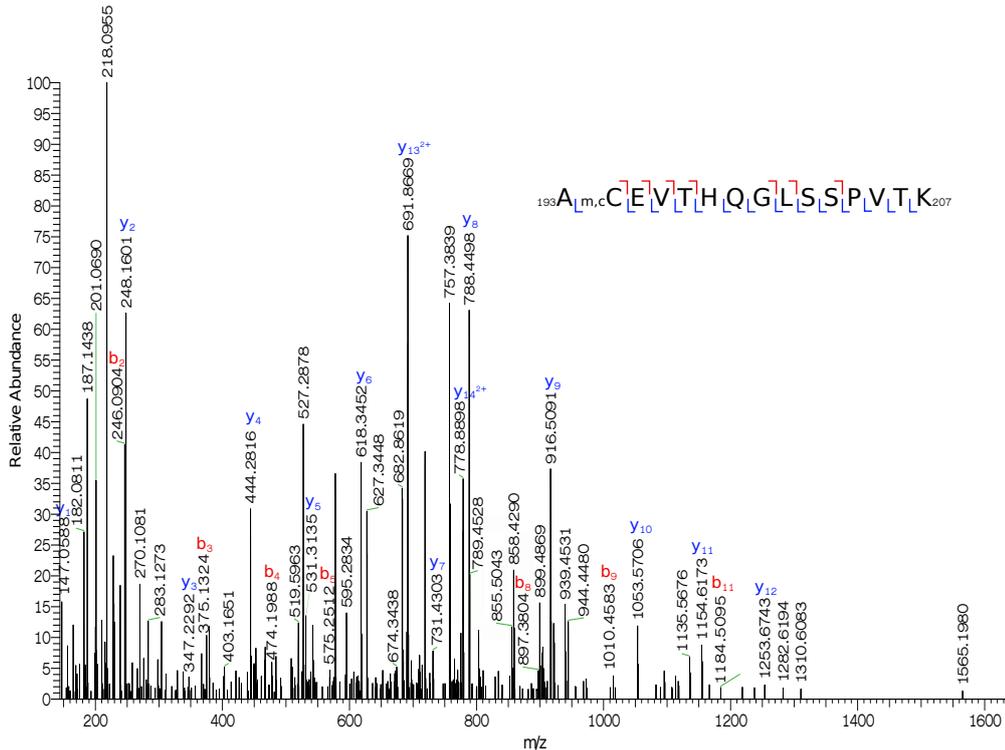
**Abbildung A.32:** MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides VYAm,cCEVTHQGLSSPVT K mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten EW 1046. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 630.65 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1888.93 Da.



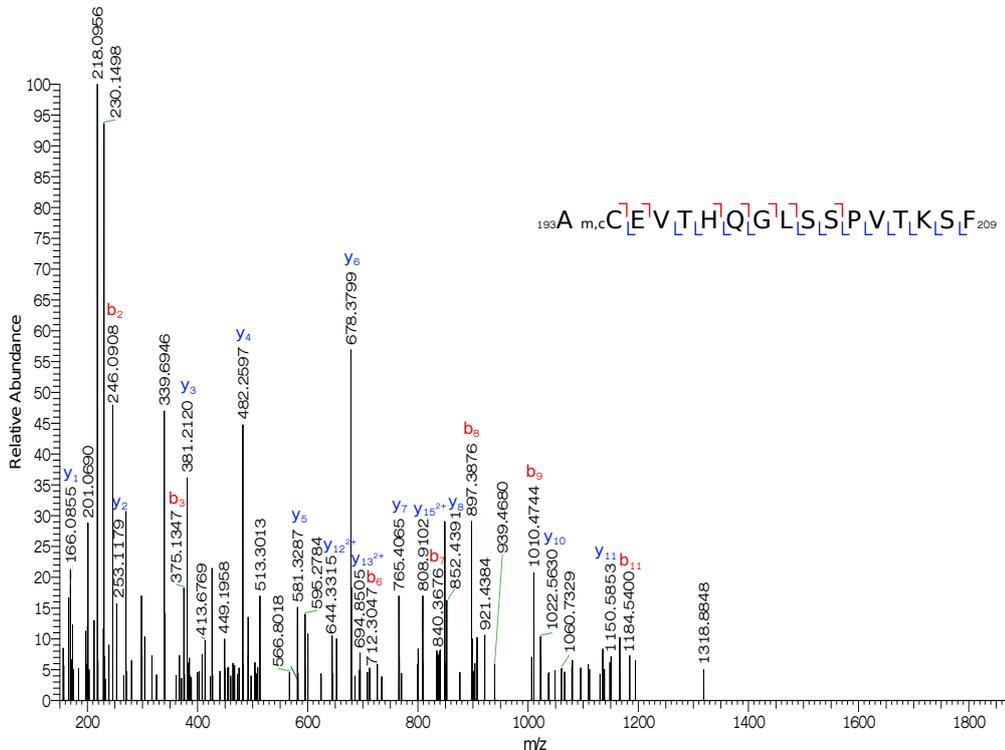
**Abbildung A.33: MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides VYAm,cCEVTHQGLSSPVTk mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten KR 1159.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 630.98 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1889.95 Da.



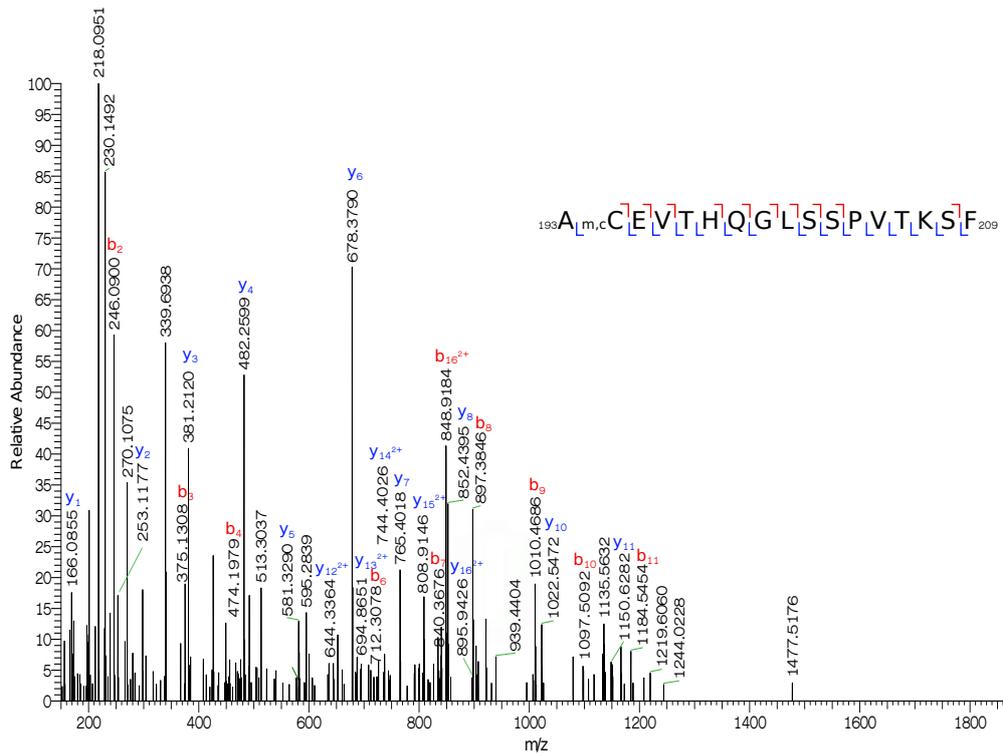
**Abbildung A.34: MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten methylierten Peptides HKVYAm,cCEVTHQGLSSPVTk mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SP 1070.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 539.53 Da und einer Ladung von  $5^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2154.09 Da.



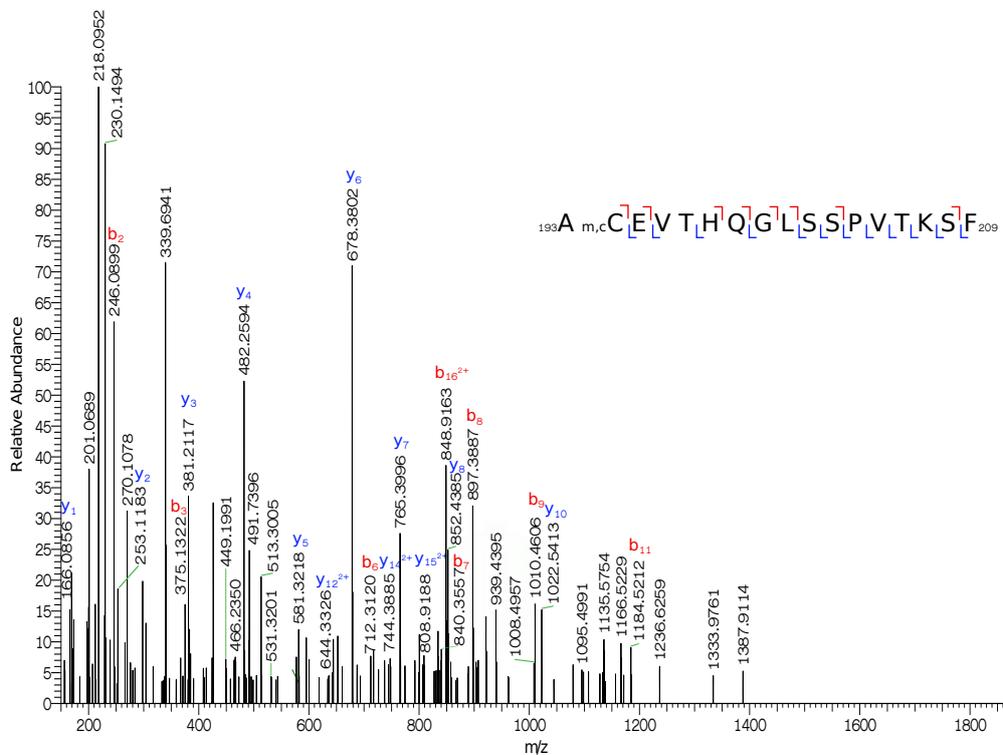
**Abbildung A.35:** MS/MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten methylierten Peptides  $\text{Am,cCEVTHQGLSPVTK}$  mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten **EW 1046**. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 543.28 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1626.82 Da.



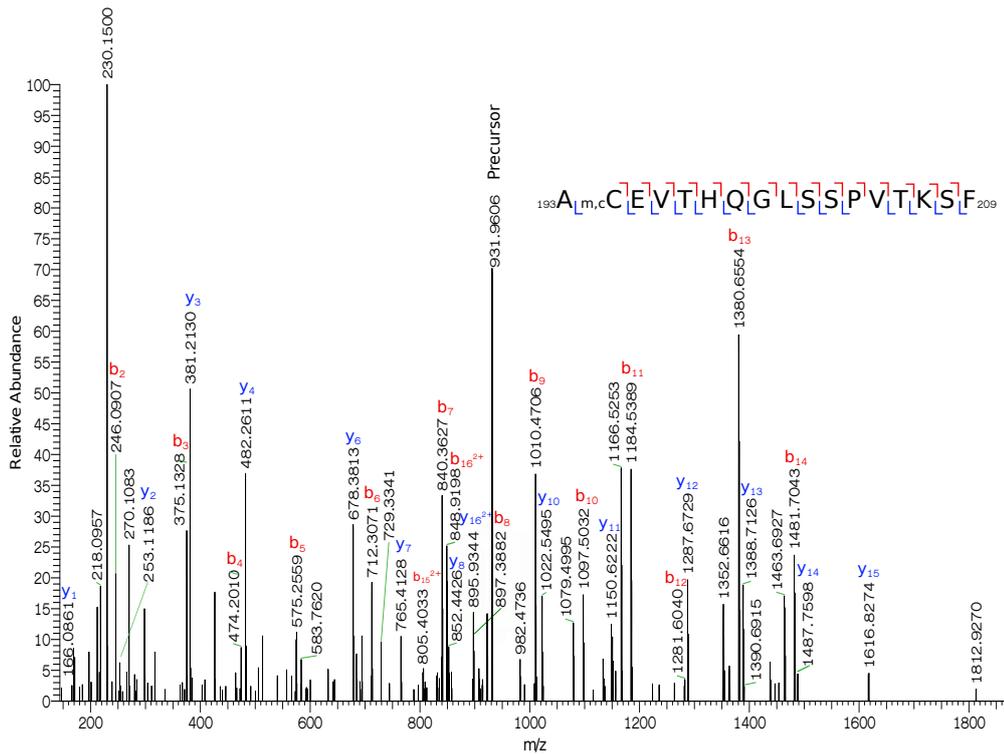
**Abbildung A.36:** MS/MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten methylierten Peptides  $\text{Am,cCEVTHQGLSPVTKSF}$  mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten **GI 1206**. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 621.64 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1861.90 Da.



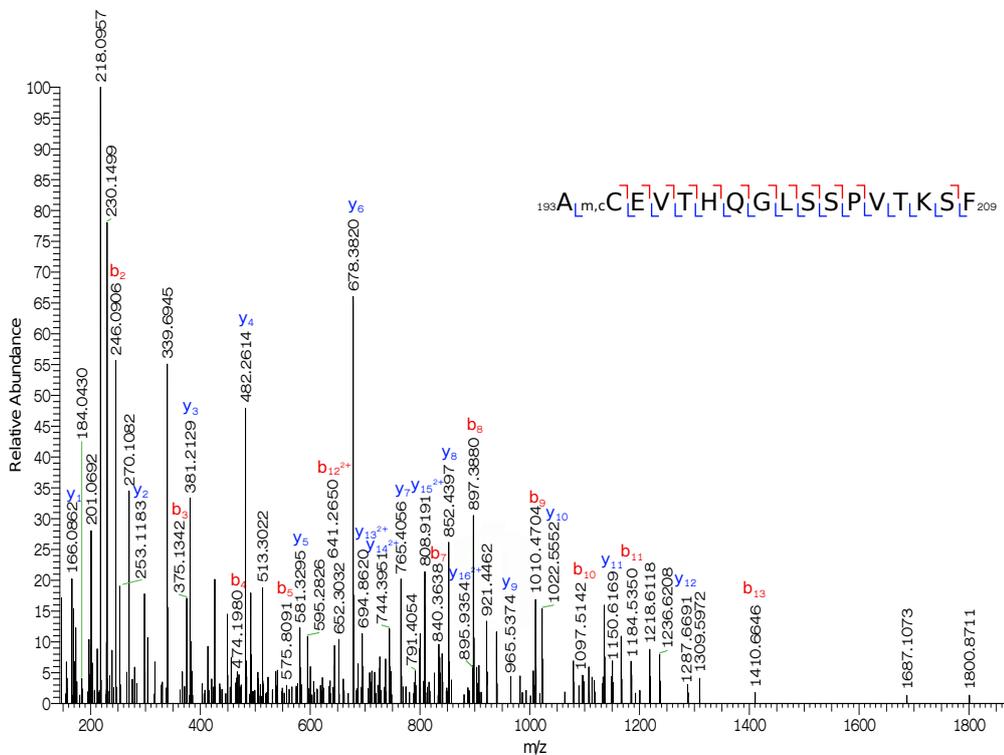
**Abbildung A.37:** MS/MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten methylierten Peptides Am,cCEV-THQGLSSPVT<sup>1</sup>KS<sup>1</sup>F mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten SC 1211. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 621.64 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1861.90 Da.



**Abbildung A.38:** MS/MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten methylierten Peptides Am,cCEV-THQGLSSPVT<sup>1</sup>KS<sup>1</sup>F mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten WS 1199. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 621.64 Da und einer Ladung von 3<sup>+</sup>. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1861.90 Da.



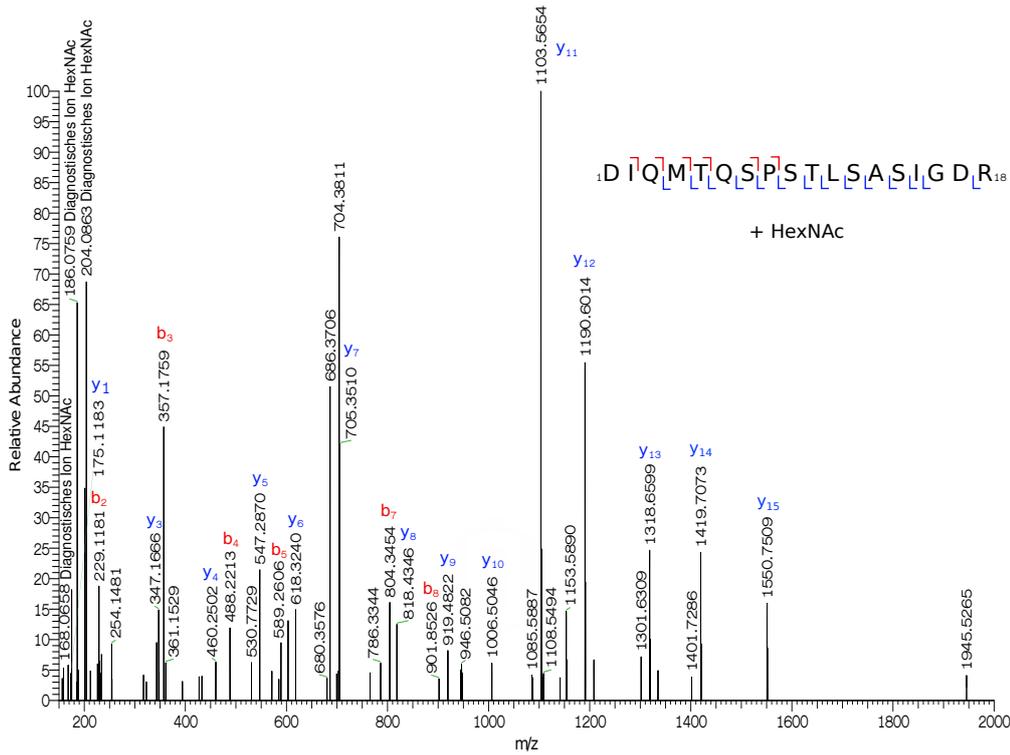
**Abbildung A.39:** MS/MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten methylierten Peptides  $\text{Am,cCEVTHQLSSPVTKSF}$  mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten **EW 1046**. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 931.96 Da und einer Ladung von  $2^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1861.91 Da.



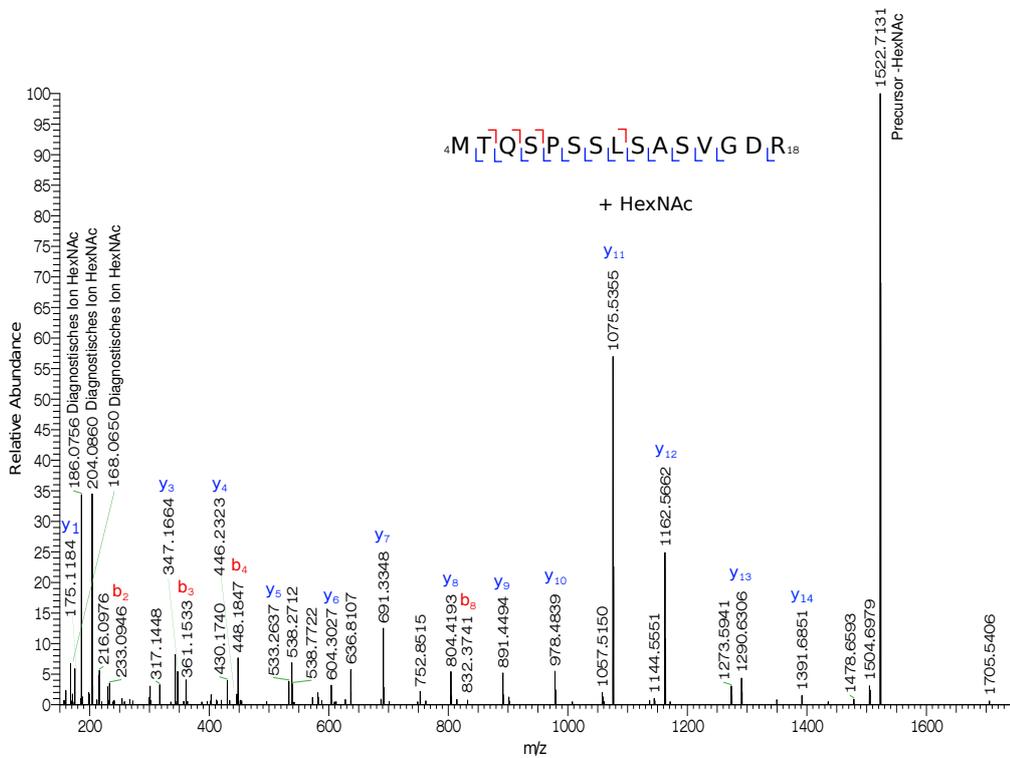
**Abbildung A.40:** MS/MS-Spektrum des chymotrypsinverdauten methylierten Peptides  $\text{Am,cCEVTHQLSSPVTKSF}$  mit einer Carbamidomethylierung am Cystein C194 am Beispiel des Patienten **KR 1159**. Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 621.31 Da und einer Ladung von  $3^+$ . Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1860.91 Da.

### **A.2.3 Glykosylierung**

HCD-Spektren für die HexNAc-Glykosylierung



**Abbildung A.41: HCD-MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $_1$ DIQMTQSPSTLSASIGDR $_{18}$  des Patienten GI 1206 mit einer HexNAc-Glykosylierung.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 704.00 Da und einer 3<sup>+</sup>-Ladung. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 2108.98 Da. Die dargestellten y- und b-Ionen zeigen die Ionen ohne die HexNAc-Glykosylierung.



**Abbildung A.42: HCD-MS/MS-Spektrum des trypsinverdauten Peptids  $_4$ MTQSPSSLSASVGD $_{18}$  des Patienten WS 1199 mit einer HexNAc-Glykosylierung.** Das Spektrum basiert auf dem Vorläuferion mit einem m/z von 863.40 Da und einer 2<sup>+</sup>-Ladung. Dies entspricht einer Peptidmasse [M] von 1724.79 Da. Die dargestellten y- und b-Ionen zeigen die Ionen ohne die HexNAc-Glykosylierung.

## A.3 Varianzanalyse

Relative Häufigkeiten der häufigsten Aminosäuren

		FR1																				CDR1									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Kabat-N.:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CG:		88	92	87	90	95	97	100	100	96	65	88	97	98	98	90	99	95	97	99	97	98	90	99	89	93	96	95	42	95	0
MM:		97	97	92	98	98	100	98	100	98	75	92	92	93	95	89	100	98	85	96	96	94	93	100	62	93	96	94	36	88	100
AL:		99	97	87	93	98	100	99	100	96	89	95	98	95	99	95	99	94	88	94	86	97	92	100	54	99	95	93	20	92	0

		CDR1					FR2					CDR2					FR3														
		30a	30b	30c	30d	30e	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
Kabat-N.:		30a	30b	30c	30d	30e	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
CG:		H	S	G	S	D	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q
MM:		0	0	0	72	0	30	56	96	35	99	88	97	95	93	97	97	91	91	99	83	81	99	96	90	50	95	97	47	99	62
AL:		50	100	50	41	0	26	49	91	57	100	94	96	82	94	82	94	82	97	100	78	72	97	91	87	28	91	93	39	99	33
AL:		100	100	0	52	100	57	56	95	55	100	79	98	96	85	85	95	80	96	100	81	66	95	97	90	26	91	93	25	94	45

		FR3																													
		56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	67a	67b	67c	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
Kabat-N.:		56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	67a	67b	67c	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
CG:		S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	Y	D	H	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D
MM:		83	99	99	98	96	96	99	96	99	95	98	98	100	100	100	97	99	54	97	97	92	96	97	91	89	98	97	92	71	100
AL:		49	100	97	97	93	99	100	88	96	87	94	97	0	0	0	99	96	74	96	91	60	93	96	82	84	97	94	89	81	100
AL:		44	97	98	89	92	75	100	96	100	87	94	95	0	0	0	97	97	52	95	85	60	95	100	84	83	97	96	88	83	98

		FR3					CDR3								
		83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	94a	95
Kabat-N.:		83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	94a	95
CG:		F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	Y	L	P
MM:		87	96	97	99	94	98	92	89	49	40	67	43	50	17
AL:		59	94	92	98	95	100	89	86	57	17	47	14	0	0
AL:		55	93	94	97	91	98	97	93	76	23	35	22	0	80

**Abbildung A.43: Relative Häufigkeiten der häufigsten Aminosäure nach dem Muscle-Alignment.** Aufgeführt sind die relativen Häufigkeiten in % für das Auftreten der häufigsten Aminosäure in der Kontrollgruppe (CG) sowie in den Subgruppen Multiples Myelom (MM) und AL-Amyloidose (AL). Die Nummerierung der Aminosäureposition in der FLC-Sequenz erfolgte nach dem Kabat-Nummerierungssystem. Hervorgehoben wurden die Stellen, bei denen zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Subgruppen eine Differenz von >30 %-Punkte auftraten. Die heller-markierten Bereiche zeichnen sich durch Insertionen aus, bei denen die Unterschiede nicht auf zuverlässige Ergebnisse hindeuten. Zusätzlich wurden die Bereiche der *Framework Regions* (FR) und der *Complementarity Determining Regions* (CDR) markiert.

		FR1																				CDR1								
Kabat-N.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CG:	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	L
MM:	88	92	87	90	95	97	100	100	96	65	88	97	98	98	90	99	95	97	99	97	98	90	99	89	93	96	95	42	95	0
AL:	97	97	92	98	98	100	98	100	98	75	92	93	95	89	100	98	85	96	96	94	93	100	62	93	96	94	36	88	100	0
	99	97	87	93	98	100	99	100	96	89	95	98	95	99	95	99	94	88	94	86	97	92	100	54	99	95	93	20	92	0

		FR2										CDR2										FR3								
Kabat-N.:	30a	30b	30c	30d	30e	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
CG:	H	S	G	S	D	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q
MM:	0	0	0	72	0	30	56	96	35	99	88	97	95	93	97	97	91	91	99	83	81	99	96	90	50	95	97	47	99	62
AL:	50	100	50	41	0	26	49	91	57	100	94	96	82	94	94	82	97	100	78	72	97	91	87	28	91	93	39	99	33	
	100	100	0	52	100	57	56	95	55	100	79	98	96	85	85	95	80	96	100	81	66	95	97	90	26	91	93	25	94	45

		FR3																												
Kabat-N.:	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	67a	67b	67c	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
CG:	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	Y	D	H	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D
MM:	83	99	99	98	96	96	99	96	99	95	98	98	100	100	100	97	99	54	97	97	92	96	97	91	89	98	97	92	71	100
AL:	49	100	97	97	93	99	100	88	96	87	94	97	0	0	0	99	96	74	96	91	60	93	96	82	84	97	94	89	81	100
	44	97	98	89	92	75	100	96	100	87	94	95	0	0	0	97	97	52	95	85	60	95	100	84	83	97	96	88	83	98

		FR3										CDR3		
Kabat-N.:	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	94a	95
CG:	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	Y	L	P
MM:	87	96	97	99	94	98	92	89	49	40	67	43	50	17
AL:	59	94	92	98	95	100	89	86	57	17	47	14	0	0
	55	93	94	97	91	98	97	93	76	23	35	22	0	80

**Abbildung A.44: Relative Häufigkeiten der häufigsten Aminosäure nach dem Muscle-Alignment.** Aufgeführt sind die relativen Häufigkeiten in % für das Auftreten der häufigsten Aminosäure in der Kontrollgruppe (CG) sowie in den Subgruppen Multiples Myelom (MM) und AL-Amyloidose (AL). Die Nummerierung der Aminosäureposition in der FLC-Sequenz erfolgte nach dem Kabat-Nummerierungssystem. Hervorgehoben wurden die Stellen, bei denen zwischen den Subgruppen Multiples Myelom und der AL-Amyloidose eine Differenz von >20 %-Punkte auftraten. Zusätzlich wurden die Bereiche der *Framework Regions* (FR) und der *Complementarity Determining Regions* (CDR) markiert.

## A.4 Python-Skripte

In dieser Arbeit wurde die Verteilung von Aminosäuren an jeder Stelle in der Aminosäuresequenz von FLCs untersucht. Dazu wurden FLC-Sequenzen von den Subtypen AL-Amyloidose, Multiples Myelom und einer gesunden Kontrollgruppe aus der *AL-Base*-Datenbank isoliert, mit diesen ein multiples Sequenzalignment durchgeführt und anschließend für jede Position in der FLC-Sequenz die häufigste Aminosäure ermittelt und für jede Subgruppe berechnet, wie oft die häufigste Aminosäure innerhalb der Subgruppe aufgetreten ist. Die beiden letzten Schritte wurden mit einem Python-Skript ausgeführt, welches im dem folgenden Abschnitt dargestellt ist.

### A.4.1 Ermitteln der häufigsten Aminosäure

```
import numpy #Verwenden der numpy-Funktion um Matrixes darstellen zu koennen

# Schritt 1:
# Die Aminosaeuresequenzen aus einem .txt-file in einen Array ueberfuehren. Um die Analyse
# durchfuehren zu koennen, muessen die Sequenzen dementsprechend als .txt-file vorliegen
# und bereits align sein.

textdatei=open() # Hier den Dateinamen des .txt-files mit den Sequenzen angeben

Sequenzen = numpy.empty(shape=(322,128), dtype=str) # Fuer die Analyse lagen
# 322 Sequenzen vor, die jeweils aus 128 Zeichen bestanden

zeile=textdatei.readlines() # Liest jede einzelne Zeile aus der Textdatei ein

# Die Sequenzen der Patienten werden in einem Array 'Sequenzen' gespeichert
# Waagerecht: Stelle in der Peptidsequenz
# Senkrecht: Unterschiedliche Patienten

for i in range(len(Sequenzen)):
    for j in range(128):
        Sequenzen[i][j]=zeile[i][j]

print Sequenzen

textdatei.close()

# Schritt 2:
# Fuer jede Stelle in der Aminosaeuresequenz werden ueber alle Patientensequenzen die vorhandenen
# Aminosaeuren gezaehlt und in einem Array abgespeichert.

# Array 'ErgebnisHaeufigkeitSequenz' fasst die Anzahl der Aminosaeuren an den Stellen in der
# Sequenz zusammen
# Waagerecht: Stelle in der Aminosaeuresequenz
# Senkrecht: Verschiedenen Aminosaeuren
# [0]: A Ala Alanin
# [1]: C Cys Cystein
# [2]: D Asp Asparaginsaeure
# [3]: E Glu Glutaminsaeure
# [4]: F Phe Phenylalanin
# [5]: G Gly Glycin
# [6]: H His Histidin
# [7]: I Ile Isoleucin
# [8]: K Lys Lysin
# [9]: L Leu Leucin
# [10]: M Met Methionin
# [11]: N Asn Asparagin
# [12]: P Pro Prolin
# [13]: Q Gln Glutamin
# [14]: R Arg Arginin
```

```
# [15]: S Ser Serin
# [16]: T Thr Threonin
# [17]: V Val Valin
# [18]: W Trp Tryptophan
# [19]: Y Tyr Tyrosin
# [20]: X als Platzhalter fuer Aminosaeure, andere Gruppen nutzen auch B, Z oder -

ErgebnisHaeufigkeitSequenz = numpy.zeros(shape=(21,128))

# An jeder Stelle in der AS-Sequenz werden die unterschiedlichen AS gezaehlt
# Angefangen bei der 1. AS bis zur letzten AS (Variable: Stelle AS)

for StelleAS in range(0,128):
    AnzahlA=0           #Initialisierung
    AnzahlC=0
    AnzahlD=0
    AnzahlE=0
    AnzahlF=0
    AnzahlG=0
    AnzahlH=0
    AnzahlI=0
    AnzahlK=0
    AnzahlL=0
    AnzahlM=0
    AnzahlN=0
    AnzahlP=0
    AnzahlQ=0
    AnzahlR=0
    AnzahlS=0
    AnzahlT=0
    AnzahlV=0
    AnzahlW=0
    AnzahlY=0
    AnzahlX=0

    for AnzahlSequenz in range(0,len(Sequenzen)):
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='A': # Steht an der 1. Stelle bei dem
            # 1. Patienten ein A?,...
            AnzahlA=AnzahlA+1           # Wenn ja, dann zaehle bei AnzahlA 1 hoch
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[0][StelleAS]=AnzahlA # Speichern der Werte im Array
            # ErgebnisHaeufigkeitSequenz

        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='C':
            AnzahlC=AnzahlC+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[1][StelleAS]=AnzahlC
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='D':
            AnzahlD=AnzahlD+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[2][StelleAS]=AnzahlD
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='E':
            AnzahlE=AnzahlE+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[3][StelleAS]=AnzahlE
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='F':
            AnzahlF=AnzahlF+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[4][StelleAS]=AnzahlF
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='G':
            AnzahlG=AnzahlG+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[5][StelleAS]=AnzahlG
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='H':
            AnzahlH=AnzahlH+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[6][StelleAS]=AnzahlH
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='I':
            AnzahlI=AnzahlI+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[7][StelleAS]=AnzahlI
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='K':
            AnzahlK=AnzahlK+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[8][StelleAS]=AnzahlK
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='L':
            AnzahlL=AnzahlL+1
            ErgebnisHaeufigkeitSequenz[9][StelleAS]=AnzahlL
```

```

if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'M' :
    AnzahlM=AnzahlM+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [10] [StelleAS]=AnzahlM
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'N' :
    AnzahlN=AnzahlN+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [11] [StelleAS]=AnzahlN
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'P' :
    AnzahlP=AnzahlP+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [12] [StelleAS]=AnzahlP
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'Q' :
    AnzahlQ=AnzahlQ+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [13] [StelleAS]=AnzahlQ
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'R' :
    AnzahlR=AnzahlR+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [14] [StelleAS]=AnzahlR
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'S' :
    AnzahlS=AnzahlS+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [15] [StelleAS]=AnzahlS
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'T' :
    AnzahlT=AnzahlT+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [16] [StelleAS]=AnzahlT
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'V' :
    AnzahlV=AnzahlV+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [17] [StelleAS]=AnzahlV
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'W' :
    AnzahlW=AnzahlW+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [18] [StelleAS]=AnzahlW
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'Y' :
    AnzahlY=AnzahlY+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [19] [StelleAS]=AnzahlY
if Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'X' or # X, -, B, Z kommen in den Sequenzen
Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== '-' or # als Platzhalter vor, wenn die
Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'B' or # Aminosaeure nicht bekannt ist
Sequenzen [AnzahlSequenz] [StelleAS]== 'Z' :
    AnzahlX=AnzahlX+1
    ErgebnisHaeufigkeitSequenz [20] [StelleAS]=AnzahlX

print ErgebnisHaeufigkeitSequenz

print ErgebnisHaeufigkeitSequenz [15] [32]
print ErgebnisHaeufigkeitSequenz [12] [88]
print ErgebnisHaeufigkeitSequenz [5] [110]

# Schritt 3:
# Ueberpruefen der Zaehlung. Dabei werden die Anzahl aller Aminosaeuren je Stelle addiert
# Falls die Zaehlung erfolgreich war, sollte die Anzahl der Gesamtsequenzen an jeder Stelle stehen

AnzahlASproStelle = numpy.zeros(shape=(128))

for StelleAS in range(0,128):
    AnzahlAS=0
    for Aminosaeure in range (0,21):
        AnzahlAS=AnzahlAS+ErgebnisHaeufigkeitSequenz [Aminosaeure] [StelleAS]
    AnzahlASproStelle [StelleAS]=AnzahlAS

print AnzahlASproStelle

# Schritt 4:
# Aus dem Array 'ErgebnisHaeufigkeitSequenz' wird fuer jede Stelle in der
# AS-Sequenz die grosste Zahl herausgesucht und damit indirekt die haeufigste
# AS ermittelt.

# Ermittlung der haeufigsten AS-Sequenz durch Extraktion aus dem Array ErgebnisHaeufigkeitSequenz

HaeufigsteSequenz = numpy.zeros(shape=(128))

for StelleAS in range(0,128):
    HaeufigkeitAS=0
    for Aminosaeure in range (0,20):

```

```
    if ErgebnisHaeufigkeitSequenz[Aminosaeure][StelleAS]>HaeufigkeitAS:
        HaeufigkeitAS = ErgebnisHaeufigkeitSequenz[Aminosaeure][StelleAS]
        HaeufigsteAS=Aminosaeure
        HaeufigsteSequenz[StelleAS]=HaeufigsteAS

print HaeufigsteSequenz

# Umwandeln der Zahlen in Buchstaben.

HaeufigsteSequenzBuchstaben=np.empty(shape=(128), dtype=str)

for StelleAS in range(128):
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==0:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='A'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==1:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='C'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==2:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='D'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==3:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='E'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==4:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='F'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==5:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='G'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==6:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='H'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==7:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='I'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==8:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='K'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==9:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='L'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==10:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='M'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==11:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='N'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==12:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='P'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==13:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='Q'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==14:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='R'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==15:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='S'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==16:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='T'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==17:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='V'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==18:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='W'
    if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==19:
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='Y'
    if ErgebnisHaeufigkeitSequenz[20][StelleAS]==len(Sequenzen): # Falls an jeder
        HaeufigsteSequenzBuchstaben[StelleAS]='-' # Stelle keine
                                                    # AS ist, dann -

print HaeufigsteSequenzBuchstaben

# Schritt 5:
# Ausgabe der haeufigsten Sequenz in ein txt.-File

ausgabertext=open() # Hier den Dateinamen angeben, in dem die Sequenz aus den haeufigsten
                    # Aminosaeuren gespeichert werden soll
ausgabertext.write(HaeufigsteSequenzBuchstaben)
ausgabertext.close()
```

## A.4.2 Bestimmen der relativen Häufigkeiten

```
import numpy as np # Verwenden der numpy-Funktion um Matrixes darstellen zu koennen

# Schritt 1:
# Die Aminosaeuresequenzen aus einem .txt-file in einen Array ueberfuehren

textdatei=open() # Hier den Dateinamen des .txt-files mit den Sequenzen angeben

Sequenzen = np.empty(shape=(x,128), dtype=str) # Hier: n als Platzhalter fuer die Anzahl der
                                                # Sequenzen je Subgruppe

zeile=textdatei.readlines() # Liest jede einzelne Zeile aus der .txt-Datei ein

# Die Sequenzen der Patienten werden in einem Array 'Sequenzen' gespeichert
# Waagerecht: Stelle in der Peptidsequenz
# Senkrecht: Unterschiedliche Patienten

for i in range(len(Sequenzen)):
    for j in range (128):
        Sequenzen[i][j]=zeile[i][j]

print Sequenzen

textdatei.close()

# Schritt 2:
# Haeufigste Sequenz laden

HaeufigsteSequenzTextfile=open() # Die das .txt-File mit der Sequenz aus den haeufigsten
                                # Aminosaeuren angeben
zeile2=HaeufigsteSequenzTextfile.readlines()

HaeufigsteSequenz= np.empty(shape=(128), dtype=str)

for i in range (0,128):
    HaeufigsteSequenz[i]=zeile2[0][i]

print HaeufigsteSequenz

# Schritt 3: Bestimmen der relativen Haeufigkeiten

# Schritt 3.1:
# Anzahl der haeufigsten Aminosaeure bestimmen (wie oft kommt die haeufigste Aminosaeure vor)

HaeufigkeitenAminosaeuren=np.zeros(shape=(128),dtype=int)

for StelleAS in range(0,128):
    AnzahlStelle=0.
    for AnzahlSequenz in range(0,len(Sequenzen)):
        if HaeufigsteSequenz[StelleAS]==Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]:
            AnzahlStelle=AnzahlStelle+1.
        HaeufigkeitenAminosaeuren[StelleAS]= AnzahlStelle

# Schritt 3.2:
# Anzahl der Sequenzen bestimmen, die an dieser Stelle eine Aminosaeure stehen haben
# Hintergrund: Bei den verwendeten Sequenzen waren nicht bei allen Sequenzen Aminosaeuren an
# jeder Stelle vorhanden. Da die relativen Variabilitaeten ermittelt werden, soll auch nur die
# Anzahl der Sequenzen verwendet werden, wo tatsaechlich eine Aminosaeure zu finden war.

AnzahlSequenzenProStelle=np.zeros(shape=(128),dtype=float)

for StelleAS in range(0,128):
    AnzahlStelle=0.
    for AnzahlSequenz in range(0,len(Sequenzen)):
        if Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='-' or # Wie oft gibt es einen Platzhalter
           Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='B' or # an dieser Stelle
           Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='Z' or
```

---

```
Sequenzen[AnzahlSequenz][StelleAS]=='X':
    AnzahlStelle=AnzahlStelle+1.
AnzahlSequenzenProStelle[StelleAS]= len(Sequenzen)-AnzahlStelle # Subtrahieren der Anzahl
                                                                    # der Stellen ohne
                                                                    # Aminosaeure von der
                                                                    # Gesamtanzahl der Sequenzen

print AnzahlSequenzenProStelle

# Schritt 3.3:
# Verhaeltnis aus der Anzahl der Sequenzen mit der haeufigsten Aminosaeure und der Anzahl der
# Sequenzen, mit mindestens einer Aminosaeure an dieser Stelle, Angabe in %

RelativeHaeufigkeit=np.zeros(shape=(128),dtype=float)

for StelleAS in range(0,128):
    if AnzahlSequenzenProStelle[StelleAS]!=0:
        RelativeHaeufigkeit[StelleAS]=
            round(HaeufigkeitenAminosaeuren[StelleAS]/AnzahlSequenzenProStelle[StelleAS]*100,0)

print RelativeHaeufigkeit
```



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

## **Massenspektrometrische Identifizierung und Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen bei pathologischen freien Antikörperleichtketten**

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, November 2014