

Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie
Abteilung für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung

Entwicklung und Validierung eines Massenspektrometrie- basierten Verfahrens zur Quantifizierung von CAAP48

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)

eingereicht am
Fachbereich Chemie der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

von

Marcel Naumann

Halle (Saale), 2019

Für Philine

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von April 2015 bis März 2019 in der Projektgruppe für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung (MWT) des Fraunhofer-Instituts für Zelltherapie und Immunologie (IZI) am Standort Halle (Saale) erarbeitet. In Zusammenarbeit mit der Projektgruppe für Extrakorporale Immunomodulation (EXIM) des Fraunhofer-IZI und der Universitätsmedizin Rostock erfolgte im Oktober und November 2016 die Realisierung einer Diagnostikstudie mit Sepsispatienten.

- | | |
|------------------------|--|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Zoya Ignatova, Universität Hamburg |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Thomas Mencke, Universitätsmedizin Rostock |
| Tag der Disputation: | 02.07.2019 |
| Tag der Druckfreigabe: | 02.07.2019 |

Kurzbeschreibung

Die Behandlung von Sepsispatienten zählt aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes zu den größten Herausforderungen der modernen Intensivmedizin. Definiert ist Sepsis als durch eine fehlgeleitete Immunantwort ausgelöste lebensbedrohliche Organdysfunktion, wobei die Immunantwort ursächlich gegen eine Infektion gerichtet war. Die Behandlung erfolgt am effektivsten im Anfangsstadium, allerdings ist die Frühdiagnose der Sepsis schwierig. In der Folge kommt es zu dramatischen Krankheitsverläufen, die mit enormen Behandlungskosten, einer hohen Mortalität sowie gravierenden Spätfolgen verbunden sind.

Bisher hat einzig Procalcitonin als Biomarker für Sepsis eine umfassende Verbreitung in der klinischen Routinediagnostik gefunden. Allerdings ist es nur eingeschränkt für die Frühdiagnose der Sepsis sowie für die Vorhersage der Schwere des Krankheitsverlaufs geeignet. Um die Mortalität von Sepsispatienten zu verringern, ist die Identifizierung und klinische Validierung neuer Biomarker zur Frühdiagnose daher von entscheidender Bedeutung.

Im Blut von an Sepsis erkrankten Patienten erfolgt ein verstärkter proteolytischer Abbau des Akute-Phase-Proteins Alpha-1-Antitrypsin. Die Spaltung an dessen C-Terminus führt zur Freisetzung eines proteolytischen Peptids, welches als CAAP48 bezeichnet wird und dessen Konzentration im Blut von Sepsispatienten erhöht ist. Aus diesem Grund wird CAAP48 als Kandidat für einen sensitiven und spezifischen Sepsis-Biomarker angesehen. Allerdings ist zur Bestätigung dieser Annahme eine klinische Validierung unerlässlich.

Voraussetzung für die klinische Validierung von CAAP48 ist ein robustes und verlässliches Quantifizierungsverfahren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Massenspektrometrie-basiertes Verfahren zur Quantifizierung von CAAP48 in Blutplasma entwickelt. Dazu gehörte zunächst die Etablierung einer kostengünstigen und schnellen Probenvorbereitungsmethode, die auf der Denaturierung der Plasmaprobe und anschließender Festphasenextraktion beruht. Für die eigentliche Quantifizierung wurden massenspektrometrische Methoden genutzt, da diese sowohl empfindlich als auch spezifisch sind und darüber hinaus umfassende molekulare Informationen über den Analyten liefern. Die Probenvorbereitungsmethode sowie die beiden massenspektrometrischen Quantifizierungsmethoden bilden gemeinsam das Quantifizierungsverfahren für CAAP48.

Um die prinzipielle Verwendbarkeit des Verfahrens für die Quantifizierung von CAAP48 in humanem Blutplasma nachzuweisen, war zum einen die Validierung in Anlehnung an die Kriterien der „*Food and Drug Administration*“ der USA sowie der Europäischen Arzneimittelbehörde und zum anderen die Analyse von Patientenmaterial notwendig. Letzteres wurde im Rahmen einer Diagnostikstudie mit Sepsispatienten einer Intensivstation der Universitätsmedizin Rostock erhoben. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt und während der Durchführung erfolgte ein umfassendes Monitoring verschiedenster klinischer Parameter.

Schließlich konnte CAAP48 in allen erhobenen Patientenproben quantifiziert werden. Die Ergebnisse der mit zwei verschiedenen massenspektrometrischen Verfahren durchgeführten Analysen waren vergleichbar. Sie deuten darauf hin, dass ein Anstieg der CAAP48-Konzentration im Blutplasma spezifisch für Sepsis ist. Allerdings sind weitere Studien mit größeren Patientenkohorten notwendig.

Abstract

Due to its complex pathophysiology, the adequate treatment of patients with sepsis is one of the greatest challenges by which modern intensive care medicine is faced with. Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. It can be treated most effectively in its early stages, but diagnosis is difficult at this time. As a consequence, many patients are affected by a dramatic disease progression leading to huge costs for the national health care systems, high mortality and severe long-term complications.

To date, only Procalcitonin (PCT) is widely used in clinical routine as marker for sepsis. But its ability for early diagnosis and prediction of disease outcome is limited. In order to reduce the high mortality of sepsis patients, identification and clinical validation of new biomarkers are of tremendous importance.

Within the blood of sepsis patients, the proteolytic degradation of the acute-phase protein alpha-1-antitrypsin is enhanced. Cleavage of its C-terminal section results in the release of a proteolytic fragment termed as CAAP48, which blood concentration is increased in sepsis patients. Therefore, CAAP48 has been recognized as a candidate for a sensitive and specific sepsis biomarker, but validation by clinical studies is necessary.

A robust and reliable quantification procedure for CAAP48 is the basic prerequisite for its clinical validation. Consequently, the present work has focussed on the development and validation of a mass spectrometry-based assay for the quantification of CAAP48 in human blood plasma. In a first step, a fast and cost-effective sample preparation strategy based on sample denaturation and solid-phase extraction was established. The utilization of mass spectrometry for the quantification of CAAP48 seemed to be highly advantageous. Mass spectrometry is a very sensitive and specific analysis technique, able to unveil comprehensive information about the molecular status of CAAP48. Sample preparation strategy and mass spectrometry-based quantification methods are forming together the quantification assay.

In order to proof the basic ability of the developed assay to quantify CAAP48 in patient material, validation of the assay according to the guidelines of the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency as well as the analysis of patient material was necessary. The latter was acquired with the help of a diagnostic study, within which sepsis patients hospitalized at an intensive care unit of the University Medical Centre Rostock were enrolled. The diagnostic study was approved by the local ethics committee and during its implementation an extended set of clinical parameters was monitored. The assay enabled the quantification of CAAP48 in all patient samples. The outcome of the analyses with two different mass spectrometry techniques was comparable, showing that the assay is robust. Quantification results for CAAP48 indicate that an increase of its plasma concentration is specific for sepsis. But further studies with extended patient cohorts are necessary.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sepsis	1
1.1.1	Definition, Ursachen und Diagnose.....	1
1.1.2	Krankheitsverlauf, Behandlung und Spätfolgen	3
1.1.3	Epidemiologie.....	6
1.2	Biomarker	6
1.2.1	Biomarker für Sepsis	7
1.2.2	Alpha-1-Antitrypsin und CAAP48	9
1.3	Massenspektrometrie	14
1.3.1	Einführung.....	14
1.3.2	MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer	16
1.3.2.1	Instrumentelle Grundlagen.....	16
1.3.2.2	Quantifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	20
1.3.3	HPLC-ESI-Tripelquadrupol-Massenspektrometrie	23
1.3.3.1	Instrumentelle Grundlagen.....	23
1.3.3.2	Quantifizierung mittels HPLC-ESI-Tripelquadrupol-Massenspektrometrie	29
2	Zielstellung.....	31
3	Strategie.....	32
4	Theoretischer Teil	34
4.1	Peptidstandards.....	34
4.2	Entwicklung und Validierung eines Massenspektrometrie-basierten Quantifizierungsverfahrens für CAAP48.....	37
4.2.1	Probenaufarbeitungsmethode.....	37
4.2.1.1	Denaturierung.....	38
4.2.1.2	Grundlagen der Festphasenextraktion	38
4.2.1.3	Auswahl des Festphasenextraktions-Systems	41
4.2.2	MALDI-TOF-Methode	43
4.2.3	HPLC-ESI-MS/MS-Methode	44
4.2.3.1	Auswahl der Referenzmatrix.....	45
4.2.3.2	Entwicklung der MS/MS-Methode	46

Inhaltsverzeichnis

4.2.3.3	Entwicklung und Optimierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode.....	46
4.2.3.4	Grundlagen der Erstellung von Probenserien.....	47
4.2.4	Methodenvalidierung.....	48
4.2.4.1	Selektivität	49
4.2.4.2	Richtigkeit und Präzision.....	50
4.2.4.3	Linearität	50
4.2.4.4	Empfindlichkeit	51
4.2.4.5	Verschleppungen	51
4.2.4.6	Extraktionseffizienz und Matrixeffekt	52
4.2.4.7	Stabilität.....	53
4.3	Klinische Studie.....	55
4.3.1	Ethikantrag	55
4.3.2	Studiendesign	56
4.3.3	Patientenauswahl.....	56
4.3.4	Klinische Parameter und Scores.....	57
5	Ergebnisse	60
5.1	Charakterisierung Peptidstandards.....	60
5.1.1	Elementaranalyse.....	60
5.1.2	MALDI-TOF(/TOF)-Analyse	61
5.1.2.1	Nachweis von Verunreinigungen.....	62
5.1.2.2	Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen.....	65
5.1.3	RP-HPLC-UV-Analyse	68
5.1.3.1	Reinheitsanalyse	68
5.1.3.2	Einfrier-/Auftau- und Kurzzeitlagerstabilität	71
5.1.3.3	Verdünnungslinearität	72
5.1.3.4	Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen.....	73
5.2	Entwicklung und Validierung eines Massenspektrometrie-basierten Quantifizierungsverfahrens für CAAP48.....	76
5.2.1	Probenaufarbeitungsmethode.....	76
5.2.1.1	Auswahl der stationären Phase	76

5.2.2	Entwicklung einer MALDI-TOF-basierten Quantifizierungsmethode	80
5.2.2.1	Kalibrierfunktion in Lösungsmittelgemisch	81
5.2.2.2	Kalibrierfunktion in Lösungsmittelgemisch nach Festphasenextraktion....	84
5.2.2.3	Kalibrierfunktion in Blutplasma nach Festphasenextraktion	87
5.2.2.4	Zusammenfassung	90
5.2.3	Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode	91
5.2.3.1	Entwicklung einer MS/MS-Methode	92
5.2.3.2	Entwicklung und Optimierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode.....	101
5.2.4	Validierung der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode	112
5.2.4.1	Selektivität	112
5.2.4.2	Richtigkeit und Präzision.....	114
5.2.4.3	Linearität	115
5.2.4.4	Empfindlichkeit	116
5.2.4.5	Verschleppungen	118
5.2.4.6	Extraktionseffizienz und Matrixeffekt	119
5.2.4.7	Stabilität.....	124
5.3	Klinische Studie.....	125
5.4	Quantifizierung von CAAP48 in humanen Plasmaproben.....	133
5.4.1	MALDI-TOF	133
5.4.2	HPLC-ESI-MS/MS	137
6	Diskussion	141
6.1	Probenaufarbeitungsmethode – Potentiale und Schwächen	141
6.2	Vergleich der massenspektrometrischen Quantifizierungsmethoden	142
6.3	Vergleich der ermittelten Konzentrationen	145
6.4	Gegenüberstellung der Quantifizierungsergebnisse mit klinischen Parametern und dem SOFA	148
6.5	Vergleich der Quantifizierungsergebnisse mit publizierten Daten.....	150
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	152
8	Materialien und Methoden	155
8.1	Materialien	155

Inhaltsverzeichnis

8.1.1	Laborkleingeräte	155
8.1.2	Chemikalien und Lösungsmittel	155
8.2	Methoden	157
8.2.1	Peptidstandards	157
8.2.2	Elementaranalyse	157
8.2.3	RP-HPLC-UV-Analyse	157
8.2.3.1	Probenvorbereitung und Datenaufnahme	157
8.2.3.2	Datenauswertung	158
8.2.4	Festphasenextraktion (SPE).....	159
8.2.5	MALDI-TOF-Analyse	161
8.2.5.1	Probenvorbereitung und Datenaufnahme	161
8.2.5.2	Datenauswertung und Kalibrierung.....	162
8.2.6	HPLC-ESI-MS/MS-Analyse	163
8.2.6.1	Probenvorbereitung.....	163
8.2.6.2	Datenaufnahme	164
8.2.6.3	Datenauswertung	165
8.2.7	Klinische Studie	166
8.2.7.1	Entnahme von Blutproben.....	166
8.2.7.2	Herstellung und Lagerung von Plasmaproben.....	167
8.2.8	Statistische Berechnungen	167
9	Verzeichnisse	168
9.1	Literaturverzeichnis	168
9.2	Abkürzungsverzeichnis	174
9.3	Abbildungsverzeichnis	177
9.4	Tabellenverzeichnis	180
9.5	Verzeichnis der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS.....	183

1 Einleitung

1.1 Sepsis

Die Weiterentwicklung und vor allem Ausweitung intensivmedizinischer Therapien hat in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten vielen Menschen mit lebensbedrohlichen Erkrankungen das Leben gerettet. Intensivmedizinische Therapien erhöhen jedoch auch die Wahrscheinlichkeit für potentiell lebensgefährliche Komplikationen, die selbst große Fortschritte in der medizinischen Behandlung beeinträchtigen können. Zu diesen Komplikationen zählt in besonderem Maße die Sepsis, die trotz hoher Fallzahlen bisher in der Öffentlichkeit nur wenig Beachtung findet.

1.1.1 Definition, Ursachen und Diagnose

Sepsis ist definiert als durch eine fehlgeleitete Immunantwort ausgelöste lebensbedrohliche Organdysfunktion, wobei die Immunantwort ursächlich gegen eine Infektion gerichtet war [1]. Bis zu dieser Definition war es ein langer Weg, da sich die Betrachtung des septischen Krankheitsbildes in den vergangenen 30 Jahren stark gewandelt hat. Die entscheidende Rolle des Immunsystems ist in dieser Zeit immer weiter in den Mittelpunkt gerückt.

Eine erste klinisch gültige Definition der Sepsis (sog. „*Sepsis-1*“) und deren Einteilung in bestimmte Stadien sowie die Zuordnung genau abgrenzbarer Symptome wurde im Jahr 1991 auf der Konsensus-Konferenz des „*American College of Chest Physicians*“ sowie der „*Society of Critical Care Medicine*“ in Chicago entwickelt [2]. Im Ergebnis der Konferenz wurde als Überbegriff die Bezeichnung „*Systemic Inflammatory Response Syndrome*“ (SIRS) geprägt. Diese verweist bereits darauf, dass es sich bei Sepsis um keine spezifische Krankheit handelt, sondern um ein Krankheitsbild mit dem Schwerpunkt Entzündung, das sich aus mehreren Symptomen zusammensetzt (sog. Syndrom). Mit dem Begriff SIRS wird demnach eine „*systemische Aktivierung des angeborenen Immunsystems ungeachtet der Ursache*“ beschrieben [3]. Als mögliche Ursachen eines SIRS kommen einerseits Infektionen als auch andererseits nicht-infektiöse Ursachen wie z. B. (Poly-) Trauma oder Verbrennungen in Betracht. Zur Diagnose müssen mindestens zwei der nachfolgend aufgeführten Kriterien erfüllt sein: erhöhte oder erniedrigte Körpertemperatur, erhöhte Herz- und/oder Atemfrequenz sowie Leukozytose oder Leukopenie.

In diesem Zusammenhang wird Sepsis als SIRS mit infektiöser Ursache definiert, wobei die Einteilung des Krankheitsverlaufs in drei Stadien erfolgt: Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock. Treffen die Kriterien für ein SIRS mit einer bestätigten Infektion zusammen, so liegt eine Sepsis vor. Eine schwere Sepsis ist zusätzlich durch eine Dysfunktion eines oder mehrerer Organe gekennzeichnet. Für den septischen Schock ist darüber hinaus ein Kreislaufversagen charakteristisch, das trotz Volumenersatztherapie und der Gabe von Vasopressoren fortbesteht. Schwere Sepsis und septischer Schock zeichnen sich darüber hinaus durch starke Bewusstseinsstörungen aus. Grundsätzlich sollten alle für die Diagnose

Einleitung

von SIRS und Sepsis genutzten Symptome eine akute Verschlechterung des Grundzustands darstellen und nicht ursächlich mit einem anderen Krankheitsbild oder einer bestimmten Therapie zusammenhängen. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen in der klinischen Routine zur Diagnose eines nicht-infektiösen SIRS und einer Sepsis eingesetzten Kriterien erfolgt in Abschnitt 4.3.4.

Im Jahr 2001 wurden die Definition als auch die Diagnosekriterien von SIRS und Sepsis durch die „*International Sepsis Definitions Conference*“ (sog. „*Sepsis-2*“) überprüft und in Teilen novelliert [3]. Das grundsätzliche Konzept des SIRS und der Sepsis als dessen infektiöse Form blieben unverändert. Auch die Einteilung der Sepsis in verschiedene Stadien wurde beibehalten. Allerdings erfolgte eine Erweiterung der Liste von Kriterien zur Diagnose der Sepsis. Zur Einschätzung der Organdysfunktion wurde der wenige Jahre zuvor eingeführte „*Sepsis-related Organ Failure Assessment Score*“ (SOFA) empfohlen.

Die Diagnosekriterien von „*Sepsis-1*“/„*Sepsis-2*“ sowie die Unterteilung in Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock haben in den vergangenen 30 Jahren eine breite klinische Anwendung gefunden. Daher wurden sie auch für die Auswahl und Einteilung der Patienten in der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten klinischen Studie verwendet.

Während der Studiendurchführung im Jahr 2016 wurde mit „*Sepsis-3*“ eine weitere Novellierung der Definition und Diagnosekriterien veröffentlicht [1]. Die wichtigste Änderung im Vergleich zu „*Sepsis-1*“ und „*Sepsis-2*“ umfasst die Abschaffung des Stadiums der schweren Sepsis und die Beschränkung des septischen Krankheitsbildes auf Patienten mit Organdysfunktion. Diese und weitere Änderungen sind jedoch Gegenstand kontroverser Diskussionen [4; 5].

Die Bedeutung der Infektion als Ursache und Anfangspunkt jeder Sepsis wird auch durch „*Sepsis-3*“ betont. Als Infektionserreger treten vor allem Bakterien (grampositive als auch gramnegative) und in geringerem aber zunehmenden Umfang auch Pilze (v. a. verschiedene *Candida*-Stämme) und Viren auf. Bei den Bakterien handelt es sich insbesondere um verschiedene Arten von *Staphylococci* und *Enterococci*, von *Pseudomonas* und *Klebsiella*, während es bei Pilzen vorrangig verschiedene *Candida*-Arten sind. Besonders hohe Mortalitätsraten werden für Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* beobachtet. Von einer Infektion betroffen sind vorwiegend das respiratorische System und der Urogenitaltrakt [6; 7].

Da es sich bei Sepsis um ein komplexes Krankheitsbild handelt, das sich aus mehreren Symptomen zusammensetzt und verschiedenste Ursachen haben kann, gibt es bisher keinen standardisierten und validierten diagnostischen Test zur Erkennung [1]. Der erste Schritt zur Diagnose einer Sepsis besteht daher in der Betrachtung der eingangs im Zusammenhang mit SIRS angeführten klinischen Parameter (Temperatur, Atem- und Herzfrequenz, Leukozytenzahl). Kernpunkt der Diagnose ist jedoch der Nachweis einer Infektion bzw. die Identifizierung des entsprechenden Pathogens, da dies für das frühzeitige Einleiten der antimikrobiellen bzw. -viralen Therapie von großer Bedeutung ist. Der mikrobiologische

Nachweis mittels Blutkultur dauert jedoch mehrere Tage und selbst die Nutzung der Polymerasekettenreaktion ist mit Analysenzeiten von einigen Stunden verbunden, weshalb zu einem frühen Zeitpunkt oftmals nur anhand von klinischen Symptomen eine Entscheidung über die einzuleitende Therapie getroffen werden kann. In etwa einem Drittel der Sepsispatienten ist darüber hinaus überhaupt kein Infektionserreger nachweisbar, was auf ein grundsätzliches Problem der Sepsisdiagnose hinweist: die Unterscheidung von nicht-infektiösem SIRS und Sepsis. Aufgrund der identischen klinischen Symptome ist eine Abgrenzung beider Formen des SIRS sehr schwierig. Von zunehmender Bedeutung sind daher Biomarker für Sepsis, von denen jedoch in der klinischen Diagnostik bisher nur Procalcitonin breite Anwendung findet. Für eine frühzeitige Diagnose der Sepsis sowie zu ihrer Abgrenzung vom nicht-infektiösen SIRS eignet sich jedoch auch Procalcitonin nur eingeschränkt. Daher besteht die dringende Notwendigkeit, neue Sepsisbiomarker zu identifizieren und mit Hilfe von klinischen Studien zu validieren, denn nur durch eine frühzeitige Diagnose kann die hohe Mortalität von Sepsispatienten gesenkt werden [8; 9].

1.1.2 Krankheitsverlauf, Behandlung und Spätfolgen

Der Verlauf einer Sepsis wurde lange als Kontinuum von drei aufeinanderfolgenden Stadien beschrieben, sodass diese modellhafte Vorstellung auch Eingang in die Leitlinien von „Sepsis-1“ und „Sepsis-2“ gefunden hat. Das Dreistadien-Modell eignet sich gut, um die klinischen Symptome einer Sepsis einzuordnen. Demnach steht am Anfang eine lokale Infektion mit einem Pathogen, welches z. B. über eine Operationswunde in Blutgefäße eindringt und sich anschließend über den Blutkreislauf im Körper ausbreitet. Dies führt zu einer generalisierten Infektion mit einer starken Immunreaktion, womit das erste Stadium der Sepsis erreicht ist. Die Immunantwort kann sich zu einer Überreaktion ausweiten, in deren Folge u. a. das Gefäßendothel geschädigt wird. Die dadurch bedingte erhöhte Durchlässigkeit der Kapillargefäßwände führt zu einem intravasalen Flüssigkeitsverlust, der eine Verringerung des Blutdrucks und letztlich eine Minderperfusion von Organen und Gewebe verursacht. Der durch die Minderperfusion ausgelöste Sauerstoffmangel führt innerhalb kurzer Zeit zur Dysfunktion eines oder mehrerer Organe (z. B. Niere, Leber), was charakteristisch für das Stadium der schweren Sepsis ist. Bestehen der niedrige Blutdruck und die Minderperfusion trotz Volumentherapie und der Gabe von Vasopressoren weiter, befindet sich der Patient im Stadium des septischen Schocks.

Die Einteilung in verschiedene Stadien kann jedoch nicht direkt auf die beteiligten zellulären und immunologischen Prozesse übersetzt werden. Um das Zusammenspiel von immunologischer Stimulation, systemischer Entzündung und Störungen des Gerinnungssystems beschreiben zu können, wird seit einigen Jahren ein biphasisches Modell genutzt (Abbildung 1). Demnach besteht die Immunantwort bei Sepsis aus zwei Phasen: einer hyper- und der darauffolgenden hypoinflammatorischen Phase. Am Beginn der hyperinflammatorischen Phase steht eine Infektion z. B. durch Bakterien oder Pilze, welche

Einleitung

direkt durch „*Pathogen-associated Molecular Patterns*“ (sog. PAMPs) sowie indirekt durch verursachte Gewebeschäden und der dabei freigesetzten bzw. präsentierten „*Damage-associated Molecular Patterns*“ (sog. DAMPs) die angeborene Immunantwort des Patienten intensiv stimulieren. Daraus resultiert eine starke Ausweitung der Biosynthese von entzündungsfördernden (z. B. TNF- α , Interleukin-2, -6 und -8) als auch -hemmenden Zytokinen (z. B. Interleukin-10), was initial zu einem „*Zytokinsturm*“ führt. Dieser induziert verschiedenste zelluläre Prozesse zur Abwehr des Infektionserregers, was z. B. zu einer starken Aktivierung von Immunzellen und zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen durch die Leber führt. Der bei septischen Patienten beobachtete intravasale Flüssigkeitsverlust lässt sich in diesem Zusammenhang vor allem auf eine Schädigung des Gefäßendothels durch die verstärkte Freisetzung proteolytischer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies durch aktivierte Neutrophile zurückführen. Darüber hinaus führt die Aktivierung des Gerinnungssystems zur Vasodilatation, was den Effekt des Flüssigkeitsverlustes weiter verstärkt. Die hyperinflammatorische Phase dominiert meist die ersten Tage einer Sepsis, wobei sie nur mit einer geringen Mortalität verbunden ist.

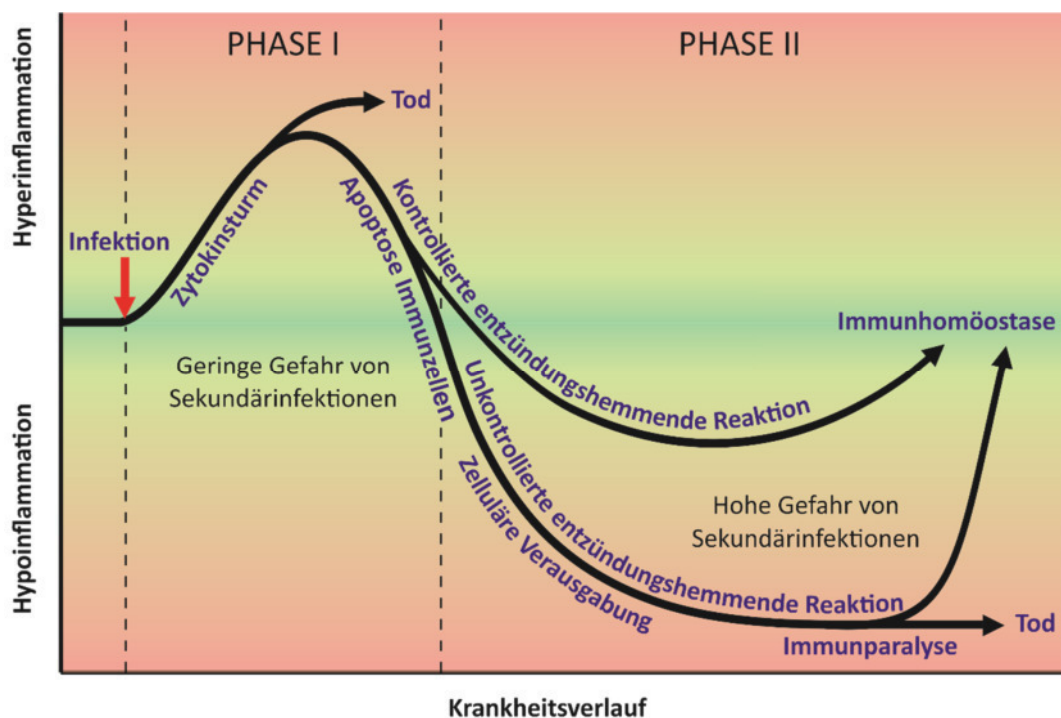


Abbildung 1: Modellhafte Darstellung des Krankheitsverlaufs der Sepsis sowie der beteiligten immunologischen Prozesse (verändert nach [10]).

Bei jeder Aktivierung des Immunsystems werden auch gegenläufige Prozesse initiiert, die eine Rückkehr zur Immunhomöostase ermöglichen. So wird bereits während der Induktion der Immunantwort die Anzahl der Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems mittels Apoptose verringert, um die Reaktion von vornherein zu begrenzen. Der Verlauf dieser „*Gegenantwort*“ hat entscheidenden Einfluss auf den Ausgang der hyperinflammatorischen

Phase. Entweder erfolgt durch eine kontrollierte entzündungshemmende Reaktion eine Rückkehr zur Immunhomöostase oder durch eine unkontrollierte Reaktion die Ausbildung einer hypoinflammatorischen Phase. Für die Ausbildung dieser auch als Immunparalyse bezeichneten Phase sind verschiedenste Mechanismen verantwortlich. Von zentraler Bedeutung ist der Verlust an Zellen der erworbenen Immunantwort (T-, B- und dendritische Zellen) durch Apoptose, die zelluläre Verausgabung von T-Zellen sowie die reduzierte Biosynthese entzündungsfördernder Zytokine. In der Folge zeigen die Patienten eine nur noch (sehr) eingeschränkte Abwehrreaktion auf Pathogene, was Sekundärinfektionen insbesondere durch opportunistische Erreger und Beatmungs-assoziierte Pneumonien begünstigt und zu einer im Vergleich mit der hyperinflammatorischen Phase deutlich höheren Mortalität führt [10; 11].

Weder das Dreistadien- noch das biphasische Modell des Krankheitsverlaufs bilden alle Facetten des septischen Krankheitsbildes ab. So können pro- und entzündungshemmende Prozesse während einer Sepsis wiederholt zu verschiedenen Zeiten oder auch simultan und vor allem mit variabler Intensität ablaufen. Auch ein Abgleich der beiden Modelle ist schwierig, da je nach Ausprägung der hyper- und hypoinflammatorischen Phase die verschiedenen Stadien der Sepsis früher oder später bzw. überhaupt nicht eintreten.

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung der Sepsis ist die Beseitigung der Infektionsquelle durch eine antimikrobielle Therapie und gegebenenfalls eine operative Fokussanierung. Von zentraler Bedeutung ist dabei der „*Hit early and hit hard*“-Ansatz, der eine möglichst frühzeitige Einleitung sowie eine breite antimikrobielle bzw. -virale Therapie vorsieht [12]. Da es bisher nicht möglich ist, die für die Ausbildung der hyper- und hypoinflammatorischen Phase verantwortlichen Prozesse mit Hilfe von geeigneten Medikamenten zu beeinflussen, konzentriert sich die Behandlung neben der antimikrobiellen Therapie vor allem auf unterstützende Verfahren. Hierzu zählt insbesondere die frühzeitige Volumentherapie, mit deren Hilfe der Blutdruck stabilisiert und damit die zelluläre Sauerstoffversorgung sichergestellt werden. Andernfalls ist eine Minderperfusion der Gewebe und Organe wahrscheinlich, was einer Organdysfunktion erheblichen Vorschub leistet. Führt die Volumentherapie zu keiner Verbesserung der Sauerstoffversorgung, erfolgt der Einsatz von Vasopressoren (z.B. Dopamin, Dobutamin). Aufgrund der Schwierigkeit die Sepsis frühzeitig zu diagnostizieren und der damit einhergehenden Verzögerung in der Einleitung einer adäquaten Therapie, tritt eine Organdysfunktion (insbesondere Lunge, Nieren und Leber) bei Sepsispatienten häufig auf. Daher sind Organunterstützungsverfahren wie Dialyse und mechanische Beatmung oftmals essentieller Bestandteil der Behandlung.

Der Großteil der Überlebenden insbesondere der schweren Sepsis und des septischen Schocks leidet unter funktionellen Einschränkungen, die länger als 12 Monate andauern und daher als Spätfolgen bezeichnet werden. Die Spätfolgen umfassen eine Vielzahl von motorischen und neurologischen Einschränkungen, die unter den Bezeichnungen „*Critical Illness Polyneuropathy*“ und „*Critical Illness Myopathy*“ subsummiert werden. Im Allgemeinen

zeigen die meisten von Spätfolgen betroffenen Patienten Zeichen beider Arten von Einschränkungen, deren primäre Ursache die für Sepsis charakteristischen übermäßigen Entzündungsprozesse und der durch Minderperfusion ausgelöste Sauerstoffmangel sind. Daraus resultiert zum einen der dauerhafte Verlust von neuronalen sowie Muskelzellen und zum anderen weisen die überlebenden Zellen tiefgreifende Veränderungen u. a. des Stoffwechsels, der Biosynthese und des Energiehaushalts auf. So zeigen die Betroffenen neben neurokognitiven Auffälligkeiten (z. B. posttraumatischer Stress, Depressionen, Demenz) insbesondere motorischen Einschränkungen der Muskulatur der Atmung und der Gliedmaßen [13; 14].

1.1.3 Epidemiologie

Im Jahr 2013 erkrankten in deutschen Krankenhäusern insgesamt 279.530 Patienten an Sepsis¹ (davon 29,2 % an schwerer Sepsis und 12,1 % an septischem Schock), von denen 67.849 daran verstarben. Dies entspricht einer Mortalitätsrate von 24,3 %, womit Sepsis zu den häufigsten Todesursachen in deutschen Kliniken zählt [15].

Die größte Prävalenz für Sepsis zeigen multimorbide Patienten von Intensivstationen. Schwere Vorerkrankungen oder Unfälle, ein geschwächter Allgemeinzustand sowie lebensbedrohliche Verletzungen oder große Operationswunden bieten ideale Voraussetzungen für die Infektion mit einem Krankheitserreger und die nachfolgende Überreaktion des ohnehin bereits stark stimulierten Immunsystems.

Der in den vergangenen Jahren beobachtete Anstieg der Sepsis-Fallzahlen um durchschnittlich etwa 5,7 % pro Jahr lässt sich vermutlich auf die Ausweitung intensivmedizinischer Therapien und vor allem die Zunahme des Anteils älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung erklären. Eine immer größere Zahl älterer Menschen führt auch zu einer Zunahme von Krankheiten wie z. B. Krebs. Diese sind wiederum mit intensivmedizinischen Maßnahmen verbunden, welche ein erhebliches Risiko für die Entwicklung einer Sepsis darstellen. Eine Sepsis stellt also fast immer den (finalen) Höhepunkt einer schweren Erkrankung dar, verbunden mit einer deutlich verschlechterten Prognose und mit einer starken Zunahme der Behandlungs- und Nachsorgekosten [15].

1.2 Biomarker

Als Biomarker wird ein definiertes und vor allem mess- bzw. bestimmbares Merkmal bezeichnet, das als Indikator für einen normalen biologischen Vorgang, einen pathogenen Prozess oder der pharmakologischen Antwort auf eine Therapie genutzt werden kann [16]. Biomarker werden anhand des Einsatzbereiches in verschiedene Gruppen eingeteilt, zu denen u. a. folgende zählen: Monitoring, Pharmakodynamik, Prognose und Diagnose. Diagnostische Biomarker ermöglichen den Nachweis oder die Bestätigung einer bestimmten Krankheit, eines Krankheitszustandes oder eines Subtyps. Im theoretischen Idealfall besitzen (diagnostische)

¹ Diagnose nach „Sepsis-2“.

Biomarker eine 100 %-ige Sensitivität (alle Patienten mit der entsprechenden Krankheit werden erkannt) und Spezifität (alle Patienten, die nicht an der entsprechenden Krankheit leiden, werden als solche erkannt). Ein idealer Biomarker ist demnach möglichst sensitiv und spezifisch. Darüber hinaus sollte er mit möglichst geringem Aufwand (kosten- und zeiteffektiv) akkurat und reproduzierbar zu bestimmen sein [11; 16; 17].

1.2.1 Biomarker für Sepsis

Eine Vielzahl von Biomarkern ist für die Sepsis beschrieben, allerdings besitzen die meisten eine nur unzureichende Spezifität und Sensitivität, weshalb sie keine oder nur eingeschränkte Anwendung in der klinischen Diagnostik finden [18]. Die Ziele des klinischen Einsatzes von Biomarkern für Sepsis bestehen vor allem in der frühzeitigen Diagnose sowie der Unterscheidung von Patienten mit nicht-infektiösem SIRS. Darüber hinaus sind auch Aussagen über den vermutlichen Krankheitsverlauf von Interesse. Eine Auswahl von bisher beschriebenen bzw. in der Klinik eingesetzten Biomarkern für Sepsis ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 – Biomarker für Sepsis

Status	Biomarker	Biologischer Hintergrund	Stimuli
Klinischer Einsatz	Procalcitonin	Prohormon	Bakterielle Infektion
	C-reaktives Protein	Akute-Phase-Protein	Entzündung, Infektion, Gewebeschäden
	Interleukin-6	Zytokin	Bakterielle und virale Infektion, chirurgische Eingriffe
	Interleukin-10	Zytokin	Entzündung, Infektion
Klinische Studie	Adrenomedullin	Hormon	Entzündung, Infektion
	Presepsin	Fragment von CD14	Bakterielle Infektion
	CAAP48	Fragment von Alpha-1-Antitrypsin	Infektion

Die für eine Sepsis charakteristischen Prozesse der Infektion und Entzündung finden zunächst vor allem im Blut statt und sind daher auch dort unmittelbar nachweisbar. Alle bisher beschriebenen Biomarker für Sepsis sind deshalb Blut-basiert. Von Bedeutung für die klinische Diagnose der Sepsis sind insbesondere Procalcitonin (PCT) und in geringerem Umfang auch das C-reaktive Protein (CRP).

Bei Procalcitonin handelt es sich um das Prohormon von Calcitonin. Im Falle einer bakteriellen Infektion wird es v. a. durch Zellen der Leber, Niere und Muskeln gebildet. Die PCT-Konzentration im Blut kann infolge von Entzündungsprozessen auf das Tausendfache ansteigen. Anhand von Schwellenwerten der Blutserumkonzentration von Procalcitonin

Einleitung

können schwere Sepsis und septischer Schock ausgeschlossen bzw. mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt werden. Hohe PCT-Werte sind darüber hinaus ein Indikator für eine schlechte Prognose. Procalcitonin wird daher großflächig in der klinischen Diagnose der Sepsis eingesetzt. Für den frühzeitigen Nachweis der Sepsis sowie zu ihrer Abgrenzung vom nicht-infektiösen SIRS eignet es sich jedoch nur eingeschränkt [12; 19; 20].

Der nach Procalcitonin am häufigsten in der Diagnose der Sepsis eingesetzte Biomarker ist das C-reaktive Protein, bei dem es sich um ein Akute-Phase-Protein handelt. Da die Expression letzterer generell durch Infektion, Entzündung und/oder Gewebeschäden induziert wird, besitzt es eine nur geringe Spezifität für die Sepsis. Dies gilt allerdings nur für erwachsene Sepsispatienten. Als Marker der neonatalen Sepsis ist es hingegen von großer klinischer Bedeutung [11; 19].

Während der initialen Phase der Sepsis werden große Mengen an Zytokinen freigesetzt, weshalb die Nutzung bestimmter Zytokine als Biomarker bereits frühzeitig in Erwägung gezogen wurde. Bei den in Tabelle 1 aufgeführten Zytokinen handelt es sich um das entzündungsfördernde Interleukin-6 und das entzündungshemmende Interleukin-10. Vorteil der Verwendung von Zytokinen für die Diagnose der Sepsis ist deren frühe Induktion, weshalb schon unmittelbar nach einer Infektion ein Konzentrationsanstieg im Blut nachweisbar ist. Da es sich bei Interleukin-10 um ein entzündungshemmendes Zytokin handelt, steigt dessen Konzentration insbesondere in der hypoinflammatorischen Phase der Sepsis an und kann daher als Indikator für diese eingesetzt werden. Allerdings stimulieren verschiedenste Formen von Infektionen und Entzündungen die Expression von Zytokinen, weshalb ein entsprechender Konzentrationsanstieg keine Rückschlüsse auf eine bestimmte Erkrankung zulässt. Auch eine Unterscheidung von Sepsis und nicht-infektiösem SIRS ist daher nicht möglich. Damit eignen sich Zytokine nur sehr eingeschränkt für die Diagnose der Sepsis.

Es fehlt demnach an Biomarkern, die für Sepsis spezifisch sind und eine frühzeitige Diagnose ermöglichen. Unter den derzeit in klinischen Studien auf ihre Eignung als Biomarker untersuchten Biomolekülen gibt es mehrere interessante Kandidaten. Zu diesen zählen beispielsweise Adrenomedullin und Presepsin.

Adrenomedullin ist ein Peptidhormon, was nahezu ubiquitär exprimiert wird. Durch seine Beteiligung an der Regulation der endothelialen Barrierefunktion und des Gefäßtonus sichert es die Blutversorgung von Geweben und Organen. Es besitzt weiterhin eine ausgeprägte vasodilatatorische Aktivität. Damit ist es eng mit zwei pathobiochemischen Kernprozessen der Sepsis verbunden: der Schädigung des Gefäßendothels und der starken Vasodilatation. Die Konzentration von Adrenomedullin ist im Blut von Patienten mit Sepsis erhöht und korreliert sowohl mit der Vasodilatation als auch dem Schweregrad. Die Eignung von Adrenomedullin zur Diagnose als auch zur Therapie der Sepsis wird derzeit intensiv in klinischen Studie untersucht [19; 21].

Presepsin leitet sich vom „*Cluster of Differentiation*“ 14 (CD14) ab, einem Rezeptor für Lipopolysaccharide und Lipopolysaccharid-bindende Proteine auf der Zelloberfläche von

Monozyten und Makrophagen. CD14 besitzt eine große Bedeutung für die Erkennung von Infektionserregern durch die angeborene Immunantwort. Während einer Infektion wird durch Plasmaproteasen ein lösliches Fragment aus CD14 freigesetzt, das sowohl als sCD14 als auch (insbesondere im Zusammenhang mit Sepsis) als Presepsin bezeichnet wird. Presepsin scheint insbesondere für die Frühdiagnose einer bakteriellen Sepsis geeignet zu sein [19].

Ein weiterer Kandidat für einen spezifischen und sensitiven Sepsisbiomarker konnten Kiehntopf *et al.* identifizieren [22]. Hierbei handelt es sich um ein Fragment des Akute-Phase-Proteins Alpha-1-Antitrypsin, das als CAAP48 bezeichnet wird und dessen Konzentration im Blut von Sepsispatienten erhöht ist. Eine ausführliche Beschreibung von CAAP48 ist im nachfolgenden Abschnitt enthalten.

1.2.2 Alpha-1-Antitrypsin und CAAP48

Bei Alpha-1-Antitrypsin (AAT) handelt es sich um ein 52 kDa großes Akute-Phase-Protein aus der Superfamilie der Serpine, das ein potenter Inhibitor von Serinproteasen ist und darüber hinaus vielfältige immunomodulatorische Funktionen besitzt. Die inhibitorische Aktivität richtet sich vor allem gegen neutrophile Elastase, womit Alpha-1-Antitrypsin eine wichtige protektive Wirkung für Lungengewebe aufweist. Des Weiteren inhibiert es auch Cathepsin G, Proteinase 3 und verschiedene Caspasen, wodurch Prozesse der Apoptose reguliert werden. Dies verweist bereits auf die immunomodulatorische Funktion, die u. a. auch die Hemmung der neutrophilen Chemotaxis umfasst. Letzteres wirkt insbesondere auf das Lungengewebe entzündungshemmend [23; 24].

Der Hauptbildungsort von Alpha-1-Antitrypsin sind die Hepatozyten der Leber, von denen es direkt ins Blut sezerniert wird. Außerdem exprimieren viele weitere Zellen Alpha-1-Antitrypsin. Hierzu zählen u. a. Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen der Lunge. Da es sich um ein Akute-Phase-Protein handelt, wird seine Expression durch Infektion und Entzündung unmittelbar verstärkt, wodurch die Konzentration im Blut stark ansteigt.

Alpha-1-Antitrypsin wird durch das *SERPINA1*-Gen kodiert, für das bisher mehr als 100 Polymorphismen beschrieben sind. Darunter befinden sich zahlreiche Punktmutationen, die teilweise mit einem erhöhten Risiko für die Ausprägung eines Alpha-1-Antitrypsin-Mangels verbunden sind. Derartige Mutationen führen bereits in den produzierenden Zellen zu einer Fehlfaltung, woraus die intrazelluläre Akkumulation und Aggregation von nicht funktionsfähigem Alpha-1-Antitrypsin resultiert. Dies führt beispielsweise in der Leber zum großflächigen Absterben von Hepatozyten, wodurch sich bereits bei Kinder und Jugendlichen das Krankheitsbild der Leberzirrhose ausbilden kann. Der durch die Akkumulation und das Absterben von Hepatozyten ausgelöste Alpha-1-Antitrypsin-Mangel ermöglicht den Anstieg von Entzündungsprozessen in der Lunge und führt darüber hinaus zu einer übergesteigerten Aktivität der neutrophilen Elastase. Dadurch erfolgt ein übermäßiger Abbau von Elastin, woraus sich ein Lungenemphysem und verschiedene weitere Bindegewebsschäden entwickeln können [24; 25].

Einleitung

Alpha-1-Antitrypsin umfasst im sezernierten Zustand 394 Aminosäuren und besitzt eine globuläre Struktur, die aus drei β -Faltblättern (bezeichnet als A, B, C) und neun α -Helices besteht. Die Aminosäuren 354 bis 378 bilden einen „*Reactive Centre Loop*“, der unter starker konformationeller Spannung steht und in dessen N-terminaler Sequenz sich das aktive Zentrum (umfasst Met358) befindet (Abbildung 2).

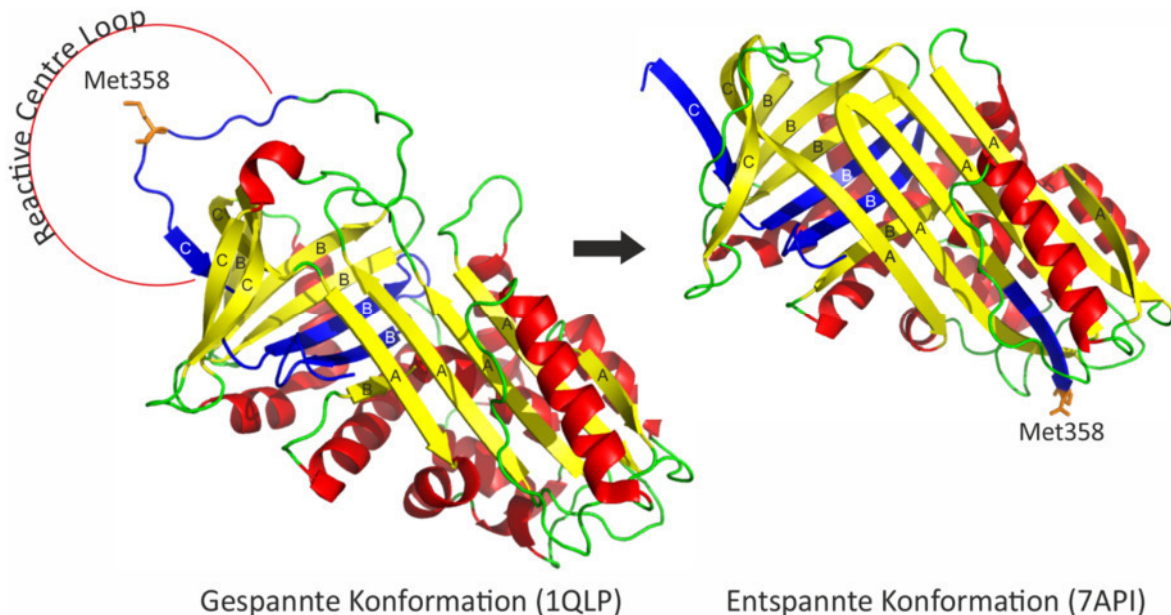


Abbildung 2: Struktur von Alpha-1-Antitrypsin und CAAP48 (blau) vor und nach proteolytischer Spaltung im aktiven Zentrum (Met358).

Eine zu inhibierende Serinprotease erkennt den „*Reactive Centre Loop*“ als Pseudosubstrat, bindet und spaltet im aktiven Zentrum die Bindung zwischen Met358 und Ser359. Durch die proteolytische Spaltung des „*Reactive Centre Loop*“ wird die in Form der Spannung gespeicherte potentielle Energie freigesetzt, was zu einer Konformationsänderung des Alpha-1-Antitrypsin sowie der gebundenen Protease führt. Die beiden neu gebildeten Enden der Polypeptidkette des Alpha-1-Antitrypsins bewegen sich dadurch weit auseinander. Der N-terminale Abschnitt des „*Reactive Centre Loop*“ dringt in der Folge in das β -Faltblatt A ein und bildet einen zusätzlichen β -Strang aus. Es entsteht die entspannte Konformation, die wesentlich stabiler ist als die gespannte. Die gebundene Protease wird durch die Konformationsänderung des Alpha-1-Antitrypsin inaktiviert und es erfolgt schließlich der Abbau des Komplexes [26–28].

Alpha-1-Antitrypsin kann jedoch auch durch Proteasen inaktiviert werden. Dies erfolgt, indem diese die Polypeptidkette am N-terminalen Ende des „*Reactive Centre Loop*“ spalten, wodurch die konformationelle Spannung freigesetzt und Alpha-1-Antitrypsin inaktiviert wird. Bereits im Jahre 1988 konnten Vissers *et al.* die Inaktivierung von Alpha-1-Antitrypsin durch die Metalloproteinasen Kollagenase (Matrix-Metalloproteinase 8) und Gelatinase (Matrix-Metalloproteinase 9) aus humanen Neutrophilen nachweisen [29]. Mittlerweile sind weitere

Proteasen bekannt, die Alpha-1-Antitrypsin durch Spaltung des „*Reactive Centre Loop*“ inaktivieren. Zu diesen gehören u. a. Aureolysin (aus *Staphylococcus aureus*), Periodontain (aus *Porphyromonas gingivalis*) sowie die humane Matrix-Metalloproteinase 3 (auch als Stromelysin-1 bezeichnet) [30; 31].

Die angeführten Proteasen spalten die Bindung zwischen Phe352 und Leu353, wodurch ein 42 Aminosäuren umfassendes C-terminales Spaltprodukt entsteht. Da es eine Molekularmasse von 4,8 kDa aufweist und sich vom C-Terminus des Alpha-1-Antitrypsins ableitet, wird es als CAAP48 (C-terminales Alpha-1-Antitrypsin Peptid) bezeichnet. Blaurock *et al.* konnten nachweisen, dass die Plasmakonzentration von CAAP48 bei Patienten mit Sepsis drei- bis vierfach höher ist als bei Patienten, die an einem nicht-infektiösen SIRS oder einer HIV-Infektion litten. Dies deutet darauf hin, dass sich CAAP48 als Biomarker für die Diagnose der Sepsis sowie zur Unterscheidung vom nicht-infektiösen SIRS eignet. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass CAAP48 verschiedene immunomodulatorische Funktionen ausübt. Hierzu zählen beispielsweise die Aktivierung von Neutrophilen, was auch die Induktion neutrophiler Chemotaxis umfasst, sowie die Freisetzung von Zytokinen. CAAP48 wirkt demnach entzündungsfördernd. In einem Liver-on-a-Chip-Modell konnten Blaurock *et al.* weiterhin zeigen, dass CAAP48 ein Auslöser von hepatozellulärer Dysfunktion ist. Die Ursachen hierfür bestehen u. a. im Aufbrechen der endothelialen Barrierefunktion durch die Beeinflussung der hepatischen Proteinexpression, der Schädigung von Tight Junctions sowie durch Veränderung des Zytoskeletts [22; 32; 33].

Der für CAAP48 maßgebliche Abschnitt der Aminosäuresequenz von Alpha-1-Antitrypsin ist abgesehen vom „*Reactive Centre Loop*“ über viele intramolekulare Wechselwirkungen (v. a. Wasserstoffbrückenbindungen) in der Proteinstruktur verankert. So ist der C-Terminus des CAAP48 in der gespannten und vermutlich auch in der entspannten Konformation Bestandteil des β -Faltblatts B (Abbildung 2). Die proteolytische Spaltung am C-Terminus von Alpha-1-Antitrypsin führt somit zwar zur Bildung von CAAP48, woraus allerdings nicht unmittelbar dessen Freisetzung aus der Proteinstruktur resultieren dürfte. Dies gilt umso mehr, da sich durch die proteolytische Spaltung zwischen Phe352 und Leu353 mit hoher Wahrscheinlichkeit die gleiche oder zumindest eine ähnliche entspannte Konformation bildet, wie sie bereits für die Spaltung des aktiven Zentrums bekannt ist. Für eine etwaige experimentelle Analyse muss CAAP48 also mit hoher Wahrscheinlichkeit zuerst durch eine auf die Proteinstruktur denaturierend wirkende Probenvorbereitung freigesetzt werden.

Bildung und entzündungsfördernde Wirkung von CAAP48 sind eng mit den bei einer Sepsis beobachteten zellulären Prozessen verbunden. In die Blutbahn eingedrungene Bakterien sezernieren Proteasen, die Alpha-1-Antitrypsin spalten. Dies führt zum Verlust der entzündungshemmenden Aktivität, woraus infolge der fehlenden Regulierung von beispielsweise der neutrophilen Elastase Gewebeschäden (insbesondere in der Lunge) resultieren können. Durch die entstandenen DAMPs werden Neutrophile aktiviert.

Einleitung

Gleichzeitig wirkt das gebildete CAAP48 entzündungsfördernd, indem es ebenfalls die Aktivität von Neutrophilen stimuliert, welche daraufhin verstärkt neutrophile Proteasen (z. B. Kollagenase, Gelatinase) exprimieren. Diese sind ihrerseits wiederum in der Lage intaktes Alpha-1-Antitrypsin zu spalten. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass mit steigender Intensität der Immunreaktion die Spaltung und damit die Inaktivierung von Alpha-1-Antitrypsin zunimmt. Dadurch wird zusätzliches CAAP48 gebildet, das die Immunreaktion weiter verstärkt. Der Gesamtprozess verweist auf eine positive Rückkopplung der Bildung von CAAP48 und der Intensität der Immunreaktion (Abbildung 3).

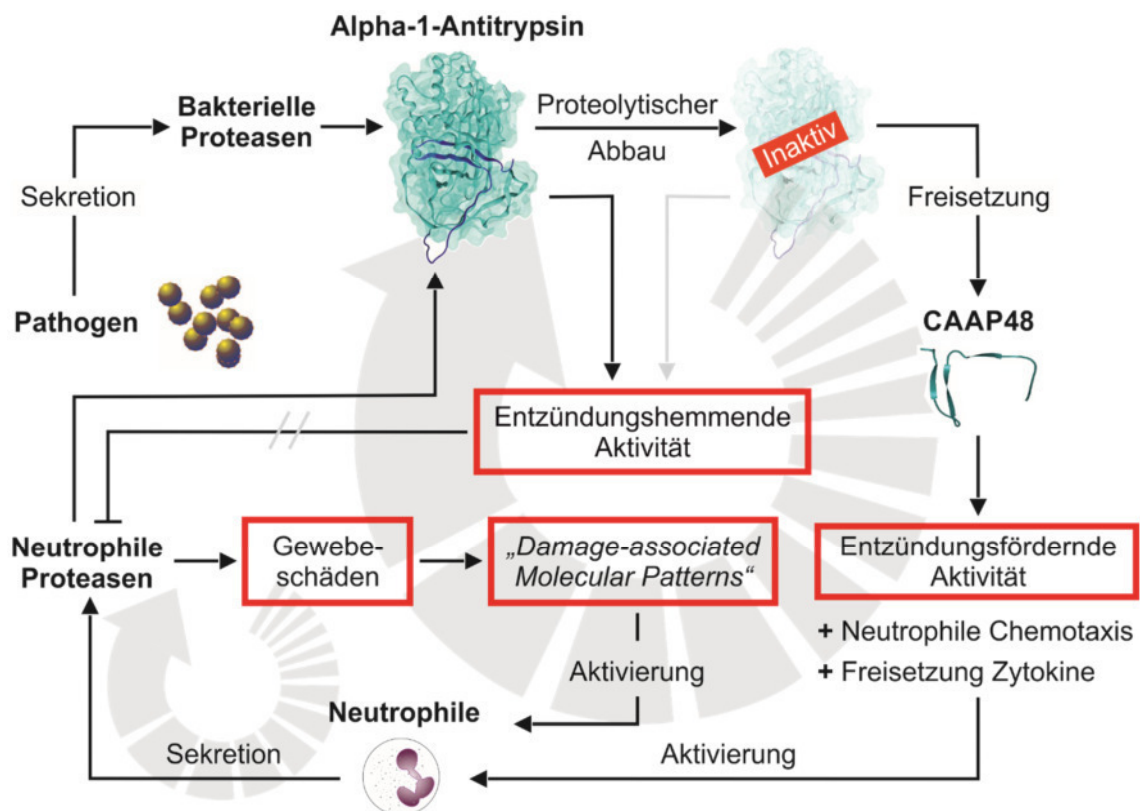


Abbildung 3: Modellhafte Darstellung der positiven Rückkopplung zwischen der Spaltung von Alpha-1-Antitrypsin und der Bildung von CAAP48.

Im Ergebnis dürfte dieser Mechanismus zur Überreaktion des Immunsystems in der ersten Phase einer Sepsis beitragen. Die Spaltung von Alpha-1-Antitrypsin ist demnach vermutlich eng mit den für die Ausbildung einer Sepsis entscheidenden zellulären Prozesse verbunden, was auf eine grundsätzliche Eignung von CAAP48 als Sepsisbiomarker hinweist.

Um bestimmen zu können, ob sich CAAP48 als spezifischer und sensibler Biomarker für Sepsis eignet, ist eine klinische Validierung notwendig. Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit eines empfindlichen und verlässlichen Quantifizierungsverfahrens. In einem frühen Stadium der Validierung eines peptidogenen Biomarkers bietet sich der Einsatz massenspektrometrischer Methoden an, weil mit ihrer Hilfe auch Informationen über den

molekularen Zustand (z. B. Art und Anzahl biologischer und artifizieller Aminosäuremodifikationen) erhalten werden. Gleichzeitig ist jedoch für die Methodenentwicklung die genaue Kenntnis der Proteoformen des Biomarkers wichtig, weshalb nachfolgend die bisher bekannten Punktmutationen und posttranslationalen Modifikationen besprochen werden.

Von den zahlreichen bekannten Punktmutationen im *SERPINA1*-Gen befinden sich sieben in dem für die Aminosäuresequenz von CAAP48 kodierenden Abschnitt². Diese Punktmutationen sind zusammen mit der jeweiligen „Minor Allel Frequency“ (MAF), welche die relative Häufigkeit des die Punktmutation tragenden Allels wiedergibt, in Tabelle 2 übersichtsweise aufgeführt.

Tabelle 2 – Einfluss von Punktmutationen auf die Aminosäuresequenz von CAAP48

Position	Aminosäurerest		MAF ³ (%)
	Kanonisch	Mutation	
358	Met	Arg	Unbekannt ⁴
362	Pro	His	<0,01 ⁴
		Thr	0,01 ⁴
363	Glu	Lys	0,18 ⁵
369	Pro	Leu	<0,01 ⁴
376	Glu	Asp	28,00 ⁵
391	Pro	His	Unbekannt ⁴

Die Punktmutationen verteilen sich gleichmäßig in der Aminosäuresequenz von CAAP48. Auf die Bildung von CAAP48 sollten sie keinen Einfluss haben, da sie nicht im Bereich der Spaltstelle (zwischen Position 352 und 353) zu finden sind. Den mit großem Abstand höchsten MAF-Wert weist die Mutation E376D mit 28,0 % auf. Der MAF-Wert der anderen Mutationen ist entweder unbekannt oder sie treten derart selten auf, dass sie bei einer Analyse von CAAP48 unberücksichtigt bleiben können.

Um einzuschätzen, mit welcher Wahrscheinlichkeit das mutierte CAAP48 im Blut eines Menschen auftritt, muss die relative Häufigkeit der für die Punktmutation E376D beobachteten Genotypen betrachtet werden. Diese beträgt 50,4 % für homozygote Träger des Wildtyp-Allels, 40,3 % für heterozygote Träger des mutierten Allels sowie 9,3 % für

² UniProt-Eintrag „P01009“, abgerufen am 11. März 2019.

³ Die MAF-Werte wurden den Einträgen der Punktmutationen in der „Single Nucleotide Polymorphism Database“ (dbSNP) entnommen, abgerufen am 11. März 2019.

⁴ „Trans-Omics for Precision Medicine“-Programm (TopMed)

⁵ „1000 Genomes Project“ [34]

Einleitung

homozygote Träger der Mutation [35]. Mutiertes CAAP48 ist demnach im Blut von vielen Menschen zu finden und muss daher insbesondere bei der Massenspektrometrie-gestützten Quantifizierung in das entsprechende Verfahren einbezogen werden. Da es aufgrund der Punktmutation eine im Vergleich mit dem Wildtyp-CAAP48 geringfügig kleinere Molekularmasse aufweist, wird es als CAAP47 bezeichnet. Die Bildung von CAAP47 und CAAP48 erfolgt vermutlich durch die gleichen proteolytischen Enzyme.

Im Unterschied zu den verschiedenen Punktmutationen ist für den C-terminalen Sequenzabschnitt von Alpha-1-Antitrypsin bisher nur eine einzige posttranslationale Modifikation beschrieben. Hierbei handelt es sich um die Phosphorylierung von Ser383. Allerdings wurde die Phosphorylierung bisher in erst einer Veröffentlichung genannt [36]. Es ist ungeklärt, in welcher Häufigkeit sie auftritt und welche Funktion sie hat.

Für die Entwicklung eines massenspektrometrischen Quantifizierungsverfahrens für CAAP48 müssen demzufolge insgesamt zwei Proteoformen berücksichtigt werden: CAAP48 (kanonische Form) und CAAP47 (Punktmutation tragende Form). Die Aminosäuresequenzen und Molekularmassen von CAAP47 und CAAP48 sind in Tabelle 3 aufgeführt, wobei der Abschnitt des „*Reactive Centre Loop*“ unterstrichen und das aktive Zentrum (blau) sowie die Punktmutation (rot) farbig hervorgehoben sind.

Tabelle 3 – Aminosäuresequenzen von CAAP47 und CAAP48

Bezeichnung	Aminosäuresequenz (353-394) ⁶	Molekularmasse (Da)
CAAP48	H ₂ N-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK-OH	4789,7
CAAP47	H ₂ N-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIDQNTKSPLFMGKVVNPTQK-OH	4775,7

1.3 Massenspektrometrie

1.3.1 Einführung

Massenspektrometrie ist definiert als die Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) von freien Ionen im Hochvakuum. Sie stellt die genaueste und empfindlichste Technik dar, um die Molekularmasse von (Bio-) Molekülen zu bestimmen.

Seit Beginn der 1990er Jahre hat sich die Massenspektrometrie zu einer der wichtigsten analytischen Techniken für die Analyse von Peptiden und Proteinen entwickelt. Die Anwendung massenspektrometrischer Methoden zur Aufklärung von biologischen Fragestellungen hat die Entwicklung der Biowissenschaften in den vergangenen 30 Jahren beflügelt [37; 38].

⁶ Die Bezeichnung der Aminosäurepositionen orientiert sich an der kanonischen Sequenz von Alpha-1-Antitrypsin (UniProt-Eintrag „*P01009*“, abgerufen am 27. Juli 2018). Die Punktmutation E376D ist rot markiert.

Die Definition der Massenspektrometrie verweist bereits auf den grundlegenden dreigeteilten Aufbau eines jeden Massenspektrometers mit Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor. Daraus ergibt sich der grundsätzliche Ablauf einer massenspektrometrischen Messung: In der Ionenquelle erfolgt zunächst die Ionisierung der bzw. des Analyten sowie unmittelbar im Anschluss die Beschleunigung der Analyt-Ionen. Der Ionisierungsprozess ist von entscheidender Bedeutung, da sich Neutralteilchen nicht oder nur sehr schwer manipulieren lassen. Ionen hingegen können mit elektrischen und magnetischen Feldern gebündelt, abgelenkt oder getrennt werden. Der sich an die Ionenquelle anschließende Massenanalysator ermöglicht die Auftrennung der zuvor beschleunigten Analyt-Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses. Am Ausgang des Massenanalysators befindet sich der Detektor, der die Ionen nachweist und damit die Messung abschließt.

Die starke Beschleunigung der Analyt-Ionen in der Ionenquelle erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es durch Kollisionen mit Gasmolekülen zur unkontrollierten Fragmentierung kommt. Aus diesem Grund herrscht sowohl in der Quelle als auch im Analysator ein Hochvakuum (Druck $<10^{-6}$ bis 10^{-7} mbar).

Bei der Massenspektrometrie-gestützten Analyse von proteinogenen Analyten kann man drei grundsätzliche Vorgehensweisen unterscheiden:

1. Bestimmung der Molekularmasse des intakten Analyten aus dem Ladungszustand oder den Ladungszuständen des Molekül-Ions,
2. ungerichtete Fragmentierung („*In-source Decay*“, ISD) des intakten Analyten innerhalb der Ionenquelle eines MALDI-Massenspektrometers zur Sequenzaufklärung der Proteintermini,
3. proteolytischer Verdau und anschließende selektive Fragmentierung der proteolytischen Bruchstücke des Analyten mittels „*Collision-induced Dissociation*“ (CID) oder „*Post-source Decay*“ (PSD) zur Sequenzaufklärung.

Von herausgehobener Bedeutung ist die gezielte Fragmentierung von Analyten im Massenspektrometer, da aus den dabei erzeugten Fragmentspektren (auch als MS/MS-Spektren bezeichnet) strukturelle Informationen über das untersuchte Molekül abgeleitet werden können. So erlauben Fragmentspektren die Identifizierung der Aminosäuresequenz sowie den Nachweis posttranslationaler bzw. artifizieller Aminosäuremodifikationen.

Die Ionisierung des Analyten ist die Grundvoraussetzung für die Durchführung einer massenspektrometrischen Analyse. Viele der in den Anfangsjahren der biologischen Massenspektrometrie genutzten Ionisierungsverfahren wie die Elektronenstoßionisierung (EI) und das „*Fast Atom Bombardement*“ (FAB) führten bereits in der Ionenquelle zu einer starken Fragmentierung insbesondere großer (Bio-)Moleküle wie z. B. Proteine oder Kohlenhydrate. Intakte Molekül-Ionen konnten nur in Ausnahmefällen beobachtet werden. Erst die in den späten 1980er Jahren erfolgte Entwicklung von „sanften“ Ionisierungsverfahren wie der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation („*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation*“, MALDI) sowie der Elektrospray-Ionisation (ESI) hat die Analyse von

Einleitung

intakten Biomolekülen ermöglicht und damit entscheidend zur rasanten Verbreitung massenspektrometrischer Anwendungen in den Biowissenschaften beigetragen. Auch in der klinischen Routineanalytik werden massenspektrometrische Verfahren zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen eingesetzt, wie beispielsweise die MALDI-TOF-basierte Identifizierung von Mikroorganismen in klinischen Proben zeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Arten von Massenspektrometern genutzt, die als MALDI-TOF/TOF- und ESI-Tripelquadrupol-Massenspektrometer bezeichnet werden. In den folgenden Abschnitten werden beide Gerätetypen und die damit verbundenen Grundlagen und Messprinzipien übersichtsweise beschrieben.

1.3.2 MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer

1.3.2.1 Instrumentelle Grundlagen

Die Ionenquelle eines MALDI-Massenspektrometers besteht aus einem evakuierten Stahlbehälter sowie einer daran montierten Luftschiele. Innerhalb des Behälters befindet sich eine Mechanik zur Aufnahme und Bewegung des Probenträgers, der durch die Luftschiele ins Hochvakuum der Ionenquelle transportiert wird. Unmittelbar oberhalb des eingefahrenen Probenträgers ist eine Ionenoptik mit mehreren Elektroden angeordnet, welche für Fokussierung und Beschleunigung der erzeugten Ionen verantwortlich sind (Abbildung 4).

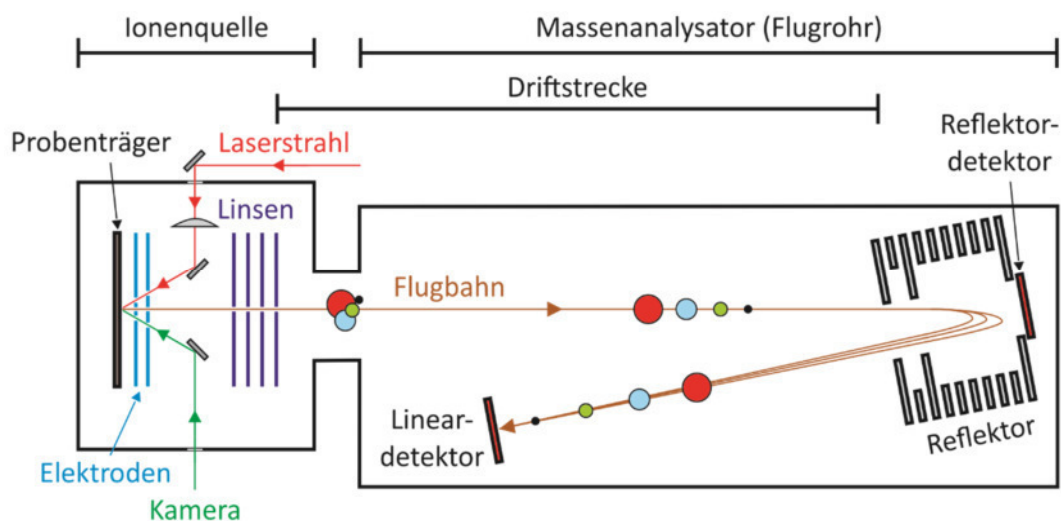


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (verändert nach [37]).

Entscheidend für das Funktionieren des MALDI-Verfahrens ist die verwendete Matrixsubstanz. Für unterschiedliche Klassen von Biomolekülen werden unterschiedliche Matrices benötigt. Gemeinsam ist allen Matrixsubstanzen, dass sie eine starke Absorption im UV-Bereich aufweisen und aus kleinen organischen (aromatischen) Molekülen bestehen (z. B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure, DHB). Mischt man Analyt- sowie Matrixmoleküle miteinander (die

Matrix liegt dabei in einem etwa 1000-fachen molaren Überschuss vor) und trägt die Mischung auf einen Probenträger auf, dann führt dies infolge der Verdunstung des Lösungsmittels zu einem als Co-Kristallisation bezeichneten Prozess. Dabei werden in das Gitter der Matrixkristalle auch Analytmoleküle eingebaut.

Nach Abschluss des Kristallisationsvorgangs wird der Probenträger über die Luftschleuse in das Hochvakuum der Ionenquelle transportiert, in der die Matrix-Analyt-Kristalle mit einem gepulsten Laserstrahl angeregt werden (Pulsdauer ca. 5 ns). Hierzu verwendet man vor allem Festkörperlaser (z. B. Nd:YAG), deren Emissionswellenlänge im UV-Bereich (z. B. 355 nm für Nd:YAG) liegt. Durch die starke Absorption der Matrixmoleküle im UV-Bereich nehmen die Kristalle einen großen Teil der eingestrahnten Laserenergie auf. Die Anregungsenergie, die von den Matrixmolekülen aufgenommen wird, relaxiert innerhalb sehr kurzer Zeit in das Kristallgitter und führt hier zu starken Störungen. Auf diesen Prozess folgt eine Phase, in welcher ein Teil der Kristalloberfläche explosionsartig verdampft. Dies führt schließlich zum Übergang der Matrix- und Analytmoleküle in die Gasphase [37].

Für die Entstehung der Molekül-Ionen sind verschiedene Prozesse verantwortlich. Teilweise liegen die Analyten bereits in der Probe als Ion vor und müssen daher lediglich desorbiert werden. Darüber hinaus kommt es in der sich nach der Anregung der Kristalle mit Laserlicht ausbildenden Matrixwolke zu Gasphasenreaktionen zwischen Matrixradikalen und Analytmolekülen, in deren Folge letztere ionisiert werden. Allen Prozessen ist jedoch gemeinsam, dass die Ionisierung durch Übertragung oder Abstraktion eines Protons erfolgt. Die bei der Übertragung eines oder mehrerer Protonen gebildeten protonierten Molekül-Ionen ($[M+nH]^{n+}$) sind positiv geladen, während die durch Abstraktion eines oder mehrerer Protonen erzeugten deprotonierten Molekül-Ionen ($[M-nH]^{n-}$) eine negative Ladung aufweisen [39].

Das Ausmaß der Protonierung eines Analytmoleküls hängt maßgeblich von seiner (Gasphasen-)Basizität ab. Besitzt ein Analyt viele basische Gruppen (z. B. Amino- oder Guanidino-Funktionen), so ist dessen Ionisierung in der Regel besonders ausgeprägt. Demnach wird die im MALDI-TOF-Massenspektrum beobachtete Intensität der Molekül-Ionen sowohl von ihrer Häufigkeit als auch durch ihre Basizität bestimmt. Aus diesem Grund sind aus der Signalintensität abgeleitete quantitative Aussagen für einen bestimmten Analyten ohne Verwendung eines internen Standards nur sehr eingeschränkt möglich.

Für die Auftrennung im sich an die Ionenquelle anschließenden Massenanalysator müssen die in der Matrixwolke verteilten Molekül-Ionen fokussiert und beschleunigt werden. Dazu wird zwischen Probenträger und den oberhalb angeordneten Elektroden eine Spannung im Bereich von 10 bis 30 Kilovolt angelegt und dadurch ein starkes elektrostatisches Feld erzeugt. Die kinetische Energie (E_{kin}) der Molekül-Ionen nach der Beschleunigung entspricht dabei der Energie, die sie aus dem elektrostatischen Feld aufgenommen haben (E_e). Der Zusammenhang zwischen kinetischer und elektrischer Energie ist in Gleichung 1 dargestellt, wobei m für die Masse des Molekül-Ions, v für dessen Geschwindigkeit, z für dessen

Einleitung

Ladungszahl, U für die Beschleunigungsspannung sowie e für die Elementarladung stehen [40]:

$$E_{el} = z \cdot e \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = E_{kin} \quad (1)$$

Neben der Beschleunigung erfolgt in der Ionenquelle auch eine Fokussierung der Molekül-Ionen, sodass alle zum gleichen Zeitpunkt die Ionenquelle verlassen und in den Massenanalysator übertreten. Darüber hinaus besitzen alle Molekül-Ionen nach Durchlaufen der Beschleunigungsstrecke die gleiche kinetische Energie.

Aus der Tatsache, dass sowohl Matrix- als auch Analytmoleküle ionisiert werden, ergibt sich ein Nachteil des MALDI-Verfahrens. Die Ionisierung der Matrixmoleküle führt in Abhängigkeit von der verwendeten Matrix im niedermolekularen Massenbereich (m/z 0-1000) des entsprechenden Massenspektrums zu sehr intensiven Matrixsignalen. Die Analyse von Analyten mit einer Masse von unter 1000 Da ist aufgrund der Überlagerung mit den Matrixsignalen nur mit großen Einschränkungen möglich.

In der MALDI-Massenspektrometrie werden vorrangig Flugzeitanalysatoren („*Time-of-Flight*“, TOF) für die Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis genutzt. Ein Flugzeitanalysator besteht grundsätzlich aus einer evakuierten Stahlröhre (dem sog. Flugrohr), in welchem sich eine feldfreie Driftstrecke von meist 1 m bis 4 m Länge befindet (Abbildung 4). Nachdem die Ionen die Driftstrecke des Massenanalysators erreicht haben, fliegen sie mit Geschwindigkeiten, die von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis abhängig sind: Ionen mit einem großen Masse-zu-Ladungsverhältnis fliegen langsamer als Ionen mit einem kleineren, weshalb letztere weniger Zeit benötigen um die Driftstrecke zu passieren. Innerhalb des feldfreien Raums erfolgt daher eine Auftrennung der Molekül-Ionen. Das Grundprinzip der Flugzeitanalysatoren gründet dabei auf einer sehr exakten Messung der Zeit, die die Molekül-Ionen benötigen, um die Driftstrecke zu passieren [37].

Da sowohl die Länge L der Driftstrecke als auch die Beschleunigungsspannung U bekannt sind, kann anhand von Gleichung 2 und unter Messung der unterschiedlichen Flugzeiten t , die die Ionen benötigt haben um die Driftstrecke zu durchfliegen, deren Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z bestimmt werden [40]:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2 \quad (2)$$

Flugzeitanalysatoren haben den Vorteil, dass sie einfach aufgebaut sind und trotzdem eine hohe Massenauflösung ermöglichen. Darüber hinaus ist diese Analysatorenart in der Lage, alle Ionen eines Ionisierungsereignisses simultan zu analysieren. Da der Laserpuls als zuverlässiger Startpunkt für die Bestimmung der Flugzeit dient, sind Flugzeitanalysatoren prädestiniert für die Verwendung in der MALDI-Massenspektrometrie.

Moderne MALDI-TOF-Massenspektrometer besitzen Flugzeitanalysatoren, die zwei unterschiedliche Messmodi – als Linear- und Reflektormodus bezeichnet – nutzen können.

Im Linearmodus durchfliegen die Molekül-Ionen die Driftstrecke auf dem Weg zum Detektor in einer geraden Linie. Die Massenauflösung im Linearmodus wird vor allem durch die Bedingungen bestimmt, unter denen die Molekül-Ionen in der Ionenquelle gebildet werden. Insbesondere die ungleiche initiale Verteilung der kinetischen Energie ist von Bedeutung. Diese ist dafür verantwortlich, dass Molekül-Ionen mit der gleichen Masse eine leicht unterschiedliche kinetische Energie besitzen. Die Molekül-Ionen erreichen daher zu geringfügig unterschiedlichen Zeitpunkten den Detektor, wodurch es zu einer Verbreiterung des Messsignals kommt. Aus diesem Grund besitzt der lineare Messmodus nur eine begrenzte Massenauflösung.

Um die Massenauflösung von Flugzeitanalysatoren zu erhöhen, wurde der sogenannte Reflektor entwickelt. Der Reflektor befindet sich am Ende der Driftstrecke vor dem Lineardetektor und erzeugt ein elektrisches Feld, das die gleiche Polarität besitzt wie das in der Ionenquelle. Dringen Ionen in dieses Feld ein, so werden sie solange abgebremst, bis ihre kinetische Energie Null beträgt. Dann erfolgen eine Richtungsumkehr und die Wiederbeschleunigung, weshalb der Reflektor umgangssprachlich auch als Ionenspiegel bezeichnet wird. Wie bereits erwähnt, besitzen Ionen der gleichen Masse nach der Beschleunigung eine leicht unterschiedliche kinetische Energie. Die Ionen mit einer geringfügig höheren kinetischen Energie dringen tiefer in das elektrische Feld des Reflektors ein und legen daher eine längere Strecke zurück als Ionen mit einer niedrigeren kinetischen Energie. Die Unterschiede in der initialen Verteilung der kinetischen Energie von Ionen mit gleicher Masse können ausgeglichen werden, wenn man einen weiteren Detektor gegenüber dem Lineardetektor positioniert. Befindet sich der Reflektordetektor im Fokuspunkt des Reflektors, so werden Ionen mit gleicher Masse zur gleichen Zeit detektiert. Im Ergebnis korrigiert der Reflektor die ungleiche Verteilung der initialen kinetischen Energie der Ionen. Dies führt letztendlich zu einer deutlichen Erhöhung der Massenauflösung [40; 41].

Der dritte Abschnitt des Massenspektrometers ist der Detektor. Im Falle eines Flugzeitanalysators befindet sich der Detektor am Ende der Driftstrecke und besteht aus einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). Trifft ein Ion auf die mit einem halbleitenden Material beschichtete Oberfläche des SEV, so setzt es mehrere Sekundärelektronen frei, welche im nächsten Schritt wiederum eine Vielzahl an weiteren Sekundärelektronen erzeugen. Dies führt zu einer deutlichen Verstärkung des Signals, was auch als „*Avalanche*“-Effekt bezeichnet wird. Letztendlich werden die Sekundärelektronen detektiert und das Signal in eine elektrische Spannung umgewandelt [42].

Ein MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer ist in der Lage, gezielt Molekül-Ionen auszuwählen und diese zu fragmentieren. Die Bezeichnung TOF/TOF leitet sich dabei aus dem Aufbau des Massenspektrometers ab. Klassische TOF/TOF-Geräte bestehen aus einer Ionenquelle mit zwei linear angeordneten Flugrohren (deshalb TOF/TOF), zwischen denen sich

eine Kollisionszelle sowie eine weitere Beschleunigungsstrecke (ähnlich der in der Ionenquelle) befindet. Im ersten Flugrohr erfolgt die Auftrennung der in der Quelle erzeugten Molekül-Ionen. Ein sich anschließender Massenfilter ermöglicht die gezielte Auswahl und Isolierung eines bestimmten Molekül-Ions (sog. Vorläufer-Ion), welches in der Kollisionszelle durch „*Collision-induced Dissociation*“ (CID) fragmentiert. Dazu wird die Zelle mit inerten Gasatomen (z. B. Argon) gefüllt, wodurch Kollisionen zwischen Gasatomen und dem ausgewählten Vorläufer-Ion provoziert werden und in deren Folge das Vorläufer-Ion fragmentiert. Die zweite Beschleunigungsstrecke ermöglicht die Beschleunigung der erzeugten Fragment-Ionen, damit diese im zweiten Flugrohr nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetrennt und schließlich am Detektor nachgewiesen werden können. Als Ergebnis wird ein Fragmentspektrum (MS/MS-Spektrum) des Vorläufer-Ions erhalten.

Alternativ kann auch die spontane Dissoziation der Molekül-Ionen innerhalb der Driftstrecke des Flugrohres ausgenutzt werden – ein Prozess, der als metastabiler Zerfall bezeichnet wird und zu dessen Induktion keine Kollisionszelle notwendig ist. Da der Zerfall nach der Ionenquelle stattfindet, wird der Prozess auch als „*Post-source Decay*“ (PSD) bezeichnet.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer ermöglichte die gezielte Fragmentierung von Molekül-Ionen sowohl mittels CID als auch PSD [43].

1.3.2.2 Quantifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für die klinische Validierung eines Biomarkers ist es im Allgemeinen notwendig, dessen absolute Konzentration in der entsprechenden biologischen Matrix zu bestimmen. Dies gilt auch für CAAP48, weshalb sich die nachfolgenden Ausführungen auf Aspekte der absoluten Quantifizierung von Biomolekülen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie konzentrieren.

Die größten Vorteile der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sind ihre Schnelligkeit, die Einfachheit der Durchführung einer Messung sowie deren gute Empfindlichkeit. Aktuell erhältliche MALDI-TOF-Systeme erlauben mehrere tausend Analysen innerhalb einer Stunde, wodurch die Kosten je Probe deutlich sinken. Allerdings ist die Online-Kopplung mit einer Flüssigkeitschromatographie aufgrund des diskontinuierlich arbeitenden MALDI-Prozesses nicht möglich. Alternativ kann eine Offline-Kopplung genutzt werden, aber diese würde den Zeitvorteil gegenüber LC-MS/MS-basierten Verfahren (siehe Abschnitt 1.3.3) zunichtemachen. Daher ist die Quantifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie unter Erhalt des Zeitvorteils nur durch Verzicht auf eine vorherige Auftrennung der Probe mittels Flüssigkeitschromatographie möglich. Insbesondere bei komplexen biologischen Matrices steigert die Flüssigkeitschromatographie jedoch erheblich die Empfindlichkeit und Selektivität für den Analyten, weshalb MALDI-TOF-basierte Verfahren ohne ausgreifende Probenvorbereitung (z. B. Immunopräzipitation des Analyten) oftmals nicht für die Quantifizierung von Biomolekülen aus komplexen Matrices einsetzbar sind.

Die Quantifizierung eines Biomoleküls mittels MALDI-TOF beruht in der Regel auf der Intensität oder Fläche des Massensignals des intakten Molekül-Ions in einem Spektrum, welches einen großen Massenbereich abdeckt. Infolge der ohne zusätzlichen Zeitaufwand möglichen Aufnahme eines vollständigen Spektrums, kann eine große Anzahl verschiedener Verbindungen parallel nachgewiesen und Informationen über deren molekularen Zustand erzeugt werden, so z.B. über Salz-Addukte, artifizielle Modifikationen einzelner Aminosäuren (Deamidierung, Oxidation, etc.) oder Abbauprozesse. Allerdings ist die Quantifizierung auf Basis des Massensignals für das intakte Molekül-Ion des Analyten durch die mögliche Überlagerung mit den Signalen interferierender Verbindungen wenig selektiv. Zweckmäßiger ist die Nutzung von Fragment-Ionen, die spezifisch für den Analyten sind. Entsprechende „*Multiple Reaction Monitoring*“-Methoden (siehe Abschnitt 1.3.3.1) für MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer haben aber bisher nur eine geringe Verbreitung gefunden. Außerdem ist die Analysengeschwindigkeit im MS/MS-Modus bei den meisten MALDI-TOF/TOF-Systemen deutlich geringer als im MS-Modus.

Quantitative Analysen mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sind darüber hinaus mit Einschränkungen verbunden. Hierzu zählt insbesondere die hohe Variabilität der Signalintensität, ausgelöst durch die inhomogene Matrixpräparation und den damit verbundenen „*Sweet*“-Spots. Letzteren umfassen räumlich eng begrenzte Bereiche, in denen die lokale Analyt-Konzentration besonders hoch ist und die folglich punktuell sehr intensive Signale verursachen. Dies führt zu einer hohen Schuss-zu-Schuss- und Probenspot-zu-Probenspot-Variabilität, wobei letzteres oftmals nur durch Vergleich der Massenspektren einer mehrfach auf den Probenträger aufgetragenen Probe deutlich wird. Um die Inhomogenität der Matrixpräparation auszugleichen, müssen möglichst viele Einzelspektren von verschiedenen Positionen eines Probenspots aufgenommen werden, was routinemäßig bereits automatisch erfolgt. Um jedoch die Spot-zu-Spot-Variabilität ausgleichen zu können, sollte jede Probe mehrfach aufgetragen und analysiert werden, was jedoch die Analysenzeiten deutlich erhöht.

Die zweite wichtige Einschränkung ist die vor allem bei komplexen Probenmatrixen zu beobachtende Ionenunterdrückung, welche sich aus der unterschiedlichen Ionisierungseffizienz der Probenbestandteile ableitet [44]. Die Ionisierungseffizienz einer Verbindung ist vor allem von deren (Gasphasen-)Basizität abhängig. Insbesondere das Vorhandensein basischer Funktionen in einer Verbindung erhöht deren Basizität, wodurch sie eine hohe Affinität für die Aufnahme eines Protons besitzen und entsprechend effizient ionisieren. In diesem Prozess der Übertragung der verfügbaren Ladungen kann eine besonders effizient ionisierbare Verbindung zur teilweisen oder vollständigen Unterdrückung der Ionisierung von Verbindungen mit einer niedrigen Basizität führen. Beispielsweise können selbst strukturell sehr ähnliche Peptide durch Unterschiede in ihrer Basizität deutlich divergierende Ionisierungseigenschaften aufweisen. Beim tryptischen Verdau eines Proteins werden proteolytische Peptide erzeugt, die an ihrem C-Terminus entweder einen Lysin- oder

einen Arginin-Rest besitzen. Bei der Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann beobachtet werden, dass die Massensignale für proteolytischen Peptide mit einem Arginin-Rest am C-Terminus eine deutlich höhere Intensität (bis zu 13-fach) aufweisen [45]. Dies kann vor allem mit der hohen Basizität der Guanidino-Funktion von Arginin erklärt werden, was zur bevorzugten Ionisierung und damit zu hohen Signalintensitäten des entsprechenden Peptids führt. Um diesen Effekt auszunutzen, gibt es Protokolle zur Umwandlung der ϵ -Amino-Funktion von Lysin in ein Homoarginin [46].

Neben der Basizität wirken sich auch die Konformation und Hydrophobizität des Analyten indirekt auf die Ionisierungseffizienz aus, indem sie den Einbau des Analyten in den Matrixkristall beeinflussen. Darüber hinaus steigt mit der Komplexität des Analyten auch die Wahrscheinlichkeit für eine Ionenunterdrückung [44].

Die genannten Faktoren wirken sich zwar nur begrenzt auf das qualitative Ergebnis der Analysen aus, sie führen aber dazu, dass die Signalintensität in einem MALDI-TOF-Massenspektrum nicht nur von der Analyt-Konzentration, sondern in hohem Maße von Probenpräparation und Ionenunterdrückung beeinflusst wird. Aus diesen Gründen ist die Verwendung eines internen Standards für quantitative Analysen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie alternativlos. Dessen physikochemische Eigenschaften sollten denen des Analyten möglichst ähnlich sein. Dies gilt insbesondere für Parameter wie Masse, Ladungszustand sowie Hydrophobizität. Nur so kann gewährleistet werden, dass sich Analyt und interner Standard während aller Schritte der Probenaufarbeitung gleich verhalten. Für peptidogene Analyten und die zugehörigen internen Standards ist des Weiteren von Bedeutung, dass die Neigung zur Ausbildung artifizieller Modifikationen möglichst gering ausgeprägt ist. Bei der Nutzung von Fragmentspektren sollte der interne Standard darüber hinaus ein dem Analyten ähnliches Fragmentierungsverhalten aufweisen. Die aufgeführten Kriterien werden in besonderem Maße durch Isotopen-markierte Standards erfüllt [47].

Auf Basis der vorhergehenden Ausführungen kann das grundsätzliche Vorgehen zur absoluten Quantifizierung eines Biomoleküls mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie skizziert werden. Bevor erste Schritte zur Probenaufarbeitung ausgeführt werden, erfolgt die Zugabe eines idealerweise Isotopen-markierten Standards in definierter Konzentration zu einem definierten Volumen der Probe. Im Anschluss werden Probenaufarbeitung und -analyse durchgeführt. Durch den Vergleich der Signalintensität von Analyt und internem Standard in dem final aufgenommenen MALDI-TOF-Massenspektrum kann die Konzentration des Analyten berechnet werden. Hierfür wird jedoch eine Kalibrierfunktion benötigt. Um diese zu bestimmen wird eine Konzentration des internen Standards mit verschiedenen Konzentrationen des (synthetischen) Analyten gemischt, sodass Proben mit definierten Konzentrationsverhältnissen entstehen. Die Analyse dieser Proben ermöglicht den Abgleich der Konzentrations- mit den entsprechenden Signalintensitätsverhältnissen. Trägt man die Werte der beiden Verhältnisse gegeneinander auf und führt eine Regressionsanalyse durch, erhält man die Kalibrierfunktion. Bei der Regressionsanalyse muss jedoch beachtet werden,

dass der Zusammenhang zwischen Signalintensitäts- und Konzentrationsverhältnissen von Analyt und internem Standard in der MALDI-Massenspektrometrie nicht zwangsläufig linear ist. So konnten Szajli *et al.* nachweisen, dass die Linearität einer auf MALDI-TOF-basierenden Quantifizierungsmethode häufig nur das fünffache der Konzentrationsdifferenz von Analyt und internem Standard umfasst [48]. Vermutlich wird die Größe des linearen Bereiches von der Art und Anzahl der in dem untersuchten Peptid vorhandenen funktionellen Gruppen sowie von dessen Größe beeinflusst. So verwendeten Szajli *et al.* für ihre Untersuchungen nur Peptide mit einer Molekularmasse bis maximal 2 kDa. Bei größeren Peptiden dürfte der lineare Bereich der Quantifizierungsmethode vermutlich noch kleiner sein.

1.3.3 HPLC-ESI-Tripelquadrupol-Massenspektrometrie

Die Kombination von Flüssigkeitschromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) wird kurz als LC-MS bzw. LC-MS/MS bezeichnet, wobei letzteres auf die Nutzung eines massenspektrometrischen Fragmentierungsverfahrens (MS/MS) verweist. Häufig ist es zweckmäßig, die Bezeichnung noch um die Art der Ionisation (z. B. Elektrospray-Ionisation, ESI) und der Flüssigkeitschromatographie (z. B. „*High Performance Liquid Chromatography*“, HPLC) zu erweitern. Demnach wurde in der vorliegenden Arbeit ein HPLC-ESI-MS/MS-System verwendet, dessen instrumentelle Grundlagen im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.3.3.1 Instrumentelle Grundlagen

Das Grundprinzip einer HPLC-ESI-MS/MS-Analyse besteht in der Kopplung von zwei nacheinander ablaufenden Trenntechniken, wobei die erste Auftrennung der zu analysierenden Probe mit Hilfe eines HPLC-Systems erfolgt. Der dabei erzeugte Flüssigkeitsstrom wird kontinuierlich zur Ionenquelle des Massenspektrometers befördert, wo die enthaltenen Probenbestandteile mittels ESI ionisiert werden. Im Anschluss erfolgt der Transfer der Ionen in das Hochvakuum des Massenspektrometers, wo sie mit Hilfe von elektrischen Feldern beschleunigt und nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetrennt werden. Als Detektor fungiert ein Sekundärelektronenvervielfacher (siehe Abschnitt 1.3.2.1), welcher die eintreffenden Ionen nachweist und die entsprechende Information in Form eines elektrischen Signals an das Computersystem weiterleitet.

Die direkte Kopplung zweier Trenntechniken hat entscheidende Vorteile. Zum einen ist es durch die Auftrennung der Probe vor der massenspektrometrischen Analyse möglich, Störsubstanzen (z. B. Salze, Puffer) abzutrennen. Zum anderen wird die Komplexität der Probe deutlich verringert. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass nicht alle Probenbestandteile gleichzeitig die Ionenquelle erreichen, sondern in Abhängigkeit von ihren jeweiligen physikochemischen Eigenschaften zu unterschiedlichen Zeitpunkten der HPLC-Analyse. Letztendlich ergibt sich hieraus eine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit sowie durch die Abwesenheit von Störsubstanzen meist auch eine qualitative Verbesserung der Analyseergebnisse. Auf diese Weise können auch Proben mit sehr komplexen Matrices (z. B.

Einleitung

Blutplasmaproben) analysiert und viele verschiedene Analyten in einem Lauf quantifiziert werden.

Die Grundlagen der Probenauftrennung mittels HPLC, der Ionisation der Probenbestandteile anhand von ESI sowie der massenspektrometrischen Analyse mit Hilfe eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers werden nachfolgend Schritt für Schritt beschrieben.

Bei der am häufigsten eingesetzten Art der Flüssigkeitschromatographie handelt es sich um die „*Reversed-phase*“-HPLC (RP-HPLC). Wie bei allen flüssigkeitschromatographischen Verfahren erfolgt auch bei RP-HPLC-Analysen die Auftrennung der Probenkomponenten an der Grenzfläche zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Die stationäre Phase besteht meist aus Kieselgel- oder Polymerpartikeln (z. B. Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer), auf deren Oberfläche sich funktionelle Gruppen befinden. Dabei handelt es sich beispielsweise um kovalent gebundene Alkylketten unterschiedlicher Länge, die eine hydrophobe Oberfläche ausbilden (z. B. *n*-Oktadecyl, C₁₈). Als mobile Phase werden Mischungen aus Wasser und einem flüchtigen organischen Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril verwendet. Die Probenkomponenten sind zu Beginn des HPLC-Laufs in der mobilen Phase gelöst und werden entlang der stationären Phase transportiert. Dabei interagieren die Probenkomponenten mit der stationären Phase. Es gibt verschiedene Modelle, um den Vorgang der Interaktion zu beschreiben. Beim Adsorptionsmodell konkurrieren die gelösten Probenkomponenten und die mobile Phase um Bindestellen an der Oberfläche der stationären Phase. Demnach ist die Retention abhängig von der Stärke der Interaktion zwischen den Probenkomponenten und den hydrophoben Gruppen auf der stationären Phase. Eine Einzelkomponente bleibt solange gebunden, bis sie durch eine ausreichend hohe Konzentration des organischen Lösungsmittels von der stationären Phase verdrängt wird. Dazu wird das Verhältnis von Wasser zu organischem Lösungsmittel kontinuierlich verändert. Zu Beginn des Laufs ist der Anteil des organischen Lösungsmittels niedrig (typischerweise 5 % bis 15 %), während er am Ende hoch ist (>85 %). Das Prinzip der schrittweisen Erhöhung des organischen Anteils der mobilen Phase wird als Gradientenelution bezeichnet. Hierbei nimmt die Elutionsstärke der mobilen Phase über die Zeit zu [49].

Während der HPLC-Analyse wird die mobile Phase kontinuierlich zur Ionenquelle des Massenspektrometers befördert. Gleichzeitig werden die aufgetrennten Probenkomponenten unter Atmosphärendruck in der Ionenquelle mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation (ESI) aus der Flüssig- in die Gasphase überführt und ionisiert (Abbildung 5).

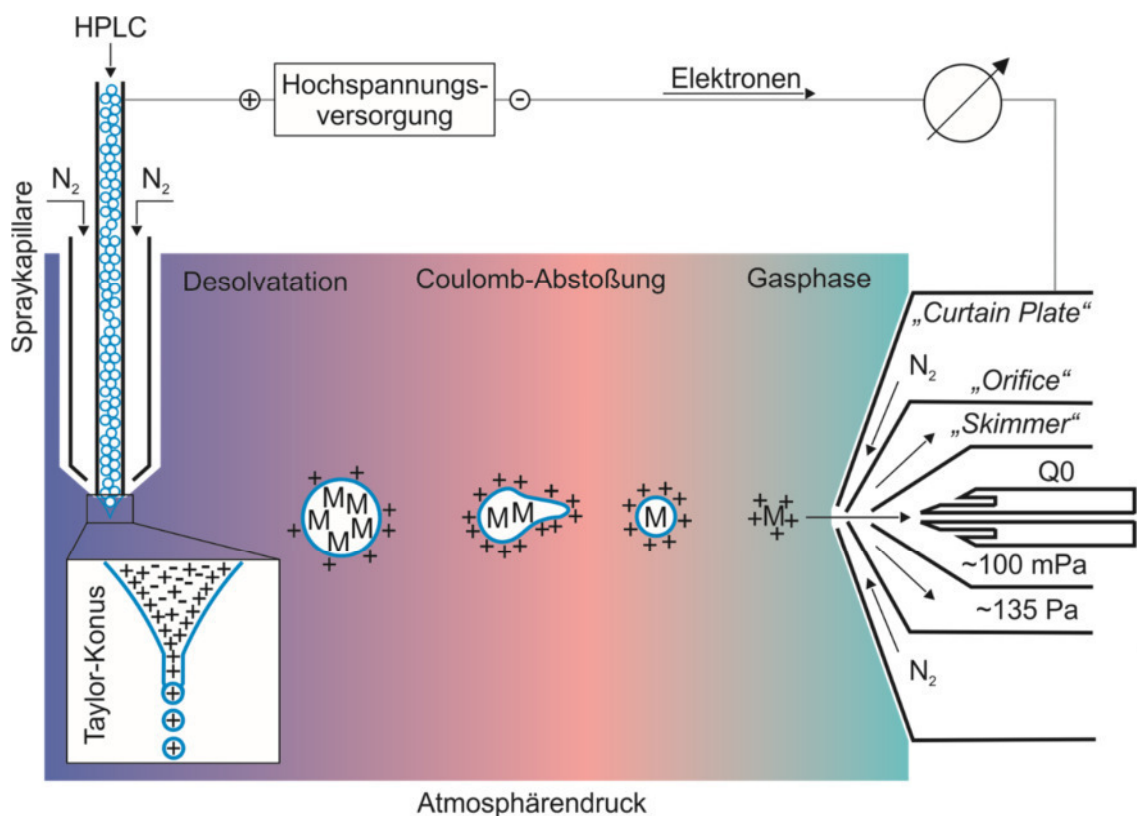


Abbildung 5: Modellhafte Darstellung der Elektrospray-Ionisation im positiven Ionenmodus (verändert nach [50]).

Die Elektrospray-Ionisation beruht auf dem Versprühen der mobilen Phase in der Ionenquelle mit Hilfe einer Spraykapillare. An diese wird eine hohe Spannung (2-4 kV) angelegt, wodurch die austretende Flüssigkeit einem starken elektrischen Feld ausgesetzt ist. Die dadurch verursachte Auftrennung der Ladungen führt zur Ausbildung eines Konus („Taylor-Konus“), der an seiner Spitze in einen sehr feinen Flüssigkeitsstrom übergeht. Dieser wird mit zunehmendem Abstand von der Spraykapillare instabil und setzt daher schließlich kontinuierlich hochgeladene Tröpfchen (Durchmesser von wenigen Mikrometern) der mobilen Phase frei. Als Gegenelektrode der Spraykapillare fungiert die „Curtain Plate“ am Eingang des Massenspektrometers. Bei dieser handelt es sich um eine Konus-förmige Elektrode mit einer Öffnung an der Spitze, durch die Ionen in das Hochvakuum des Massenspektrometers gelangen. Um diese Ionen zu erzeugen, müssen die Probenkomponenten aus den hochgeladenen Tröpfchen freigesetzt werden. Dazu ist es notwendig, dass Lösungsmittel der gebildeten hochgeladenen Tröpfchen zu verdampfen. Die hierfür notwendige Energie liefert ein heißer Stickstoffstrom (sog. Trockengas). Durch das Verdampfen des Lösungsmittels verringert sich kontinuierlich die Größe der Tröpfchen, wodurch sich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung Ionen an der Oberfläche sammeln. In der Folge nimmt die Ladungsdichte zu. Nähert sich die Stärke der Abstoßung der Ladungen der Größe der Oberflächenspannung an, erfolgt der Zerfall des Tröpfchens. Die entsprechende

Einleitung

Grenze wird als Rayleigh-Limit bezeichnet. Der Zerfall erfolgt mehrfach, wobei die freigesetzten Tröpfchen nicht nur fortwährend kleiner werden, sondern auch eine immer höhere Ladungsdichte aufweisen. Am Ende entstehen Tröpfchen, die nur noch ein Ion enthalten. Das Verdampfen der verbliebenen Lösungsmittelmoleküle führt dann zur Überführung des Ions in die Gasphase [39; 51; 52].

Der große Vorteil der Elektrospray-Ionisation besteht in der Möglichkeit, Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie direkt miteinander koppeln zu können. Darüber hinaus ist ESI das sanfteste Verfahren, um Ionen zu erzeugen. Es eignet sich daher auch für die Analyse von großen, thermisch labilen Analyten wie z. B. Proteinen. Ein weiterer Vorteil der Elektrospray-Ionisation besteht darin, die Ionisierung auch von strukturell deutlich unterschiedlichen Verbindungen mit ähnlicher Effizienz zu gewährleisten [44]. Daher können bereits aus der Intensitätsverteilung der im Massenspektrum beobachteten Signale Informationen über die relative Häufigkeit der entsprechenden Verbindungen erhalten werden.

Im Anschluss an die Ionisierung der Probenkomponenten mittels ESI erfolgt deren Auftrennung nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis im Massenspektrometer. Der grundsätzliche Aufbau sowie die Funktionsweise eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers werden nachfolgend beschrieben (Abbildung 6).

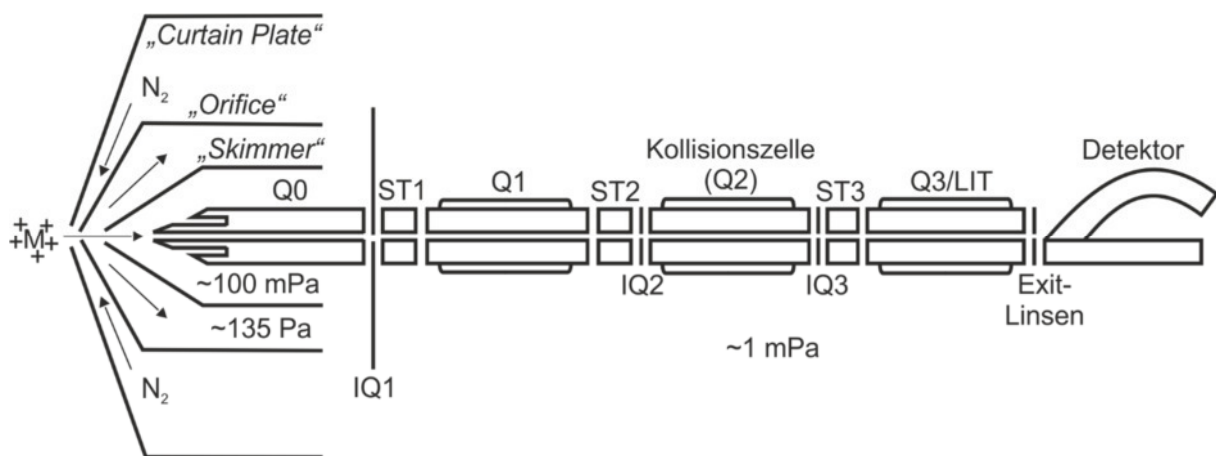


Abbildung 6: Grundsätzlicher Aufbau eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers (verändert nach [53]).

Der Eingang eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers wird durch ein Blendensystem gebildet, zu dem die „Curtain Plate“, das „Orifice“ sowie der „Skimmer“ gehören. Zwischen „Curtain Plate“ und „Orifice“ ist ein der Flugbahn der Ionen in der Ionenquelle entgegengesetzt gerichteter Stickstoffstrom angelegt. Er verhindert, dass Raumluft, Lösungsmitteltropfen sowie nicht ionisierte Neutralteilchen und Matrixbestandteile das Hochvakuum des Massenspektrometers erreichen [54]. Das Blendensystem hat darüber hinaus die Aufgabe, den Bereich des Atmosphärendrucks in der Ionenquelle und den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers voneinander zu trennen. Ziel ist der Transfer

von Ionen aus der Ionenquelle in das Massenspektrometer, während z. B. Lösungsmittel und Raumluft zurückgehalten werden. Dazu gibt es zwei hintereinander angeordnete Bereiche mit unterschiedlichem Druck: zwischen „*Orifice*“ und „*Skimmer*“ herrschen etwa 135 Pa und nach dem „*Skimmer*“ etwa 100 mPa.

Die Funktionsweise eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers beruht auf mehreren linear angeordneten Quadrupolen. Ein Quadrupol ist ein Massenanalysator, der aus vier zylindrischen Elektroden besteht. Die Elektroden sind parallel zum Ionenpfad angeordnet und umgeben diesen. An die Elektroden wird sowohl ein Gleichstrom als auch ein hochfrequenter Wechselstrom angelegt, wobei diagonal gegenüberliegende Elektroden immer die gleiche Polarität besitzen, während senkrecht und waagrecht benachbarte eine unterschiedliche Polarität aufweisen. Durch das Anlegen der Wechselspannung ändert sich die Polarität in geringen zeitlichen Abständen, weshalb Ionen, die in diesen Bereich einfliegen, von den einzelnen Elektroden abwechselnd angezogen und abgestoßen werden. Dadurch bewegen sich die Ionen auf einer schraubenförmigen Flugbahn. Bei einer gegebenen Spannung weisen nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis eine stabile Flugbahn auf. Nur diese können den Quadrupol durchfliegen. Ionen mit einem anderen Masse-zu-Ladungsverhältnis werden während ihres Fluges so stark ausgelenkt, dass sie entweder auf die Quadrupol-Stäbe auftreffen oder durch diese hindurchfliegen und schließlich durch die Vakuumpumpe abgesaugt werden. Ein Quadrupol funktioniert demnach als „*Massenfilter*“, der Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis hochselektiv auswählt und alle anderen Ionen sehr effizient von der weiteren Analyse ausschließen kann. Da zu einem bestimmten Zeitpunkt nur Ionen mit einem einzigen Masse-zu-Ladungs-Verhältnis detektiert werden können, müssen zur Aufnahme eines Massenspektrums die angelegten Spannungen kontinuierlich verändert und damit ein zuvor festgelegter Massenbereich schrittweise gescannt werden. Wird während des Scans bei einer bestimmten Spannung ein Signal beobachtet, kann auf das Vorhandensein von Ionen mit dem entsprechenden Masse-zu-Ladungsverhältnis geschlossen werden [39; 53].

Allerdings ist es auch möglich den Quadrupol so einzustellen, dass alle eintreffenden Ionen hindurchfliegen können. Zu diesem Zweck wird nur eine hochfrequente Wechselspannung angelegt, während auf die Gleichspannung verzichtet wird. Auf diese Weise kann der Quadrupol zur Fokussierung und zum Transfer von Ionen mit verschiedenen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen innerhalb eines Massenspektrometers eingesetzt werden.

Ein Tripelquadrupol-Massenspektrometer besitzt insgesamt vier linear angeordnete Quadrupole (Abbildung 6). Der Q0-Quadrupol dient der Fokussierung der Ionen nach der Ionenquelle. Die Quadrupole Q1 und Q3 werden als „*Massenfilter*“ genutzt, während der Q2 als Kollisionszelle fungiert. In diesem können mittels CID gezielt Ionen fragmentiert werden. Zwischen den einzelnen Quadrupolen befinden sich Linsen („*Interquad Lenses*“, IQ1-3) sowie kurze Quadrupole („*Stubbies*“, ST1-3). Erstere dienen vor allem der Fokussierung während

letztere die Ionen innerhalb des Massenspektrometers von einem Bereich zum nächsten überführen [53].

Bei einem hybriden Tripelquadrupol/LIT-System kann der Q3 darüber hinaus sowohl als Quadrupol als auch als lineare Ionenfalle („*Linear Ion Trap*“, LIT) genutzt werden. Dazu befinden sich an den beiden Enden des Q3 Linsen, die als Endkappen fungieren können. Wird an die Endkappen nach dem Eintreten von Ionen in den Q3 eine Gleichspannung angelegt, so können diese den Quadrupol in axialer Richtung nicht mehr verlassen. Darüber hinaus ist die Bewegung der Ionen durch eine am Q3 angelegte hochfrequente Wechselfspannung auch in radialer Richtung begrenzt. In der Folge können Ionen mit einem unterschiedlichen Masse-zu-Ladungsverhältnis im Q3 gespeichert werden. Für die Analyse der gespeicherten Ionen wird die an den Q3 angelegte Wechselfspannung kontinuierlich verändert, wodurch die Ionen (geordnet nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis) schrittweise in axialer Richtung den Q3 verlassen und zum Detektor gelangen. Ein großer Vorteil der linearen Ionenfalle besteht darin, dass die gespeicherten Ionen gezielt fragmentiert und die entstandenen Fragment-Ionen unmittelbar im Anschluss analysiert werden können [53].

Durch die Kombination mehrerer Quadrupole ermöglicht ein Tripelquadrupol-Massenspektrometer verschiedenste Messmodi. Anhand eines Q1- und Q3-Scans können Massenspektren von intakten Molekül-Ionen aufgenommen werden. Dazu wird der Massenbereich entweder mit Hilfe des Q1 oder des Q3 gescannt. Während eines Q1-Scans dienen der Q2 und Q3 nur dem Transport der Ionen zum Detektor. Bei einem Q3-Scan gilt dies analog für den Q1 und Q2. Ein Produkt-Ionen- bzw. MS/MS-Scan ermöglicht den Nachweis der für ein Molekül- bzw. Vorläufer-Ion spezifischen Fragmente. Dazu wird im Q1 ein Vorläufer-Ion ausgewählt und in der Kollisionszelle fragmentiert. Die Analyse der entstandenen Fragment-Ionen erfolgt mit Hilfe eines Q3-Scans. Eine Erweiterung des MS/MS-Scans stellt der MS³-Scan (auch MS/MS/MS) dar, für den eine lineare Ionenfalle benötigt wird. Der MS³-Scan ermöglicht die weitere Fragmentierung eines in der Kollisionszelle erzeugten Fragment-Ions. Dazu werden die aus einem bestimmten Vorläufer-Ion in der Kollisionszelle erzeugten Fragment-Ionen zunächst in die lineare Ionenfalle überführt und dort gespeichert. Im Anschluss erfolgt die Auswahl eines bestimmten Fragment-Ions, welches daraufhin selektiv fragmentiert wird. Anhand der entstandenen Fragment-Ionen können weitere Informationen über die Struktur des Vorläufer-Ions erhalten werden. Ein weiterer Messmodus wird als „*Multiple Reaction Monitoring*“ (MRM) bezeichnet und ist für die Tripelquadrupol-basierte Quantifizierung von Verbindungen aus verschiedensten Substanzklassen von entscheidender Bedeutung. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Quantifizierung mittels MRM-Analyse daher eingehend beschrieben.

1.3.3.2 Quantifizierung mittels HPLC-ESI-Tripelquadrupol-Massenspektrometrie

Für die absolute Quantifizierung von Biomolekülen (z. B. Peptide) in biologischen Matrices mit Hilfe eines HPLC-ESI-Tripelquadrupol-Systems wird meist eine MRM-Analyse durchgeführt, deren Grundprinzip in Abbildung 7 dargestellt ist.

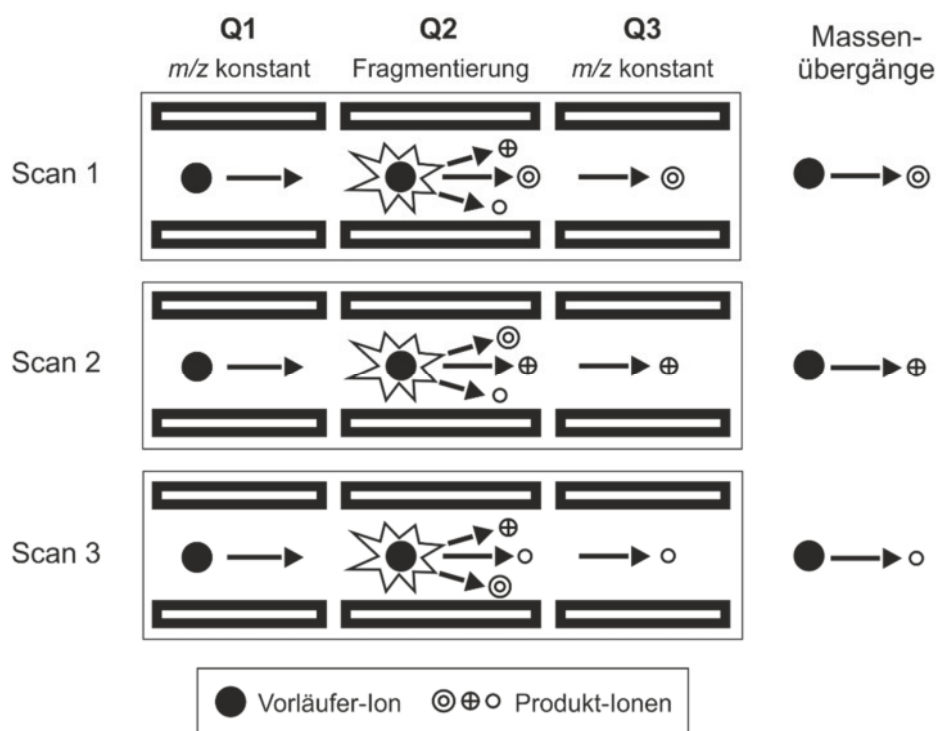


Abbildung 7: Schematische Darstellung der MRM-Analyse eines Vorläufer-Ions.

Bei einer MRM-Analyse handelt es sich um eine Form des MS/MS-Scans. Zunächst erfolgt im Q1 die Auswahl eines Vorläufer-Ions, welches daraufhin in der Kollisionszelle fragmentiert wird. Die entstandenen Fragment-Ionen werden dann in den Q3 überführt. Dieser wählt ein bestimmtes Fragment aus, während alle anderen ausgeblendet werden. Nur dieses Fragment erreicht den Detektor und wird letztendlich nachgewiesen. Ein Paar aus Vorläufer-Ion und einem daraus erzeugten Fragment-Ion wird als Massen- bzw. MRM-Übergang bezeichnet. Innerhalb einer MRM-Analyse werden mehrere MRM-Übergänge eines einzelnen oder verschiedener Vorläufer-Ionen untersucht.

MRM-Übergänge sind insbesondere für größere Biomoleküle wie Peptide hochspezifisch, da sie über die Fragment-Ionen direkt mit der entsprechenden molekularen Struktur verbunden sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine zweite Verbindung in der Probe den gleichen Massenübergang aufweist, ist daher zumeist gering. Darüber hinaus ermöglichen MRM-Analysen die Quantifizierung des oder der Analyten mit sehr hoher Empfindlichkeit. Dies beruht darauf, dass nur Verbindungen analysiert werden, die im Voraus ausgewählt wurden. Alle anderen in der Probe enthaltenen Verbindungen werden hingegen bereits im Q1 ausgeblendet und beeinflussen die Analyse folglich nicht [55].

Für die Quantifizierung mittels MRM-Analyse werden routinemäßig mindestens zwei MRM-Übergänge pro Verbindung analysiert. Der „*Quantifier*“ wird für die eigentliche Quantifizierung genutzt, wobei es sich meist um einen besonders intensiven MRM-Übergang handelt. Durch Verwendung eines zweiten für die zu quantifizierende Verbindung charakteristischen Massenübergangs kann die Spezifität der Analyse weiter erhöht werden. Der entsprechende Massenübergang wird als „*Qualifier*“ bezeichnet. Meist wird für den „*Qualifier*“ MRM-Übergang ein besonders großes Fragment ausgewählt.

Für die absolute Quantifizierung einer Verbindung mittels MRM-Analyse wird in der Regel ein interner Standard eingesetzt, da mit dessen Hilfe z. B. der Einfluss der Probenvorbereitung sowie Schwankungen der Geräteleistung ausgeglichen werden können. Eine entsprechende MRM-Methode enthält dann sowohl die „*Quantifier*“ und „*Qualifier*“ MRM-Übergänge des Analyten als auch des internen Standards. Die Quantifizierung unter Einsatz eines internen Standards beruht auf der „*Area Ratio*“. Deren Berechnung erfolgt, indem die Signalfläche des „*Quantifier*“ MRM-Übergangs des Analyten durch die Signalfläche des „*Quantifier*“ MRM-Übergangs des internen Standards dividiert wird. Die für den Analyten bestimmte Signalfläche wird auf diese Weise auf die Signalfläche des internen Standards normalisiert, dessen Konzentration in allen Proben gleich ist.

Um aus der „*Area Ratio*“ die Konzentration des Analyten in einer Probe berechnen zu können, ist eine Kalibriergerade notwendig. Diese wird erstellt, indem verschiedene Konzentrationen des (synthetischen) Analyten mit dem internen Standard gemischt und anschließend analysiert werden. Anhand der für jeden Kalibranten bestimmten „*Area Ratio*“ ist es möglich, eine Kalibriergerade bzw. -funktion zu erzeugen. Mit Hilfe der Kalibrierfunktion kann schließlich die Analyt-Konzentration berechnet werden.

2 Zielstellung

Um eine Sepsis frühzeitig zu diagnostizieren und damit schweren Krankheitsverläufen durch geeignete Therapien begegnen zu können, sind sensitive und spezifische Biomarker notwendig. Bisher gibt es mit Procalcitonin jedoch nur einen in der klinischen Routine eingesetzten Biomarker, der außerdem keine frühzeitige Diagnose der Sepsis sowie deren Unterscheidung von einer nicht-infektiösen SIRS ermöglicht. Um eine frühzeitige Diagnose zu ermöglichen besteht daher eine große Notwendigkeit, entsprechend geeignete Biomarker zu identifizieren und zu validieren.

Ein vielversprechender Kandidat für einen neuen Biomarker für Sepsis stellt CAAP48 dar. Um die Eignung von CAAP48 für die Diagnose der Sepsis umfassend einschätzen zu können, ist eine klinische Validierung notwendig. Voraussetzung für diese ist die Verfügbarkeit eines robusten und vor allem validierten Quantifizierungsverfahrens. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht daher die Entwicklung und Validierung eines Massenspektrometrie-basierten Verfahrens für die Quantifizierung von CAAP48 in humanem Blut.

Innerhalb der Entwicklung und Validierung eines Quantifizierungsverfahrens für CAAP48 sollte die Eignung zweier verschiedener massenspektrometrischer Analyseverfahren, der MALDI-TOF- und der LC-ESI-Tripelquadrupol-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS), überprüft werden. Letztere stellt nach wie vor den massenspektrometrischen Goldstandard für die Analyse von Patientenproben dar und wird in vielen klinischen Laboren genutzt. LC-ESI-MS/MS-Systeme sind allerdings hinsichtlich der für eine Analyse benötigten Zeit nur bedingt hochdurchsatzfähig und damit recht kostenintensiv. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Analyseverfahren eingesetzt. In Bezug auf die Identifizierung und Validierung von Biomarkern ist deren Bedeutung verglichen mit LC-ESI-MS/MS-Verfahren bisher nur gering. Neue MALDI-TOF-Massenspektrometer ermöglichen jedoch sehr hohe Analysengeschwindigkeiten, sodass mehrere tausend Proben pro Stunde analysiert werden können. Darüber hinaus haben MALDI-TOF-basierte Systeme in den vergangenen Jahren die routinemäßige Identifizierung von Mikroorganismen revolutioniert und sind mittlerweile in den meisten klinischen Laboren verfügbar.

Die prinzipielle Leistungsfähigkeit des Quantifizierungsverfahrens sollte im Anschluss an dessen Entwicklung und Validierung mit Hilfe einer Machbarkeitsstudie bestätigt werden. Die Erhebung des hierfür notwendigen Probenmaterials erfolgte in einer klinischen Studie mit (Sepsis-)Patienten einer Intensivstation. Die Entnahme der Blutproben wurde durch ein umfassendes Monitoring klinischer Parameter begleitet.

Die einfache Durchführbarkeit, Robustheit sowie Kosteneffizienz des Quantifizierungsverfahrens sollte besondere Aufmerksamkeit erfahren, damit letztlich dessen Übertragung auf andere Labore und seine Verwendung in weiteren klinischen Studien mit geringem Aufwand möglich ist.

3 Strategie

Ausgangspunkt der Arbeit ist die Annahme, dass es sich bei CAAP48 um einen potentiellen Blut-basierten Biomarker für Sepsis handelt. Aufbauend auf dieser Annahme kann die Strategie für die Entwicklung eines Quantifizierungsverfahrens in folgende Abschnitte gegliedert werden:

1. Synthese und Charakterisierung von Peptidstandards,
2. Entwicklung einer Probenaufarbeitungsmethode,
3. Etablierung einer MALDI-TOF- und einer HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode,
4. Validierung des Quantifizierungsverfahrens (nur für HPLC-ESI-MS/MS),
5. Durchführung einer klinischen Studie,
6. Quantifizierung von CAAP47 und CAAP48 in Patientenproben.

Mit Hilfe der im ersten Abschnitt synthetisierten und charakterisierten Peptidstandards wurde eine auf Festphasenextraktion (SPE) basierende Probenaufarbeitungsmethode entwickelt. Dazu wurden verschiedene stationäre Phasen anhand der entsprechenden Nachweisgrenze für einen internen Standard des CAAP48 miteinander verglichen. Die stationäre Phase, die die niedrigste Nachweisgrenze für den internen Standard ermöglichte, wurde ausgewählt und für alle weiteren Arbeiten verwendet.

Im Folgenden wurden auf Basis eines MALDI-TOF/TOF- und eines HPLC-ESI-MS/MS-Systems zwei massenspektrometrische Quantifizierungsmethoden für CAAP48 etabliert.

Im Mittelpunkt der Etablierung der MALDI-TOF-basierten Quantifizierungsmethode stand die Bestimmung einer Kalibrierfunktion. Dazu wurden Analyt (synthetische Form) und interner Standard in verschiedenen Konzentrationen miteinander gemischt und anschließend mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die Bestimmung der Kalibrierfunktion erfolgte durch den Vergleich der Konzentrationsverhältnisse von Analyt und internem Standard mit den Signalintensitätsverhältnissen.

Die Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode umfasste zunächst die Etablierung einer MS/MS- und im Anschluss eine darauf abgestimmte HPLC-Methode. Für die MS/MS-Methode wurden zunächst geeignete Vorläufer- und Produktionen ausgewählt sowie die entsprechenden Massenübergänge optimiert. Um eine HPLC-Methode zu etablieren, die hinsichtlich Signalform und Retentionszeit für Analyt und internen Standard optimale Ergebnisse liefert, wurden verschiedene Parameter (z. B. Temperatur, Flussrate, Druck) und Gradienten untersucht.

Die Probenvorbereitungsmethode sowie die beiden massenspektrometrischen Quantifizierungsmethoden bilden gemeinsam das Quantifizierungsverfahren für CAAP48. Um dessen prinzipielle Eignung zur zuverlässigen Quantifizierung von CAAP48 nachzuweisen, erfolgte im zweiten Teil der Arbeit zunächst die Validierung des auf HPLC-ESI-MS/MS-basierenden Abschnitts des Quantifizierungsverfahrens in Anlehnung an die Kriterien der US-amerikanischen „*Food and Drug Administration*“ („*Bioanalytical Method Validation* –

Guidance for industry“ [56]) sowie der „*European Medicines Agency*“ („*Guideline on Bioanalytical Method Validation*“ [57]).

Im Anschluss wurde mit Hilfe von Patientenmaterial die grundsätzliche Eignung des Verfahrens für die Quantifizierung von CAAP48 in humanen Plasmaproben überprüft. Dazu wurden im Rahmen einer Diagnostikstudie Blutproben von Sepsis- und Kontrollpatienten einer Intensivstation der Universitätsmedizin Rostock erhoben. Um die Studie durchführen zu können, wurde als erstes ein Antrag für die zuständige Ethikkommission erarbeitet. Dieser enthielt Angaben über das Vorgehen zur Auswahl geeigneter Patienten, die Strategie zur Entnahme, Herstellung und Lagerung der Blutplasmaproben sowie die Auswahl der zu erhebenden klinischen Parameter und Scores.

Der letzte Abschnitt der Arbeit widmete sich der Quantifizierung von CAAP48 in den erhobenen Blutplasmaproben mit Hilfe eines MALDI-TOF- und eines HPLC-ESI-MS/MS-Systems. Ziel der Quantifizierung von CAAP48 war der Vergleich der beiden massenspektrometrischen Techniken, um das für verschiedene Anwendungsszenarien optimale Quantifizierungsverfahren bestimmen zu können.

Wie im Abschnitt 1.2.2 bereits beschrieben, findet sich im Blut von etwa 50 % der Bevölkerung eine mutierte Form von CAAP48, welche als CAAP47 bezeichnet wird. Die Bestimmung der Konzentration von CAAP47 ist in Anbetracht von dessen Häufigkeit für die Validierung von CAAP48 als Biomarker für Sepsis unerlässlich. Aus diesem Grund muss CAAP47 in jegliches Quantifizierungsverfahren für CAAP48 einbezogen werden. Da sich CAAP47 und CAAP48 in lediglich einer Methylen-Gruppe unterscheiden, sind die physikochemischen Eigenschaften, abgesehen von der Molekularmasse (Differenz von 14 Da), identisch. Demnach sollten sich CAAP47 und CAAP48 weder während der Probenaufarbeitung verschiedenartig verhalten (z. B. bei der Bindung an die stationäre Phase) noch dürften sich ihre Ionisierungseffizienz sowie das Fragmentierungsverhalten unterscheiden. Die für CAAP48 während der Entwicklung und Validierung des Massenspektrometrie-basierten Quantifizierungsverfahrens erhaltenen Ergebnisse können daher auf CAAP47 übertragen werden. Dadurch konnte der Zusatzaufwand, den insbesondere eine separate Methodenentwicklung für CAAP47 verursacht hätte (z. B. aufgrund der Synthese und Charakterisierung zusätzlicher interner Standards), minimiert werden. Berücksichtigt wurde CAAP47 in der vorliegenden Arbeit daher erst bei der Quantifizierung von CAAP48 in den humanen Plasmaproben.

Innerhalb des folgenden Kapitels werden die einzelnen Schritte der Entwicklung und Validierung des Quantifizierungsverfahrens für CAAP48 einführend vorgestellt. Besondere Beachtung findet dabei die Vermittlung der Vorgehensweise und der Aufbau der experimentellen Arbeiten.

4 Theoretischer Teil

4.1 Peptidstandards

Voraussetzung für die Etablierung eines Probenvorbereitungsverfahrens für CAAP48 in Blutplasma war das Vorhandensein von geeigneten und vor allem gut charakterisierten internen Standards. Insgesamt wurden vier verschiedene Peptide mit Hilfe der Festphasen-Peptidsynthese dargestellt, mittels RP-HPLC gereinigt und anhand verschiedener analytischer Techniken charakterisiert (Tabelle 4).

Tabelle 4 – Übersicht über die verwendeten synthetischen Peptide

Bezeichnung	Einsatzbereich	Aminosäuresequenz ⁷ (353-394) ⁸	Molekular- masse (Da)
CAAP48 _{syn}	MALDI-TOF, LC-MS/MS	H ₂ N-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLM- IEQNTKSPLFMGKVVNPTQK-OH	4789,7
CAAP48- 2xF(D ₅)	MALDI-TOF	H ₂ N-LEAIPMSIPPEVKF(D ₅)NKPF(D ₅)VFLM- IEQNTKSPLFMGKVVNPTQK-OH	4799,8
CAAP48- 4xF(D ₅)	LC-MS/MS	H ₂ N-LEAIPMSIPPEVKF(D ₅)NKPF(D ₅)VF(D ₅)LM- IEQNTKSPLF(D ₅)MGKVVNPTQK-OH	4809,9
CAAP48-3xV	LC-MS/MS	H ₂ N-LEAIPMSIPPEVKFNKPFV V M- V EQNTKSP V FMGKVVNPTQK-OH	4747,7

Bei CAAP48_{syn} handelte es sich um das synthetische Analogon des endogenen CAAP48_{endo}⁹. Es wurde als Referenzstandard für die Methodenentwicklung benötigt. Die internen Standards umfassten entweder Isotopen-markierte Formen von CAAP48 oder Verbindungen mit einer hohen strukturellen Ähnlichkeit.

Zur Darstellung von CAAP48-2xF(D₅) und CAAP48-4xF(D₅) wurde in der Festphasen-Peptidsynthese für Position 366 und 370 bzw. 366, 370, 372 und 384 ein Phenylalanin-Baustein verwendet, in dem die Ringprotonen gegen Deuterium ausgetauscht waren. Dadurch wiesen die beiden internen Standards im Vergleich zu CAAP48 eine um 10 Da bzw. 20 Da höhere Molekularmasse auf. Eine Differenz von 10 Da war ausreichend, damit die Isotopenmuster der einfach geladenen Molekül-Ionen von CAAP48 und CAAP48-2xF(D₅) im MALDI-TOF-Massenspektrum Basislinien-getrennt sind. Für die Verwendung in der HPLC-ESI-MS/MS war CAAP48-2xF(D₅) jedoch ungeeignet, da bei der Ionisierung mittels Elektrospray

⁷ Positionen, an denen Leucin/Isoleucin gegen Valin ausgetauscht wurden, sind rot markiert.

⁸ Die Bezeichnung der Aminosäurepositionen orientiert sich an der kanonischen Sequenz von Alpha-1-Antitrypsin (UniProt-Eintrag „P01009“, abgerufen am 27. Juli 2018).

⁹ Zur Vereinfachung werden im Text häufig beide Formen (CAAP48_{syn} und CAAP48_{endo}) unter der Bezeichnung CAAP48 subsummiert.

vorrangig mehrfach geladene Molekül-Ionen entstehen. Bei mehrfach geladenem CAAP48 und CAAP48-2xF(D₅) ist der Massenabstand zu gering, um bei der im Vergleich zu anderen Gerätetypen begrenzten Auflösung von Tripelquadrupol-Massenspektrometern eine Basislinientrennung beider Isotopenmuster zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurden mit CAAP48-4xF(D₅) und CAAP48-3xV zwei weitere interne Standards synthetisiert. Bei CAAP48-3xV wurde bewusst auf die Verwendung kostenintensiver Isotopen-markierter Bausteine für die Festphasen-Peptidsynthese verzichtet. Stattdessen erfolgte an drei Positionen der Austausch von Leucin- und Isoleucin-Resten gegen Valin (Leu373Val, Ile375Val und Leu383Val). Im Ergebnis wies CAAP48-3xV eine um – verglichen mit CAAP48 – 42 Da verringerte Molekularmasse auf.

Die große strukturelle Ähnlichkeit von CAAP48 und der internen Standards sollte eine hohe Übereinstimmung der physikochemischen Eigenschaften (z. B. Molekularmasse, Polarität, Ladungszustand) sicherstellen. Dies gewährleistet ein gleichartiges Verhalten von Analyt und internem Standard bei der Probenaufarbeitung und während der Ionisierung in der Ionenquelle der verwendeten Massenspektrometer.

Um eine grobe Einschätzung der Hydrophobizität der Peptide vornehmen zu können, wurde zunächst für CAAP48 der „*Grand Average of Hydropathy*“ (GRAVY) bestimmt. Der GRAVY beruht auf dem Hydrophobizitäts-Index von Kyte und Doolittle, wobei der Index-Wert umso positiver ist, je hydrophober der Aminosäurerest [58]. Hydrophile Reste besitzen hingegen negative Index-Werte. Mit einem Wert von +4,5 führt Isoleucin den Index an, während Arginin mit -4,5 die Aminosäure mit der hydrophilsten Seitenkette ist. Die Berechnung des GRAVY erfolgt durch Aufsummieren der Hydrophobizitäts-Werte jedes einzelnen Aminosäurerestes. Die auf diese Weise gebildete Summe wird schließlich durch die Gesamtzahl der Reste der Sequenz geteilt [59].

Für CAAP48 wurde ein GRAVY von -0,002 berechnet¹⁰. Dieser Wert deutet auf ein ausgeglichenes Verhältnis von hydrophoben und hydrophilen Aminosäureresten hin, welche darüber hinaus gleichmäßig in der Sequenz verteilt sind. CAAP48 besitzt also mit hoher Wahrscheinlichkeit eine gute Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von CAAP48 und CAAP48-2xF(D₅) sowie CAAP48-4xF(D₅) kann diese Schlussfolgerung auch auf die beiden internen Standards übertragen werden. Unterschiede in der Hydrophobizität ergaben sich nur zwischen CAAP48 und CAAP48-3xV. In letzterem wurden insgesamt drei Leucin-/Isoleucin-Reste gegen Valin-Reste ausgetauscht. Der GRAVY für CAAP48-3xV betrug daher -0,007, was auf eine im Vergleich mit CAAP48 leicht verringerte Hydrophobizität hinweist.

Zur Abschätzung der ionischen Eigenschaften der Standardpeptide wurde zunächst die Anzahl der in der Sequenz von CAAP48 vorhandenen sauren und basischen Seitenkettenfunktionen bestimmt. Demnach enthält CAAP48 vier freie Carboxygruppen (drei

¹⁰ Die Berechnung erfolgte mit ProtParam auf www.expasy.org/tools/, abgerufen am 21. November 2018

Theoretischer Teil

Glutaminsäure-Reste und der freie C-Terminus) sowie sechs freie Aminogruppen (fünf Lysin-Reste und der freie N-Terminus). Die Anzahl der basischen Seitenkettenfunktionen ist also größer als die der sauren Gruppen. CAAP48 weist demnach einen deutlich basischen Charakter auf. Diese Einschätzung wird durch den anhand der Aminosäuresequenz von CAAP48 berechneten isoelektrischen Punkt von 9,4¹¹ unterstrichen.

Die Anzahl und Art der ionisierbaren Gruppen von Analyt und internem Standard waren identisch, weshalb die Standardpeptide bei einem bestimmten pH-Wert den gleichen Ladungszustand aufweisen sollten. Damit dürften auch keine Unterschiede hinsichtlich der Ionisierung des Analyten und der internen Standards bestanden haben.

Die grundlegenden physikochemischen Eigenschaften von CAAP48 sind übersichtsweise in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Physikochemische Eigenschaften der Aminosäurereste von CAAP48. Die Bezeichnung der Aminosäuren orientiert sich an ihrer Position innerhalb der Sequenz von Alpha-1-Antitrypsin.

Wichtig bei der Verwendung von synthetischen Peptidstandards ist deren umfassende Charakterisierung insbesondere hinsichtlich ihrer Reinheit. Dazu wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Standards mit Hilfe von Elementaranalyse, MALDI-TOF-Massenspektrometrie und Flüssigkeitschromatographie (HPLC) charakterisiert.

Da die Reinigung der Rohprodukte der synthetischen Peptide mittels RP-HPLC unter sauren Bedingungen erfolgte (Zugabe von Trifluoressigsäure als Ionenpaarbildner), lagen die Standardpeptide final als TFA-Salze vor. Die Anzahl der je Peptidmolekül gebundenen TFA-Moleküle hängt dabei von den im Peptid vorhandenen basischen Funktionen ab.

Das Ziel der Elementaranalyse bestand daher in der Bestimmung des TFA-Anteils an der Trockenmasse der synthetischen Peptide, da dies von entscheidender Bedeutung für eine korrekte Durchführung der Einwaage ist. Nur wenn der Anteil der Trifluoressigsäure an der Trockenmasse der Peptidstandards bekannt ist, kann auch die Einwaage und damit die Herstellung der Standardlösungen korrekt erfolgen.

Die Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie sollte vorrangig Aussagen über die Reinheit bzw. das Vorhandensein der für die Festphasen-Peptidsynthese typischen Abbruchsequenzen ermöglichen. Darüber hinaus dienen die Messungen der Einschätzung von Auffälligkeiten, die einer Verwendung als Referenz- bzw. interner Standard entgegenstehen oder diese zumindest einschränken könnten. Zu diesen Auffälligkeiten zählt

¹¹ Berechnet mit Hilfe von ProtParam auf www.expasy.org/tools/, abgerufen am 21. November 2018.

das Auftreten von Salzaddukten (z. B. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) sowie deren Intensität und vor allem das Vorhandensein artifizierlicher Aminosäuremodifikationen wie z. B. die Oxidation von Methionin oder die Deamidierung von Asparagin und Glutamin.

Des Weiteren wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie die Konzentration der Peptide in den Stocklösungen überprüft. Dazu wurden gleich konzentrierte Lösungen der verschiedenen Peptide hergestellt, im Volumenverhältnis von 1:1 gemischt und im Anschluss analysiert. Nur wenn die Signalintensitäten der Molekül-Ionen der Standardpeptide im Massenspektrum vergleichbar waren, erfolgte eine Verwendung der Stocklösungen in weiteren Experimenten.

Unter Anwendung des gleichen Experiments wurde die Konzentration der Stocklösungen auch mit Hilfe von RP-HPLC-Läufen überprüft. Eine Verwendung der Stocklösungen in allen weiteren Experimenten erfolgte nur, wenn die Signalflächen und/oder -höhen der verschiedenen Standardpeptide untereinander vergleichbar waren. Darüber hinaus wurden mit Hilfe der RP-HPLC-Läufe Informationen zur Reinheit der Standardpeptide sowie zu deren Einfrier- und Auftaustabilität ermittelt. In einem weiteren Experiment erfolgte der Nachweis der Verdünnungslinearität.

4.2 Entwicklung und Validierung eines Massenspektrometrie-basierten Quantifizierungsverfahrens für CAAP48

Das Massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsverfahren setzt sich aus mehreren Einzelmethoden zusammen, von denen die Probenaufarbeitungsmethode die erste ist. Wird ein HPLC-ESI-MS/MS-System für die Analyse der Proben verwendet, so kommen zweitens noch eine Methode für die flüssigkeitschromatographische Auftrennung sowie drittens eine damit eng verknüpfte massenspektrometrische Methode für Nachweis- und Quantifizierung von CAAP48 zum Einsatz. Bei der Nutzung eines MALDI-TOF-Systems entfiel die flüssigkeitschromatographische Auftrennung.

4.2.1 Probenaufarbeitungsmethode

Der erste Schritt bei der Entwicklung des Quantifizierungsverfahrens bestand in der Etablierung einer Probenaufarbeitungsmethode. Im Hinblick auf die geplante Analyse von humanem Blutplasma, welches neben Gewebekomponenten zu den komplexesten biologischen Matrices zählt, erschien von vornherein die Nutzung einer Festphasenextraktion sinnvoll. Oftmals können nur mittels Festphasenextraktion Matrixeffekte minimiert, eine optimale Empfindlichkeit für den Analyten erreicht und die Selektivität des gesamten Quantifizierungsverfahrens sichergestellt werden. Die Verminderung der Probenkomplexität leistet darüber hinaus einen entscheidenden Beitrag für eine möglichst lange Lebensdauer der verwendeten Chromatographiesäulen, sie vermindert die Wahrscheinlichkeit von Defekten des Chromatographiesystems und sie erlaubt es, die regelmäßige Reinigung des Massenspektrometers ohne Empfindlichkeitsverlust in größeren Zeitabständen

durchzuführen [60]. Die genannten Aspekte sind für die Analyse von Probenserien deshalb von Bedeutung, weil das Auftreten eines Problems während der Messung von der Beeinträchtigung der Qualität der erhobenen Daten bis zum Ausfall des Gerätesystems führen kann. Letzteres ist oftmals mit dem Verlust des aufgearbeiteten Probenmaterials verbunden und muss daher möglichst verhindert werden.

Von entscheidender Bedeutung für die Aufreinigung von CAAP48 ist außerdem dessen Freisetzung aus Alpha-1-Antitrypsin. In der intakten Struktur bestehen zwischen dem C-Terminus (umfasst die Aminosäuresequenz von CAAP48) von Alpha-1-Antitrypsin und dem restlichen Protein umfangreiche Interaktionen (siehe Abschnitt 1.2.2). Die proteolytische Spaltung sowie die dadurch gegebenenfalls ausgelösten Konformationsänderungen in der Struktur von Alpha-1-Antitrypsin dürften diese umfangreichen Interaktionen vermutlich nicht oder höchstens teilweise unterbinden. Daher liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Großteil des entstanden CAAP48 im Komplex mit Alpha-1-Antitrypsin vor. Um CAAP48 aus diesem Komplex herauszulösen und damit der Festphasenextraktion zugänglich zu machen, muss folglich zu Beginn der Probenaufarbeitung ein Denaturierungsschritt durchgeführt werden.

4.2.1.1 Denaturierung

Für die umfassende Denaturierung der in der humanen Blutplasmaprobe enthaltenen Biomoleküle ist der Einsatz eines möglichst starken Denaturierungsmittels notwendig. Hierfür bieten sich insbesondere chaotrope Salze wie z.B. Guanidiniumchlorid (GdmCl) an, dessen denaturierende Wirkung vermutlich auf seine Fähigkeit zurückzuführen ist, mit den hydrophoben Bereichen eines Proteins zu interagieren und diese in der Folge zu solvatisieren. Dadurch wird eine der Haupttriebkraft der Proteinfaltung, der hydrophobe Effekt, beeinträchtigt und letztendlich die Denaturierung ermöglicht [61]. Durch die GdmCl-getriebene Entfaltung von Alpha-1-Antitrypsin sollte die Interaktion mit CAAP48 gestört und dieses dadurch freigesetzt werden. Daher wurden die Blutplasmaproben vor der Festphasenextraktion mit Guanidiniumchlorid versetzt.

4.2.1.2 Grundlagen der Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktion („*Solid-phase Extraction*“, SPE) handelt es sich um ein nach dem gleichen Grundprinzip wie die Flüssigkeitschromatographie arbeitendes Verfahren. Es beruht auf der Interaktion zwischen der stationären Phase, die sich bei der SPE in einer offenen Kartusche befindet, und dem zu isolierenden Analyten, der in der mobilen Phase gelöst oder suspendiert ist. Für die Interaktion von stationärer Phase und Analyt können sowohl hydrophobe als auch ionische Wechselwirkungen verantwortlich sein. Während erstere bereits in Abschnitt 1.3.3.1 übersichtsweise erläutert wurden, sollen letztere am Beispiel der Ionenaustauschchromatographie nachfolgend kurz beschrieben werden.

Grundsätzlich beruht die Ionenaustauschchromatographie auf der reversiblen elektrostatischen Interaktion zwischen einer geladenen Verbindung in der mobilen Phase und den geladenen Funktionen der stationären Phase. Der pH-Wert der mobilen Phase bestimmt

dabei sowohl den Ionisierungsstatus der funktionellen Gruppe der stationären Phase als auch den des Analyten. Bei der Verwendung von Kationenaustauschern konkurrieren die positiv geladenen Peptid-Ionen mit anderen positiv geladenen Ionen in der mobilen Phase um die negativ geladenen Gruppen auf der stationären Phase. Initial sind die negativ geladenen Gruppen der stationären Phase im Gleichgewicht mit den positiv geladenen Gegen-Ionen in der mobilen Phase. Unter entsprechenden pH-Bedingungen sind die Peptid-Ionen jedoch in der Lage, die Gegenionen von den negativ geladenen Gruppen der stationären Phase zu verdrängen.

Betrachtet man hingegen den Prozess der Elution, so bestehen Unterschiede insbesondere zwischen starken und schwachen Kationen- wie auch zwischen starken und schwachen Anionenaustauschern.

Starke Kationenaustauscher eignen sich insbesondere zur Aufreinigung von leicht bis mäßig basischen Analyten. Entscheidend für die Elution eines solchen Analyten von einem starken Kationenaustauscher ist der pKs-Wert der Sulfonsäure als funktioneller Gruppe. Da dieser sehr niedrig ist (pKs-Wert <1), kann die negative Ladung der stationären Phase durch den pH-Wert der mobilen Phase nicht beeinflusst werden. Eine quantitative Veränderung des Ladungszustandes der stationären Phase ist daher ausgeschlossen, weshalb die Elution auf andere Weise erfolgen muss. Stattdessen wird die Elution durch eine hohe Konzentration eines positiv geladenen Gegenions (z. B. Ammonium-Ion) in der mobilen Phase induziert. Der gebundene Analyt wird durch das Gegen-Ion von den negativ geladenen Gruppen der stationären Phase verdrängt und damit freisetzt. Gleichzeitig führt der hohe pH-Wert des zur Elution genutzten Lösungsmittelgemischs zu einer Änderung des Ladungszustands des Analyten, dieser ist nun entweder überhaupt nicht oder negativ geladen, was ebenfalls zum Abbruch der Interaktionen führt.

Bei einem schwachen Kationenaustauscher, der sich insbesondere für die Aufreinigung von stark basischen Analyten eignet, erfolgt die Elution im Unterschied zum starken Kationenaustauscher vor allem durch eine Umkehr der Ladung der stationären Phase. Dies beruht darauf, dass der stark basische Analyt nur schwer durch ein anderes positiv geladenes Ion von den negativ geladenen Carboxygruppen (pKs-Wert von ca. 5) der stationären Phase verdrängt werden kann. Im Unterschied zum starken kann jedoch bei einem schwachen Kationenaustauscher der Ladungszustand der stationären Phase durch Veränderung des pH-Wertes der mobilen Phase umgekehrt werden, während der Ladungszustand des Analyten sich hingegen nicht verändert. Letztendlich sind sowohl die stationäre Phase als auch der Analyt positiv geladen. Aus der elektrostatischen Wechselwirkung wird eine Abstoßung, die zur Freisetzung des Analyten führt.

Bei Anionenaustauschern erfolgen Adsorption und Elution nach den gleichen Prinzipien, nur die Vorzeichen der Ladungen sind im Vergleich mit den Kationenaustauschern umgekehrt [49]. Darüber hinaus führen die beschriebenen Prozesse nicht allein zur Elution

Theoretischer Teil

des Analyten, sondern auch zur Freisetzung von an die stationäre Phase gebundenen Matrixbestandteilen.

Der typische Ablauf einer Festphasenextraktion ist in Abbildung 9 dargestellt und wird darüber hinaus nachfolgend kurz beschrieben:

1. **Konditionieren** der stationären Phase mit einem organischen Lösungsmittel (Methanol, Acetonitril). Dieser Schritt dient vor allem der Vorbereitung der Phase für die Interaktion mit dem Analyten sowie gegebenenfalls der Beseitigung von losem SPE-Material und dem Entfernen von Verunreinigungen.
2. **Äquilibrieren** des Sorbens mit einem Lösungsmittelgemisch, dessen Eigenschaften (z. B. pH-Wert, Polarität) mit dem Lösungsmittel übereinstimmen, in welchem die Probe vor dem Aufarbeiten verdünnt wurde. Bei Ionenaustauschern dient dieser Schritt vor allem der Überführung der funktionellen Gruppe der stationären Phase in den geladenen Zustand, damit der Analyt über elektrostatische Interaktionen binden kann.
3. **Auftragen** der Probe auf die aktivierte Phase, wobei idealerweise nur der Analyt bindet, während möglichst viele der Matrixbestandteile ohne mit der stationären Phase zu interagieren durchlaufen.
4. **Waschen** der Phase mit einem Lösungsmittelgemisch, um nicht gebundene Matrixbestandteile abzutrennen.
5. **Elution** des Analyten mit einem Lösungsmittelgemisch mit hohem organischen Anteil, das in der Lage ist die Bindung zwischen stationärer Phase und Analyt aufzubrechen.

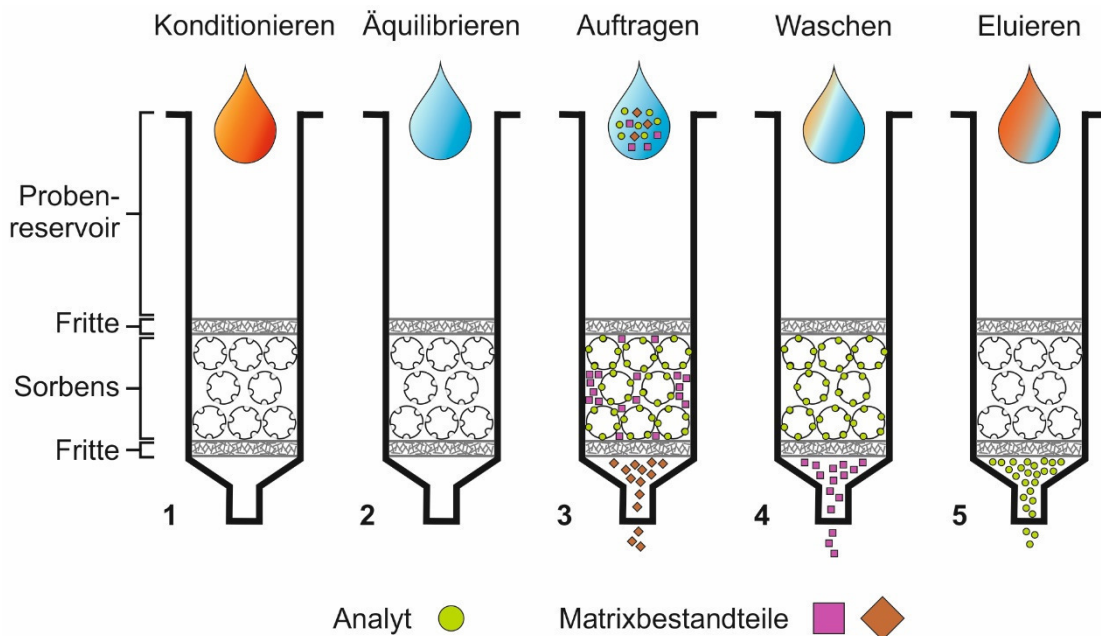


Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer SPE-Kartusche und allgemeiner Ablauf einer Festphasenextraktion.

Bei allen Arbeitsschritten laufen die aufgetragenen Lösungsmittelgemische und die Probe entweder aufgrund der Schwerkraft durch das SPE-Material oder sie werden mit einem Über-/Unterdruck hindurchgepresst bzw. -gesaugt. Hierfür werden spezielle Vakuumapparaturen benötigt. Eine sehr effiziente und einfache Alternative stellt die Durchführung der Festphasenextraktion durch Zentrifugieren dar. Allerdings eignen sich nicht alle SPE-Kartuschen bzw. -Platten für die Verwendung in einer Zentrifuge.

Für die Festphasenextraktion ist eine adäquate Vorbereitung der Probe entscheidend. Meist wird diese vor dem Auftragen verdünnt, filtriert und mitunter auch denaturiert. Von besonderer Bedeutung, v. a. bei der Nutzung von Ionenaustauschern als stationäre Phase, ist die Einstellung des pH-Wertes. Letzteres erfolgt meist bereits mit der Verdünnung durch die Verwendung eines Puffers oder Lösungsmittelgemisches mit entsprechendem pH-Wert.

4.2.1.3 Auswahl des Festphasenextraktions-Systems

Kommerziell erhältlich ist eine große Anzahl verschiedener stationärer Phasen in den unterschiedlichsten Formaten. Bei der Auswahl eines für die vorliegende Fragestellung geeigneten Festphasenextraktions-Systems wurden verschiedene Aspekte berücksichtigt. In Anbetracht des geringen Probenvolumens wurden nur Produkte mit weniger als 5 mg stationärer Phase in die Auswahl einbezogen. Bei einer größeren Menge SPE-Material müsste, damit der Analyt quantitativ von der stationären Phase freigesetzt wird, ein entsprechend großes Elutionsvolumen eingesetzt werden. Dieses würde jedoch zu einer Verdünnung des Analyten und damit einhergehend zu einer Verringerung der Empfindlichkeit führen. Außerdem werden für die massenspektrometrische Analyse nur wenige Mikroliter benötigt.

Von entscheidender Bedeutung ist die Möglichkeit, viele Proben gleichzeitig bearbeiten zu können („*Multiplexing*“). Dies ist bei der Nutzung von Einzelkartuschen jedoch nur in begrenztem Umfang möglich (meist können maximal 12 Proben gleichzeitig bearbeitet werden). Bei geringen Probenvolumina und vielen Proben bietet sich die Verwendung eines Festphasenextraktionssystems im Mikrotiterplattenformat an. Bei diesem befindet sich die stationäre Phase am Boden der Kavitäten einer speziellen 96-Well Mikrotiterplatte.

Als geeignet zur Erfüllung der aufgeführten Anforderungen erschienen insbesondere die „*Oasis*[®] *μElution Plates*“ (Waters). Sie sind vom Hersteller von vornherein zur Vorbereitung komplexer biologischer Proben für die massenspektrometrische Analyse entwickelt worden. Hervorzuheben ist insbesondere die Möglichkeit, mit lediglich 50 μl die Elution durchführen zu können. Dies ermöglicht es, die Probe unmittelbar im Anschluss an die Elution ohne zusätzlichen Konzentrierungsschritt zu analysieren.

Bei der in den „*Oasis*[®] *μElution Plates*“ eingesetzten stationären Phase handelt es sich um ein Polymermaterial, welches aus den Monomeren *N*-Vinyl-2-pyrrolidon und Divinylbenzol besteht. Während letzteres die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase ermöglicht, gewährleistet *N*-Vinylpyrrolidon insbesondere die Benetzbarkeit der Sorbensoberfläche mit Wasser, was die Bindung von Analyten aus

Theoretischer Teil

wässrigen Probenlösungen wesentlich erleichtert. Polymermaterialien zeichnen sich darüber hinaus durch eine sehr hohe pH-Stabilität aus (für „Oasis®“-Produkte zwischen pH 0-14). Die „Oasis®“-Produkte sind in vier verschiedenen „Mixed-mode“-Materialien erhältlich. Unter „Mixed-mode“ versteht man die besondere Eigenschaft einer stationären Phase, mit dem Analyten sowohl über hydrophobe als auch über elektrostatische (ionische) Wechselwirkungen interagieren zu können. Die Verbindung der Eigenschaften von „Reversed-phase“ und von Ionenaustauscher-Materialien ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Selektivität.

Die in die Auswahl für eine Nutzung in der zu etablierenden Probenaufarbeitungsmethode einbezogenen stationären Phasen sind in Tabelle 5 übersichtswise dargestellt. Bei allen aufgeführten stationären Phasen spielt ihre Eigenschaft als Ionenaustauscher eine besondere Rolle für die Aufreinigung des Analyten.

Tabelle 5¹² – Auswahl einer stationären Phase

Bezeichnung	Oasis® MCX	Oasis® WCX	Oasis® MAX	Oasis® WAX
Funktionelle Gruppen (R)				
Grundstruktur der Polymerphase				
Eigenschaften				
Ionen-austausch	Kationenaustauscher		Anionenaustauscher	
	Starker	Schwacher	Starker	Schwacher
pK _s -Wert	<1	ca. 5	>18	ca. 6
Beispiele für Elutionsmittel	MeOH/NH ₄ OH ¹³ (950/50; v/v)	MeOH/HCOOH ¹⁴ (980/20; v/v)	MeOH/HCOOH ¹⁴ (980/20; v/v)	MeOH/NH ₄ OH ¹³ (950/50; v/v)
Geeignet für Analyten mit	pK _s -Wert von 2-10	pK _s -Wert >10	pK _s -Wert von 2-8	pK _s -Wert <1

¹² Verändert nach [62]

¹³ ≥13,3 mol/l (≥25 %)

¹⁴ 25,9 mol/l (98 %)

Die finale Auswahl der stationären Phase erfolgte auf Basis der ionischen Eigenschaften von CAAP48. Bei letzterem handelt es sich um ein stark basisches Peptid (isoelektrischer Punkt im Bereich von 9,4), weshalb es über einen weiten pH-Bereich positiv geladen ist und nur in stark basischen Lösungsmitteln eine negative Nettoladung aufweist. Idealerweise erfolgt die Aufreinigung daher mit Hilfe eines Kationenaustauschers. Von den in Tabelle 5 aufgeführten Materialien waren somit „Oasis® MCX“ und „Oasis® WCX“ am besten für die Aufreinigung von CAAP48 geeignet.

Von großem Vorteil war, dass verschiedene vom Hersteller der „Oasis®“-Phasen empfohlene Probenvorbereitungsprotokolle bereits eine Denaturierung der Proben mit Guanidinhydrochlorid vorsehen. Für die vorliegende Arbeit konnten diese Protokolle daher einfach übernommen werden [63–65]. Auch die Verringerung des pH-Wertes durch Zugabe von verdünnter Phosphorsäure, wichtig für die Vorbereitung der Proben für die Festphasenextraktion, sollte sich durch die damit verbundene Störung elektrostatischer Interaktionen denaturierend auf die Struktur von Alpha-1-Antitrypsin sowie des gebundenen CAAP48 auswirken.

Die finale Auswahl der stationären Phase erfolgte auf Basis experimenteller Daten. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des internen Standards CAAP48-2xF(D₅) in Leerplasma hergestellt. Die Standardproben wurden anschließend entweder mit Hilfe von „Oasis® MCX“ oder „Oasis® WCX“ aufgearbeitet und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Als zentrales Auswahlkriterium fungierte die Empfindlichkeit, mit welcher CAAP48-2xF(D₅) in den Proben nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurden die beiden SPE-Materialien mit Hilfe der aufgenommenen Massenspektren hinsichtlich des Vorhandenseins und der Intensität von Salzaddukten und artifizierlicher Modifikationen (z. B. Oxidation von Methionin) bewertet.

4.2.2 MALDI-TOF-Methode

Für die Entwicklung einer MALDI-TOF-basierten Quantifizierungsmethode für CAAP48 war es notwendig, den Zusammenhang zwischen Signalintensität und Konzentration in Form einer Kalibrierfunktion zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Konzentrationen des Analyten CAAP48_{syn} sowie des internem Standards CAAP48-2xF(D₅) miteinander gemischt und das Konzentrationsverhältnis mit dem Verhältnis der Signalintensitäten verglichen. Zur Bestimmung der Kalibrierfunktion wurden die Werte der beiden Verhältnisse gegeneinander aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt.

Der Konzentrationsbereich für die Ermittlung der Kalibrierfunktion orientierte sich an den in einem Artikel von Blaurock *et al.* angegebenen Werten [33]. Demnach sind für CAAP48_{endo} in humanem Blutplasma Konzentrationen in einem Bereich von 2,5 ng/μl bis 60 ng/μl zu erwarten. Um auch Proben analysieren zu können, die von diesem Erwartungsbereich abweichen, wurden in den Versuchen zur Bestimmung der Kalibrierfunktion Konzentrationen von 1,0 ng/μl bis 125 ng/μl untersucht.

Der Einsatz von lediglich einer Standard-Konzentration für den gesamten Konzentrationsbereich erschien aufgrund des komplexen und vermutlich nichtlinearen Zusammenhangs zwischen Konzentrations- und Signalintensitätsverhältnissen nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurde die Verwendung des internen Standards in drei verschiedenen Konzentrationen (2,5 ng/μl, 10 ng/μl und 50 ng/μl) erprobt. Jede Standard-Konzentration deckt dabei drei diskrete Bereiche (1,0 ng/μl bis 6,25 ng/μl, 4 ng/μl bis 25 ng/μl und 20 ng/μl bis 125 ng/μl) ab, die an ihren jeweiligen Enden überlagern.

Insgesamt erfolgte die Durchführung von drei verschiedenen Versuchen, in denen für jeden der drei Standard-Konzentrationsbereiche eine Kalibrierfunktion bestimmt wurde. Untersucht wurden in den drei Versuchen Mischungen von Analyt und internem Standard:

1. gelöst in einem Lösungsmittelgemisch,
2. gelöst in einem Lösungsmittelgemisch und aufgearbeitet mittels Festphasenextraktion,
3. gelöst im Blutplasma eines gesunden Spenders und aufgearbeitet mittels Festphasenextraktion.

Mit Hilfe der im dritten Versuch bestimmten Kalibrierfunktion erfolgte die Quantifizierung von CAAP48_{endo} in Blutplasmaproben von Sepsispatienten.

Die Verwendung von humanem Blutplasma als Leermatrix für die Versuche war nur möglich, weil für CAAP48-2xF(D₅) kein endogenes Analogon existiert. Darüber hinaus war aufgrund von Vorversuchen mit humanem Blutplasma eines gesunden Spenders bekannt, dass im Bereich des Massensignals des einfach geladenen Molekül-Ions von CAAP48-2xF(D₅) keine Signale endogener Verbindungen, die die Datenauswertung eingeschränkt oder ausgeschlossen hätten, zu erwarten sind.

4.2.3 HPLC-ESI-MS/MS-Methode

Die im Zuge der Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode für die Quantifizierung von CAAP48 in humanen Plasmaproben an einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer durchgeführten Analysen können in zwei verschiedene Verfahren unterteilt werden: Infusion und HPLC-ESI-MS/MS. Bei ersterer wird die Probe mit Hilfe einer Spritzenpumpe direkt und ohne vorherige Auftrennung zur Ionenquelle des Massenspektrometers befördert. Dieses Verfahren eignet sich daher nicht für die Analyse von Proben in einer komplexen Matrix (z. B. Plasma, Gewebehomogenate, etc.), sondern vor allem für die Methodenentwicklung mit verdünnten analytischen Standards. Bei einer HPLC-ESI-MS/MS-Analyse wird die Probe hingegen mit Hilfe einer HPLC-Anlage in einen Lösungsmittelfluss injiziert, mittels Chromatographiesäule aufgetrennt und schließlich zur Ionenquelle des Massenspektrometers befördert. Während des HPLC-Laufs erfolgt die Aufnahme von massenspektrometrischen Daten. Dank der chromatographischen Auftrennung der Probe eignet sich die HPLC-ESI-MS/MS-Analyse auch für komplexe Proben, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit für die Quantifizierung von CAAP48 in humanen Blutplasmaproben verwendet wurde.

4.2.3.1 Auswahl der Referenzmatrix

Da CAAP48 auch im Blut von gesunden Menschen vorkommt, eignet sich humanes Blutplasma nicht als Referenzmatrix für die Herstellung von Kalibrierproben, Qualitätskontrollen (QC), Blanks (BL) oder Doubleblanks (DBL). Daher musste zur Quantifizierung von CAAP48 eine Referenzmatrix gefunden werden, welche humanem Plasma möglichst ähnlich ist (Analyt und interner Standard sollten sich in beiden Matrices annähernd gleich verhalten) und kein CAAP48 enthält.

Zur Auswahl standen Blutplasmen verschiedener Tierarten, wobei z.B. Rattenplasma über den Fachhandel zu beziehen und damit kontinuierlich und mit hoher Qualität verfügbar ist. Entscheidend für die Auswahl ist jedoch, dass im Blut von Ratten entweder kein CAAP48 gebildet wird oder dieses aufgrund von Sequenzunterschieden nicht mit massenspektrometrischen Analyse der humanen Form interferiert. Da nicht bekannt ist, ob ein dem humanen CAAP48 äquivalentes Peptid durch Proteolyse im Blut der Ratte gebildet wird, basierte die Auswahl des Referenzplasmas allein auf dem Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem Alpha-1-Antitrypsin sowie des homologen Proteins der Ratte. Dazu wurden die Sequenzen¹⁵ der beiden kanonischen Formen miteinander verglichen (siehe Abbildung 10).

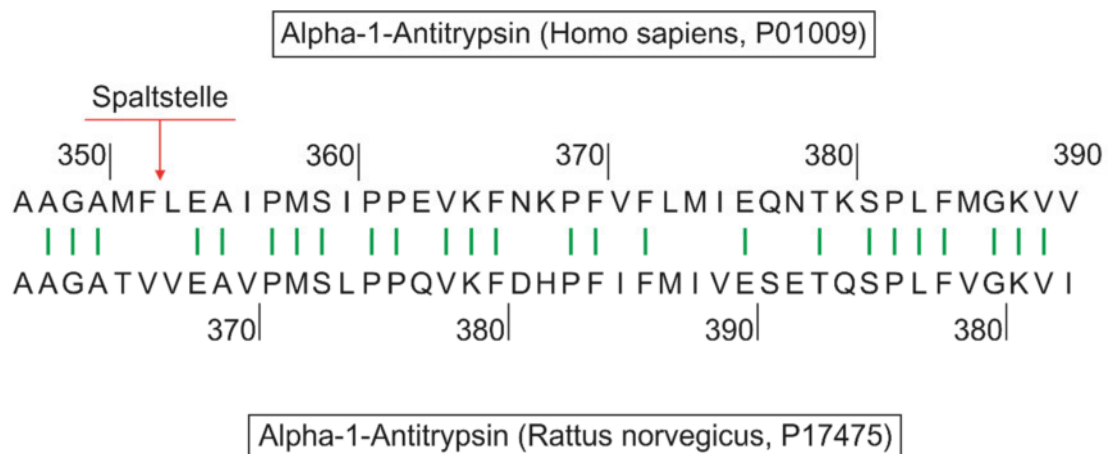


Abbildung 10: Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen von humanem Alpha-1-Antitrypsin und des homologen Proteins der Ratte.

Die C-terminalen Aminosäuresequenzen von humanem CAAP48 und dem homologen Protein der Ratte sind teilweise identisch (24 von 42 Aminosäureresten). Die vorhandenen Unterschiede reichen jedoch aus, damit sich die monoisotopische Masse von CAAP48 (4786,6 Da) und des vielleicht in der Ratte ebenfalls gebildeten proteolytischen Bruchstücks (4624,4 Da) deutlich unterscheiden. Selbst wenn die Massen der Vorläufer-Ionen ähnlich oder gleich wären, würden die Unterschiede in der Aminosäuresequenz verhindern, dass bei der Fragmentierung im Massenspektrometer Fragment-Ionen mit gleicher oder ähnlicher Masse

¹⁵ Entnommen aus UniProt/SwissProt-Datenbank, abgerufen am 18. Januar 2019.

entstehen würden. Die Massenübergänge wären also unterschiedlich. Gleiches gilt für die verwendeten internen Standards von CAAP48 (monoisotopische Masse von CAAP48-4xF(D₅) = 4806,7 Da und von CAAP48-3xV = 4744,5 Da. In der vorliegenden Arbeit konnte demnach Rattenplasma als Referenzmatrix verwendet werden.

4.2.3.2 Entwicklung der MS/MS-Methode

Der erste Schritt zur Entwicklung der MS/MS-Methode umfasste die Aufnahme von Massenspektren mit den Signalen der intakten Molekül-Ionen (sog. Q1-Scans). Mit Hilfe dieser konnten die verschiedenen Ladungszustände von Analyt und internem Standard bestimmt und die intensivsten als Vorläufer-Ionen ausgewählt werden. Im nächsten Schritt der Methodenentwicklung wurden die Vorläufer-Ionen mit der höchsten Signalintensität gezielt in der Kollisionszelle des Massenspektrometers fragmentiert und dabei Fragmentspektren (sog. Produkt-Ionenscans) aufgenommen. Jeder Produkt-Ionen-Scan enthielt die Signale aller durch die Fragmentierung erzeugten Produkt-Ionen eines Vorläufer-Ions.

Um die Struktur sowie die Art der Produkt-Ionen bestimmen zu können, wurde eine Analyse mittels MS³ durchgeführt. Dabei wurde pro MS³-Experiment jeweils eine Spezies der in der Kollisionszelle erzeugten Produkt-Ionen in der linearen Ionenfalle gespeichert und durch Einleiten eines Stoßgases (im vorliegenden Fall Stickstoff) fragmentiert. Die Bestimmung der Massen der dabei entstandenen Fragment-Ionen erfolgte mit Hilfe der linearen Ionenfalle.

Die Produkt-Ionen mit der höchsten Signalintensität wurden genutzt, um Paare aus Vorläufer- und Produkt-Ionen zu bilden, die sog. MRM- oder Massenübergänge. Dabei wurden jedoch nur Produkt-Ionen berücksichtigt, denen eine Struktur zugeordnet werden konnte. Im nächsten Schritt wurden für jeden MRM-Übergang verschiedene Geräteparameter optimiert sowie schließlich ein extrahiertes Ionenchromatogramm („*Extracted Ion Chromatogram*“, EIC) aufgenommen, um die entsprechende MRM-Intensität zu bestimmen. Die beiden intensivsten Übergänge wurde als „*Quantifier*“ und „*Qualifier*“ für eine vorläufige MRM-Methode genutzt, die als Ausgangspunkt für die nachfolgenden Arbeiten diente.

4.2.3.3 Entwicklung und Optimierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode

Als erstes wurde die analytische Interferenz der beiden Standardpeptide bestimmt, um einen grundsätzlichen Eindruck über deren Eignung für die Verwendung in einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode zu erhalten. Als analytische Interferenz (der Standardpeptide) wird im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit die Beeinträchtigung des MRM-Signals des synthetischen Analyten (CAAP48_{syn}) durch den internen Standard (CAAP48-3xV) und umgekehrt bezeichnet (abgeleitet aus [66] und [67]). Ursache hierfür ist meist die Verunreinigung des synthetischen Analyten, des Standards oder beider mit während der Peptid-Festphasensynthese entstandener und durch die Reinigung nicht vollständig entfernter Abbruchsequenzen.

Aus der Definition der analytischen Interferenz lässt sich bereits das Vorgehen für deren Bestimmung ableiten. Dazu werden Proben, die entweder nur Analyt oder nur internen Standard enthalten, mit einer MRM-Methode analysiert, in der die Massenübergänge („*Quantifier*“ und „*Qualifier*“) für beide verzeichnet sind. Zeigen sich zum Beispiel bei der Analyse der Probe, die nur Analyt enthielt, Signale für die MRM-Übergänge des internen Standards, so spricht man von einer Interferenz des Analyten für die Massenübergänge des internen Standards.

Die Optimierung HPLC-Parameter befasste sich insbesondere mit dem HPLC-Gradienten und zielte auf die Verbesserung der Auftrennung von Analyt und internem Standard (Vergrößerung der Retentionszeitdifferenz) sowie der Signalform (Verringerung von Signalbreite und „*Tailing*“), um eine höhere Signalintensität zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung bestehend aus Analyt und internem Standard mit Hilfe verschiedener Gradienten aufgetrennt. Anhand von Retentionszeitdifferenz, Signalform und Signalintensität der MRM-Übergänge für „*Qualifier*“ und „*Quantifier*“ von CAAP48_{endo} und CAAP48-3xV erfolgte schließlich die Auswahl des optimalen Gradienten. Im Anschluss wurde der Einfluss des Injektionsvolumens auf die Signalintensität und damit auf die Empfindlichkeit der HPLC-ESI-MS/MS-Methode sowie der Einfluss des Volumenanteils des Acetonitrils in der Probenlösung auf die Bindung der Analyten an die stationäre Phase untersucht.

Im letzten Schritt erfolgte die finale Auswahl der als „*Quantifier*“ und „*Qualifier*“ genutzten MRM-Übergänge. Dazu wurden mehrere Blutplasmaproben aus Ratte sowie Mensch mit Hilfe der optimierten HPLC-ESI-MS/MS-Methode analysiert. Schließlich wurde jeder der in der MS/MS-Methodenentwicklung ausgewählten MRM-Übergänge hinsichtlich Signalintensität und Interferenz mit Matrixbestandteilen bewertet. Auf Basis dieser Bewertung erfolgte die Auswahl der entsprechenden Massenübergänge für die Nutzung in der finalen HPLC-ESI-MS/MS-Methode.

4.2.3.4 Grundlagen der Erstellung von Probenserien

Für das Verständnis der im Zuge der Validierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode sowie für die Quantifizierung von CAAP48_{endo} in humanen Blutplasmaproben durchgeführten Experimente ist die Kenntnis verschiedener Aspekte der grundsätzlichen Aufbauweise einer Probenserie sowie der verwendeten Probenotypen entscheidend. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten HPLC-ESI-MS/MS-Analysen umfassten insgesamt sechs verschiedene Probenotypen, die in Tabelle 6 übersichtsweise definiert werden.

Tabelle 6 – Probentypen

Probentyp	Abk.	Probenmatrix	SPE	[c] in (ng/μl)	
				Analyt	IS
Lösungsmittel	LM	ACN/H ₂ O/NH ₄ OH (750/150/100; v/v/v)	Nein	0	0
Doubleblank	DBL	Rattenplasma	Ja	0	0
Blank	BL	Rattenplasma	Ja	0	1,25
Kalibrant	CAL	Rattenplasma	Ja	0,1-20,0	1,25
Qualitätskontrolle	QC	Rattenplasma	Ja	0,1; 0,25; 2,5; 15,0	1,25
Unbekannt	-	Humanes Plasma	Ja	Unbekannt	1,25

Die für die Herstellung der Kalibranten genutzte Lösung des internen Standards wurde auch für die Proben des Typs Blank und Unbekannt verwendet. Zur Erstellung der Qualitätskontrollen erfolgte hingegen die Verwendung einer separaten Lösung des internen Standards.

Wie eingangs bereits erwähnt, folgte der Aufbau einer Probenserie bestimmten Grundsätzen. Zunächst wurden ein bis zwei Lösungsmittel-Proben sowie mindestens zwei Doubleblank injiziert. Auf letztere folgte der erste Blank sowie mindestens ein weiterer Doubleblank. Erst im Anschluss wurden die Proben (Unbekannt) analysiert, wobei diese in den Probenserien regelmäßig mit Blanks, Doubleblanks, Qualitätskontrollen sowie Kalibranten gemischt wurden. Ein Ordnen der Proben nach Probenart oder Analyt-Konzentration erfolgte nicht. Stattdessen wurde darauf geachtet, dass hohe und niedrige Konzentrationen sowie die verschiedenen Probenarten gleichmäßig auf die Probenserie verteilt sind. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass eine Veränderung in der Geräteleistung zu einer Verfälschung der Analyseergebnisse führt. Am Ende einer Probenserie wurden zunächst ein Blank, dann mehrere Doubleblanks und zum Abschluss mehrere Lösungsmittel-Proben injiziert. Unmittelbar nach der Probenserie wurde das Chromatographie-System mit einem neutralen Lösungsmittelgemisch, z.B. ACN/H₂O (650/350; v/v), gespült.

4.2.4 Methodvalidierung

Die Validierung einer bioanalytischen Methode umfasst alle Arbeiten, mit deren Hilfe bestimmt werden kann, ob die Methode für die quantitative Analyse eines Analyten in einer biologischen Matrix zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erzielt [56]. Die Validierung erfolgt dabei für verschiedene Parameter anhand festgelegter Kriterien in definierter Vorgehensweisen. Parameter, Kriterien und Vorgehensweisen sind in Leitlinien zusammengefasst, die von verschiedenen Organisationen erarbeitet und veröffentlicht werden. Hierzu zählen die „*Bioanalytical Method Validation – Guidance for Industry*“ [56] der

US-amerikanischen „Federal Drug and Food Administration“ (FDA), die „Guideline on Bioanalytical Method Validation“ [57] der „European Medicines Agency“ (EMA) sowie die „Validation of Analytical Procedures“ [68] der „International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“ (ICH).

Für die vorliegende Arbeit war die Validierung deshalb von Bedeutung, weil das entwickelte Quantifizierungsverfahren von vornherein für die Analyse von klinischem Patientenmaterial konzipiert wurde. Die Analyse von Patientenproben mit einem nicht validierten Verfahren kann jedoch als fahrlässig bezeichnet werden, da in Anbetracht der Komplexität biologischen Probenmaterials das Risiko besteht, dass die erzeugten Daten aus verschiedensten Gründen (z.B. Matrixeffekte, eingeschränkte Lagerstabilität, Verschleppungen, etc.) nicht verwendbar sind und damit wertvolles Probenmaterial für entbehrliche Messungen verschwendet wird.

Für eine vollständige Validierung sind sehr umfangreiche Untersuchungen notwendig. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nur das HPLC-ESI-MS/MS-basierte Quantifizierungsverfahren überprüft, zumal dieses eine sensitive und spezifische Analyse auch von sehr komplexen Proben ermöglicht. Da dies nicht im gleichen Maße für das MALDI-TOF-basierte Quantifizierungsverfahren gilt, wurde es bei der Validierung nicht berücksichtigt. Eine spätere Validierung soll jedoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Die Validierung erfolgte vorrangig in Anlehnung an die Leitlinien der FDA und der EMA. Die untersuchten Parameter sowie die zugehörigen Kriterien werden in den nachfolgenden Abschnitten zusammen mit der jeweiligen Vorgehensweise erläutert.

4.2.4.1 Selektivität

Der erste Schritt der Methodvalidierung bestand in der Überprüfung der Selektivität. Die FDA definiert den Begriff Selektivität als Fähigkeit einer analytischen Methode, Analyt und internen Standard in Gegenwart von allen anderen in einer Probe vorhandenen Verbindungen (z.B. Metaboliten, Abbauprodukte, etc.) unterscheiden und quantifizieren zu können [56]. Bezogen auf die vorliegende Arbeit führte diese Definition zu der Frage, ob in Rattenplasma Verbindungen enthalten sind, die Interferenzen auf den Massenspuren von Analyt und internem Standard verursachen? Der Nachweis der Selektivität besteht demnach in der Bestimmung der Interferenz. Wenn diese ein bestimmtes Maß nicht überschreitet, ist die Methode für Analyt und internen Standard selektiv.

Die Beurteilung der Interferenz erfolgte auf Basis der in der von der EMA herausgegebenen Leitlinie angegebenen Grenzen (die Leitlinie der FDA nennt keine Grenzen). Demnach darf die für den Analyten zulässige Interferenz 20 % der Intensität oder Fläche des MRM-Signals des LLOQs nicht überschreiten. Für den internen Standard beträgt die von der EMA vorgegebene Höchstgrenze hingegen 5 % der Intensität oder Fläche des „Quantifier“ MRM-Übergangs.

4.2.4.2 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit („*Accuracy*“) einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung der experimentell ermittelten Analyt-Konzentration mit dem tatsächlichen (nominellen) Wert, während die Präzision („*Precision*“) die Übereinstimmung von mehrfach für eine Probe oder einen Probentyp ermittelten Analyt-Konzentrationen untereinander wiedergibt.

Um Richtigkeit und Präzision zu bestimmen, werden mehrere Proben mit einer bekannten Analyt-Konzentration (üblicherweise Qualitätskontrollen) entweder mehrfach innerhalb einer Probenserie an einem Tag („*Intra-batch*“) oder verteilt auf mehrere Probenserien an verschiedenen Tagen („*Inter-batch*“) analysiert. Von den für jeden Typ von Qualitätskontrolle mehrfach bestimmten Analyt-Konzentrationen wird der Mittelwert berechnet. Dieser darf nach den Leitlinien der FDA und EMA für die Richtigkeit nicht stärker als 15 % von der nominellen Analyt-Konzentration abweichen (für das LLOQ sind maximal 20 % erlaubt). Für die Präzision ist die Höhe der relativen Standardabweichung v entscheidend. Dieser sollte 15 % (für LLOQ 20 %) nicht überschreiten [56; 57].

4.2.4.3 Linearität

Eine HPLC-ESI-MS/MS-Methode ist linear, wenn die Kalibrierkurve mit Hilfe einer linearen Funktion beschrieben werden kann. Diese (Kalibrier-)Funktion ist definiert als das einfachste Modell, mit welchem die Beziehung zwischen Messsignal und Analyt-Konzentration hinreichend beschrieben werden kann.

Für die meisten der im Zuge der Validierung durchgeführten Experimente wurden Kalibrierkurven benötigt. Diese wurden erstellt, indem sieben verschiedene Konzentrationen des synthetischen Analyten CAAP48_{syn} sowie eine Konzentration (1,25 ng/μl) des internen Standards CAAP48-3xV in einem Lösungsmittelgemisch gelöst, dann mit Rattenplasma gemischt und im Anschluss mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert wurden. Die Auswahl der Analyt-Konzentrationen erfolgte so, dass der vermutliche Konzentrationsbereich des CAAP48_{endo} in humanen Blutproben möglichst vollständig und vor allem gleichmäßig abgedeckt wurde.

Die Linearität einer Kalibrierung wurde als gegeben angesehen, wenn die experimentell bestimmten Analyt-Konzentrationen im Annahmehbereich lagen. Nach der aktuellen Leitlinie der FDA gelten für den Annahmehbereich für Kalibranten die nachfolgend beschriebenen Grenzen: Die Übereinstimmung der experimentell bestimmten mit der nominellen Analyt-Konzentration (Richtigkeit) darf 85 % nicht unter- und 115 % nicht überschreiten. Die einzige Ausnahme hiervon gilt für den Kalibranten mit der niedrigsten Analyt-Konzentration (LLOQ). Für diesen muss die Richtigkeit Werte zwischen 80 % und 120 % der nominellen Konzentration annehmen. Darüber hinaus soll eine Kalibrierung nur dann verwendet werden, wenn mindestens vier von sechs Kalibranten die beschriebenen Kriterien

erfüllen. Außerdem müssen die Kalibranten mit der höchsten und geringsten Analyt-Konzentration (ULOQ und LLOQ) im Annahmehereich liegen [56].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Verwendung der Analysendaten ausschließlich dann, wenn die entsprechende Kalibrierung die obigen Kriterien erfüllte. Falls nicht, wurde das gesamte Experiment wiederholt.

4.2.4.4 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode wird durch das „*Lower Limit of Quantification*“ (LLOQ) beschrieben. Das LLOQ ist die niedrigste Analyt-Konzentration, die in einer Probe zuverlässig und mit akzeptabler Richtigkeit und Präzision bestimmt (quantifiziert) werden kann [57]. Durch das LLOQ wird die untere Grenze des Quantifizierungsbereichs festgelegt (LLOQ = Kalibrant mit der niedrigsten Analyt-Konzentration).

Das Gegenstück zum LLOQ ist das „*Upper Limit of Quantification*“, welches die obere Grenze des Quantifizierungsbereichs festlegt. Da das ULOQ durch adäquate Verdünnung von Proben mit einer höheren Analyt-Konzentration umgangen werden kann, hat es für die Validierung einer Methode eine wesentlich geringere Bedeutung als das LLOQ. Sollte die Verdünnung von Proben jedoch notwendig sein, muss die Verdünnungslinearität nachgewiesen werden. Da für die Quantifizierung von CAAP48_{endo} in humanen Blutplasmaproben jedoch keine Verdünnung erforderlich war, wird auf eine eingehende Betrachtung der Verdünnungslinearität an dieser Stelle verzichtet.

Die Ermittlung des LLOQ erfolgte unter Anwendung der in den Leitlinien von EMA und FDA angegebenen Kriterien. Als oberstes Kriterium fungierte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N). Dieses wurde berechnet, indem für jede Probe die auf den internen Standard normalisierte Signalintensität des „*Quantifier*“ MRM-Übergangs für CAAP48_{syn} durch die Signalintensität in einem Blank dividiert wurde. Das entsprechende Signal-zu-Rausch-Verhältnis sollte mindestens den Wert 5 aufweisen. Darüber hinaus sehen die Leitlinien sowohl eine Beurteilung der Präzision als auch der Richtigkeit vor. Im Sinne der Präzision sollte die relative Standardabweichung ν für die Proben einer Konzentrationsserie 20 % nicht überschreiten. Für den Nachweis der Richtigkeit darf jeder Einzelwert nicht mehr als ± 20 % von der nominellen Konzentration abweichen.

4.2.4.5 Verschleppungen

Die Bezeichnung Verschleppung bezieht sich auf die Übertragung von Analyt und/oder internem Standard von einer Messung auf die sich unmittelbar anschließende. Ursache ist eine (zu) hohe Konzentration des Analyten oder seltener des internen Standards, wodurch die Bindekapazität der stationären Phase der Chromatographiesäule erschöpft wird. Auch der teilweise Verbleib von Analyt im Injektions-Port oder in den verwendeten Kapillaren ist grundsätzlich möglich. Infolgedessen wird der gebundene Analyt während der Elution des aktuellen Analysenlaufs nicht vollständig freigesetzt. Die Elution des auf der

Chromatographiesäule verbliebenen Analyten erfolgt schließlich bei der sich anschließenden Messung, wodurch deren Analyseergebnisse verfälscht werden.

Da die von der FDA herausgegebene Leitlinie zur Methodvalidierung keine Angaben zur Verschleppung enthält, orientierte sich die Bestimmung und Beurteilung in der vorliegenden Arbeit an der von der EMA veröffentlichten Leitlinie [57]. Diese legt nicht nur Grenzwerte für die Verschleppung von Analyt und internem Standard fest, sondern enthält auch detaillierte Angaben zum Vorgehen für deren Bestimmung.

Die Leitlinie der EMA gibt vor, dass die Verschleppung des Analyten auf das LLOQ bezogen werden muss und gibt dafür eine Grenze von maximal 20 % für die nachfolgende Probe vor. Für den internen Standard gilt hingegen eine andere Grenze, da dieser in nur einer Konzentration eingesetzt wird. Demnach darf die Verschleppung des internen Standards in der darauffolgenden Probe nicht mehr als 5 % betragen.

4.2.4.6 Extraktionseffizienz und Matrixeffekt

Sowohl die Extraktionseffizienz als auch der Matrixeffekt sind Kernparameter einer analytischen Methode. Ihre Definition, das Vorgehen zu ihrer Bestimmung sowie der Zusammenhang zwischen Extraktionseffizienz und Matrixeffekt werden seit Jahren zum Teil kontrovers diskutiert. Insbesondere für den Matrixeffekt existieren daher unterschiedliche Definitionen und vor allem verschiedene Vorgehensweisen zur Bestimmung.

Bereits im Jahre 1993 beschrieben Tang *et al.*, dass die Intensität eines mittels Elektrospray-Ionisation erzeugten Molekül-Ions durch die Konzentration anderer Molekül-Ionen beeinflusst werden kann [69]. Als Matrixeffekt wird daher jeder Prozess bezeichnet, der die Ionisierungseffizienz der Zielverbindung verändert und in der Flüssig- oder Gasphase auftritt. Man unterscheidet Ionenunterdrückung („*Ion Suppression*“) und Ionenverstärkung („*Ion Enhancement*“), wengleich letzteres nur selten beobachtet wird.

Die Ursachen des Matrixeffekts sind bis heute nicht vollständig bekannt. Man vermutet, dass eine Interaktion zwischen Zielverbindung und einer co-eluierenden aber nicht nachweisbaren Matrixverbindung stattfindet, welche die Ionisierungseffizienz der Zielverbindung verändert [70; 71]. Dadurch wird u. a. der Zugang der Zielverbindung zur Ladung, deren Fähigkeit in der Flüssig- oder Gasphase geladen zu bleiben sowie der Zugang zur Tröpfchenoberfläche während der Elektrospray-Ionisation beeinflusst. Man unterscheidet endogene (z.B. Kohlenhydrate, Salze, Phospholipide, Proteine wie z.B. Albumin, etc.) und exogene (z.B. Polymersubstanzen wie Phthalate, Puffersubstanzen oder Ionenpaarbildner, z.B. TFA) Matrixverbindungen [50]. Huang *et al.* bezeichnen den Matrixeffekt als wichtigstes Problem von LC-MS/MS-Methoden, da sich dieser negativ auf Richtigkeit, Präzision sowie Empfindlichkeit auswirken kann [72].

Um den Matrixeffekt einschätzen zu können, ist die Bestimmung des Ausmaßes der Ionenunterdrückung oder -verstärkung für Analyt und gegebenenfalls auch für den internen

Standard notwendig. Hierfür werden in der Literatur meist zwei Verfahren angeführt: „*Post-column Infusion*“ und „*Post-extraction Addition*“.

Die „*Post-column Infusion*“ ermöglicht die Bestimmung des Retentionszeitbereichs, innerhalb dessen eine Ionenunterdrückung oder -verstärkung auftritt. Dies eröffnet zumindest theoretisch die Möglichkeit, durch einen veränderten Gradienten die Zielverbindung aus dem betroffenen Retentionszeitbereich herauszunehmen. Allerdings erlaubt die „*Post-column Infusion*“ keine quantitative Einschätzung des Matrixeffekts, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurde [71].

Die „*Post-extraction Addition*“ ermöglicht die quantitative Einschätzung des Matrixeffekts. Dazu vergleicht man die Signalfläche für eine definierte Menge der Zielverbindung in dem zur Elution genutzten Lösungsmittelgemisch mit der Signalfläche der gleichen Menge in einem Eluat/Extrakt eines Doubleblanks. Die zweite Probe wird also mittels Festphasenextraktion gereinigt, die Zugabe der Zielverbindung erfolgt allerdings erst im Anschluss. So soll verhindert werden, dass das Ergebnis für den Matrixeffekt durch die Extraktionseffizienz der Probenaufarbeitung beeinflusst wird. Durch den Vergleich der Signalflächen wird ein Wert erhalten, der als Matrixfaktor bezeichnet wird [57; 70; 71].

Die Extraktionseffizienz („*Extraction Recovery*“) wird im deutschen Sprachraum häufig als Wiederfindungsrate bezeichnet. Sie ist ein Maß für den Anteil einer Verbindung, der nach der Probenvorbereitung (Extraktion) noch bestimmt werden kann. Daher wird sie im übertragenen Sinne auch als Ausbeute der Probenvorbereitung bezeichnet. Sie kann sowohl für den Analyten als auch den internen Standard ermittelt werden.

Die Bestimmung erfolgt durch Vergleich der Signalfläche einer definierten Menge der Zielverbindung, die zur biologischen Matrix hinzugegeben und aus dieser extrahiert wird, mit der Signalfläche der gleichen Menge der Zielverbindung, die zum Eluat eines Doubleblanks hinzugefügt wird. Die für die Analyse genutzte Matrix (Eluate der Extraktion einer biologischen Probe) ist in beiden Fällen gleich. Allerdings wird die Zielverbindung nur im ersten Fall extrahiert, während im zweiten Fall lediglich die Zugabe zum Eluat der Extraktion erfolgt. Unterschiede der in den Eluaten bestimmten Konzentration der Zielverbindung können daher unmittelbar auf den Einfluss der Extraktion zurückgeführt werden [56; 72].

4.2.4.7 Stabilität

Im Fokus der Stabilitätsuntersuchungen stand die Frage, ob die Aufbewahrungs- und Lagerzeiten von Stocklösungen der Standardpeptide, von biologischen Proben und von Eluaten einen Einfluss auf die Konzentration des enthaltenen synthetischen oder endogenen Analyten sowie des internen Standards hatten? Um diese Frage beantworten zu können, muss zunächst geklärt werden, welche Arten von Stabilität die Leitlinien von FDA und EMA definieren und für welche Probenarten sie in der vorliegenden Arbeit relevant sind (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7 – Relevanz der Stabilitätsarten für die verschiedenen Probenarten

Probenart	Art der Stabilität			
	Einfrier-/ Auftau-	Lager-	Proben- aufarbeitung	Proben- geber
Stocklösungen Standardpeptide	Ja	Ja	Nein	Nein
Blutplasmaproben	Nein	Ja	Nein	Nein
Eluate	Nein	Nein	Nein	Ja

Die Stocklösungen der Standardpeptide wurden hergestellt, indem eine entsprechende Menge Festsubstanz eingewogen, gelöst, aliquotiert und unmittelbar im Anschluss eingefroren wurde. Für die Verwendung in der Probenvorbereitung wurden die Aliquots der Stocklösungen aufgetaut und genutzt. Ein nochmaliges Einfrieren oder Auftauen erfolgte nicht, weshalb die Stabilitätsuntersuchung auf einen Einfrier- und Auftauzyklus sowie die Lagerung beschränkt werden konnte. Diese Arbeiten erfolgten im Zusammenhang mit der Charakterisierung der Standardpeptide.

Da der erste Schritt der Probenvorbereitung in der Zugabe von internem Standard und Denaturierungsmittel bestand, wurde die Stabilität der Probenlösungen in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Durch die Gegenwart des internen Standards sollten etwaige Instabilitäten bei der Quantifizierung des Analyten irrelevant sein. Außerdem dürften durch die Anwesenheit des Denaturierungsmittels jegliche Vorgänge (z.B. unspezifische Adsorption, Abbauprozesse), die eine Instabilität verursachen, minimiert werden.

Umfangreiche Voruntersuchungen zur Bestimmung der Lagerstabilität der Blutplasmaproben wurden nicht durchgeführt. Stattdessen wurde die Konzentration von CAAP48_{endo} in den humanen Blutplasmaproben durch mehrfache Analyse über einen größeren Zeitraum ermittelt. Der Vergleich der zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelten Analyt-Konzentrationen ermöglichte Aussagen über die Stabilität.

Stabilität im Probengeber – Ziel der Untersuchung war es herauszufinden, ob während der Aufbewahrung der Eluate im Probengeber Prozesse ablaufen, die zu einer Beeinträchtigung der Quantifizierungsergebnisse für CAAP48 führen. Dabei ist nicht die Verringerung der Intensität oder der Fläche der MRM-Signale entscheidend, sondern jegliche Veränderungen die sich auf die „Area Ratio“ auswirkt. Letzteres würden darauf hindeuten, dass entweder der Analyt oder der interne Standard einseitig von einer Lagerinstabilität betroffen ist. Eine solche Instabilität hätte unmittelbare Folgen für die Ergebnisse einer Quantifizierung.

Lösungen von Analyt und/oder internem Standard gelten nach den Leitlinien von FDA und EMA als stabil, wenn der für die mehrfache Analyse einer Probe über einen bestimmten Zeitraum berechnete relative Standardabweichung 15 % (bzw. 20 % für LLOQ) nicht überschreitet.

4.3 Klinische Studie

Mit Hilfe der klinischen Studie sollten Blutplasmaproben insbesondere von Sepsispatienten gesammelt werden, um damit zunächst die grundsätzliche Eignung des entwickelten Verfahrens zur Quantifizierung sowohl von CAAP48 als auch der Proteoform CAAP47 nachweisen zu können. Mit dem Ziel erste Aussagen über die Eignung von CAAP47/CAAP48 als Biomarker für Sepsis zu ermöglichen, sollten die ermittelten Konzentrationswerte für CAAP47/CAAP48 schließlich mit klinischen Parametern und Scores korreliert werden.

4.3.1 Ethikantrag

Grundlage für die Entnahme von Blutproben und die Erhebung von Patientendaten war der von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock bewilligte Ethikantrag mit dem Titel „Diagnostikstudie zur Etablierung eines neuen Biomarkers (CAAP48) für die Frühdiagnose der Sepsis“ (Antragsnummer A 2016-0158). Die Struktur und der Inhalt des Ethikantrags wurden in enger Abstimmung mit dem verantwortlichen Leiter der klinischen Studie, Privatdozent Dr. med. habil. Martin Sauer, Facharzt für Anästhesiologie und Notfallmedizin/Intensivmedizin der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsmedizin Rostock, erarbeitet.

Vor Studieneinschluss mussten die Patienten bzw. ihre rechtlichen Vertreter schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie sowie zur Erfassung, anonymisierten Speicherung und Auswertung von klinischen Daten und Patientenproben sowie die Einsichtnahme durch Dritte erklären. Dazu wurden die Patienten bzw. ihre rechtlichen Vertreter durch einen Studienarzt über die im Rahmen der Studie durchgeführte Diagnostik sowie die damit verbundenen potentiellen Risiken und Nutzen in einem persönlichen Gespräch aufgeklärt und ein Aufklärungsbogen ausgehändigt. Erst nach Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung wurden die Patienten in die Studie aufgenommen.

Für die vorzeitige Beendigung der Studie insgesamt oder für einen einzelnen Patienten wurden die nachfolgenden Kriterien festgelegt:

1. Widerruf der Patienteneinwilligung bzw. der Einwilligung des rechtlichen Vertreters,
2. nachträgliche Feststellung, dass Einschlusskriterien nicht erfüllt bzw. Ausschlusskriterien erfüllt waren,
3. Auftreten nicht tolerierbarer unerwünschter Ereignisse, die eindeutig auf die Studienbehandlung zurückgeführt werden können.

Alle Schritte der Aufnahme und Auswertung der Patientendaten erfolgten unter Nutzung einer Studien-internen Nummerierung, die keine Rückschlüsse auf die Identität der entsprechenden Patienten zuließ. Im Rahmen der Studie erfolgte weder eine Vergütung der beteiligten Prüfarzte noch bestanden unmittelbare oder während der Studiendauer wirksam werdende wirtschaftliche Interessen der Studienleitung in Zusammenhang mit dem Forschungsvorhaben. Eine Honorierung oder Entschädigung von Patienten erfolgte nicht.

4.3.2 Studiendesign

Bei der klinischen Studie handelte es sich um eine prospektive, monozentrische Diagnostikstudie der Universitätsmedizin Rostock, die weder den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes (AMG) noch des Medizinproduktegesetzes (MPG) unterlag. Die maximale Zahl an Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis, septischen Schock und nicht-infektiösem SIRS, die in die Studie eingeschlossen werden sollten, war auf 20 begrenzt.

4.3.3 Patientenauswahl

In die klinische Studie wurden chirurgische und nicht-chirurgische Patienten eingeschlossen, die stationär im Perioperativen Intensivtherapiezentrum (PIT) 1 der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsmedizin Rostock behandelt wurden. Die Rekrutierung der Patienten beruhte auf den in Tabelle 8 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien.

Tabelle 8 – Einschluss- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	▪ Mann oder Frau
	▪ Mindestalter 18 Jahre
	▪ Vorliegen einer/eines Sepsis, schweren Sepsis, septischen Schocks, SIRS
	▪ Sepsis-/SIRS-Beginn ≤ 36 h
	▪ Einwilligung durch Patient oder gesetzlichen Vertreter
Ausschlusskriterien	▪ Teilnahme an einer klinischen Studie innerhalb der letzten 30 Tage
	▪ Teilnahme an dieser Studie zu einem früheren Zeitpunkt
	▪ Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung
	▪ Schwangerschaft
	▪ Länger als 12 h andauernde Schocksymptomatik mit systolischem Blutdruck < 90 mm Hg ¹⁶
	▪ Nicht beherrschbare Blutungen ¹⁷
	▪ Positiver HIV-Test
	▪ Aktive Hepatitis C

¹⁶ Trotz therapeutischer Maßnahmen nach den Bewertungskriterien des Bundesverbands Managed Care e. V. (BMC).

¹⁷ Klinisch mehr als zwei Erythrozytenkonzentratlösungen täglich.

Das für die Patientenauswahl notwendige Screening sowie der finale Einschluss oblagen bei Erfüllung der entsprechenden Kriterien ausschließlich einem Studienarzt. Patienten die für die Studie ausgewählt wurden, litten zum Zeitpunkt des Einschlusses entweder an Sepsis, schwerer Sepsis, septischen Schock oder nicht-infektiösem SIRS, definiert nach den Leitlinien von „Sepsis-2“.

4.3.4 Klinische Parameter und Scores

Die Erhebung der klinischen Parameter diente vorrangig der Einteilung der in die klinische Studie eingeschlossenen Patienten in drei verschiedene Patientengruppen: Sepsis, SIRS und ITS-Kontrolle. Wobei SIRS hier und in allen folgenden Abschnitten stellvertretend für nicht-infektiöses SIRS verwendet wird. Die Einteilung in die Gruppe der Sepsis- und SIRS-Patienten erfolgte anhand von Diagnosekriterien, die (orientiert an „Sepsis-2“) in der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e. V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin beschrieben werden [73]. Bei der ITS-Kontrolle handelte es sich um eine Gruppe von stationär auf der PIT1 aufgenommenen Patienten, die weder an Sepsis noch an SIRS erkrankt waren. Des Weiteren wurden die erhobenen klinischen Parameter für die Berechnung des „Sepsis-related Organ Failure Assessment Scores“ genutzt. Für die Erhebung der klinischen Parameter war der Tag der Blutentnahme entscheidend. Bei kontinuierlich (also im Rhythmus von einer Stunde) bestimmten Parametern wurde jeweils der am stärksten vom jeweiligen Normalbereich abweichende Werte verwendet.

Die zur Einteilung der Probanden der klinischen Studie in die Gruppe der Sepsis- und SIRS-Patienten genutzten Diagnosekriterien sind in Tabelle 9 zusammengefasst (verändert nach [12]).

Tabelle 9 – Diagnosekriterien für SIRS- und Sepsispatienten

Diagnosekriterien			Grenzwerte	
I	Infektionsnachweis (klinisch und/oder mikrobiologisch)		-	
II	SIRS	Temperatur (°C)	≤36 oder ≥38	
		Herzfrequenz (1/min)	≥90	
		Atmung	Atemfrequenz (1/min) oder	≥20
			Partialdruck CO ₂ (kPa)	≤4,3
		Leukozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	<40 oder >12	
Mindestens zwei Kriterien müssen zutreffen				

Tabelle 9 – Diagnosekriterien für SIRS- und Sepsispatienten (Fortsetzung)

Diagnosekriterien			Grenzwerte	
III	Akute Organdysfunktion	Akute Enzephalopathie	Punktzahl „Glasgow Coma Scale“	≤8
		Hämatologische Dysfunktion	Thrombozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	≤100
		Arterielle Hypoxämie	Partialdruck O ₂ (kPa) oder	≤10 oder
			Oxygenierungsindex ¹⁸	≤300
		Renale Dysfunktion	Kreatininkonzentration im Serum (μmol/l)	>208
		Metabolische Azidose	pH-Wert oder	<7,3
			Basenüberschuss (mmol/l) oder	≤-5
Laktatkonzentration im Plasma (mmol/l)	>2,4			
Mindestens ein Kriterium muss zutreffen				
IV	Schock	Kardiovaskuläre Dysfunktion und/oder	Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)	≤65 für ≥1 h ¹⁹
		Applikation von Vasopressoren ²⁰	Dopamin/Dobutamin (μg/kg · min)	>0
			Adrenalin/Noradrenalin (μg/kg · min)	>0
		Mindestens ein Kriterium muss zutreffen		

Unter Verwendung der in Tabelle 9 aufgeführten Diagnosekriterien können Patienten in die verschiedenen Stadien einer Sepsis eingeteilt werden. Demgemäß handelt es sich bei Sepsis um ein SIRS als Antwort auf eine dokumentierte Infektion (Diagnosekriterien I und II), während eine schwere Sepsis zusätzlich die Dysfunktion eines oder mehrerer Organe umfasst (Diagnosekriterien I, II und III). Der septische Schock ist wiederum als Hypotension (mit Zeichen der Hypoperfusion) bei schwerer Sepsis definiert, die trotz adäquater Volumentherapie andauert. Es besteht die Notwendigkeit der Applikation von Vasopressoren (Diagnosekriterien I, II, III und IV). Damit ein (nicht-infektiöses) SIRS diagnostiziert werden kann, müssen die Diagnosekriterien II erfüllt sein und es darf keine Infektion bestehen.

Für die Einteilung von Patienten in die einzelnen Stadien einer Sepsis wird neben den in Tabelle 9 genannten klinischen Parametern und Indices auch der „Glasgow Coma Scale“ benötigt [74]. Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes Scoring-System, mit dessen Hilfe der Grad einer Bewusstseinsstörung bei einem Patienten bestimmt werden kann. Dazu werden mit Hilfe einer Matrix drei verschiedene Verhaltenselemente (motorisch, verbal und Augenbewegung) als Reaktion auf Anruf sowie Schmerzreiz untersucht und mit Punkten

¹⁸ Berechnet aus p_aO₂/F_iO₂. Nur für beatmete Patienten.

¹⁹ Trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr und adäquatem intravaskulärem Volumenstatus.

²⁰ Ziel der Applikation von Vasopressoren ist ein mittlerer arterieller Blutdruck von ≥65 mmHg.

bewertet. Maximal können 15 Punkte (keine Bewusstseinsstörung) und minimal 3 (tiefes Koma oder Tod) erreicht werden [75].

Auf Basis der erhobenen klinischen Parameter wurde der „*Sepsis-related Organ Failure Assessment Score*“ (SOFA) berechnet, welcher eine quantitative Einschätzung der Fehlfunktion eines oder mehrerer Organe im Verlauf der Behandlung auf einer Intensivstation erlaubt. Der SOFA hat sich in den vergangenen Jahren zum wichtigsten Score für die Einschätzung des Schweregrades einer Sepsis entwickelt. Im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit war ein Abgleich der für die Studienpatienten ermittelten SOFA-Werte mit den Quantifizierungsergebnissen für CAAP47/CAAP48 daher von großem Interesse.

Im Mittelpunkt der Bestimmung des SOFA stehen insgesamt sechs klinische Parameter (Oxygenierungsindex, Thrombozytenzahl, Konzentration Serumbilirubin, mittlerer arterieller Blutdruck bzw. Applikation von Vasopressoren, „*Glasgow Coma Scale*“, Konzentration Kreatinin oder alternativ Urinmenge), anhand derer die Funktion bzw. Dysfunktion verschiedener Organsysteme (Atmung, Gerinnung, Leber, Herz-Kreislauf-System, Nervensystem, Nieren) eingeschätzt werden kann. Für die Bestimmung des SOFA wird eine Matrix eingesetzt, die für bestimmte Wertebereiche der klinischen Parameter eine entsprechende Punktzahl vergibt. Als Letztes werden die für jedes Organsystem vergebenen Punkte zusammengezählt (maximal 24). Je höher der Score, desto schwerer der Verlauf der Sepsis und umso schlechter die Prognose des Patienten [76].

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung Peptidstandards

5.1.1 Elementaranalyse

Die für die Quantifizierung von CAAP48 notwendigen Peptidstandards lagen nach ihrer Reinigung mittels RP-HPLC als TFA-Salze vor. Für die Herstellung der Peptid-Stocklösungen war es daher notwendig, den exakten Anteil der Peptide an der Trockenmasse des gefriergetrockneten Peptidpulvers zu bestimmen. Dies erfolgte mit Hilfe einer Elementaranalyse, bei der die Gewichtsprozentage der im Feststoff der Standardpeptide vorhandenen Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff, Schwefel und Fluor bestimmt wurden (siehe Abschnitt 7.2).

Zur Auswertung der Ergebnisse der Elementaranalyse wurden zunächst die theoretischen Gewichtsprozentage der einzelnen Elemente der Peptide berechnet. Die Berechnungen gründeten auf der Annahme, dass in der Salzform an jede basische funktionelle Gruppe der Peptide ein TFA-Molekül gebunden hat. Da CAAP48 und die zugehörigen internen Standardpeptide jeweils über insgesamt sechs basische funktionelle Gruppen verfügen (fünf Lysin-Reste mit einer ϵ -Aminogruppe sowie eine freie Aminogruppe am N-Terminus), können demnach theoretisch sechs TFA-Moleküle an ein Peptidmolekül binden.

Die experimentell bestimmten Gewichtsprozentage der einzelnen Elemente für synthetisches CAAP48 stimmten bis auf geringe Abweichungen mit den theoretisch vorhergesagten Werten überein (Tabelle 10). Die Ergebnisse der Elementaranalyse bestätigen demzufolge die theoretischen Überlegungen. Da auch das für Wasserstoff ermittelte Gewichtsprozent keine Abweichungen vom theoretisch berechneten Wert aufwies, besaß das gefriergetrocknete Peptidpulver nur einen geringen Wassergehalt.

Tabelle 10 – Elementaranalyse von CAAP48_{syn}

Element		C	H	D	N	O	S	F
Anzahl Atome		235	362	0	52	70	3	18
Atommasse, gesamt (g/mol)		2822,5	364,9	0	728,4	1120,0	96,2	342,0
Atommasse, relativ (%)	Theoretisch ²¹	51,6	6,7	0	13,3	20,5	1,8	6,3
	Experimentell	49,5	6,7	N.b.	12,7	N.b.	1,6	6,2
	Abweichung	-4,0	0	-	-4,7	-	-7,0	-0,2

Für den deuterierten Peptidstandard CAAP48-2xF(D₅) wurden im Vergleich mit CAAP48_{syn} äquivalente Ergebnisse erhalten (Tabelle 11).

²¹ Bezogen auf eine Molekülmasse von 5473,9 g/mol für das TFA-Salz von CAAP48.

Tabelle 11 – Elementaranalyse von CAAP48-2xF(D₅)

Element		C	H	D	N	O	S	F
Anzahl Atome		235	352	10	52	70	3	18
Atommasse, gesamt (g/mol)		2822,5	354,8	20,1	728,4	1120,0	96,2	342,0
Atommasse, relativ (%)	Theoretisch ²²	51,5	6,5	0,4	13,3	20,4	1,8	6,2
	Experimentell	50,0	6,7	N.b.	12,9	N.b.	1,6	6,5
	Abweichung	-2,8	4,2	-	-3,3	-	-7,1	4,2

Das durch die Elementaranalysen bestimmte stöchiometrische Verhältnis zwischen Peptid- und TFA-Molekülen betrug somit 1:6. Auf Grundlage des stöchiometrischen Verhältnisses konnte ein Umrechnungsfaktor von 1,14 berechnet werden. Demnach müssen 1,14 mg Peptidmaterial mit einem Lösungsmittel auf ein Volumen von 1,0 Milliliter aufgefüllt werden, damit eine Stocklösung mit einer Peptid-Konzentration von 1,0 mg/ml (entspricht 209 µM) entsteht.

Für CAAP48-3xV wurde keine Elementaranalyse durchgeführt, sondern lediglich die für synthetisches CAAP48 und CAAP48-2xF(D₅) erhaltenen Ergebnisse übertragen. Dementsprechend wurde bei den Einwaagen für die Herstellung von Stocklösungen des CAAP48-3xV der gleiche Umrechnungsfaktor verwendet.

5.1.2 MALDI-TOF(/TOF)-Analyse

Die MALDI-TOF-Analysen dienen zum einen dem Nachweis und der Identifizierung von Verunreinigungen und zum anderen der Kreuzvalidierung der Konzentrationen der Stocklösungen der einzelnen Standardpeptide. Anhand von MALDI-TOF(/TOF)-Massenspektren können mit hoher Empfindlichkeit Abbruchsequenzen der Peptid-Festphasensynthese nachgewiesen und teilweise auch identifiziert werden. Letzteres erfolgte auf Basis der intakten Masse der entsprechenden Molekül-Ionen sowie durch gezielte Fragmentierung etwaiger Abbruchsequenzen mittels CID (siehe Abschnitt 1.3.2.1).

Wie bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschrieben, erlaubt ein MALDI-TOF-Massenspektrum ohne Einsatz eines internen Standards nur begrenzte Aussagen über die quantitative Verteilung der in einer Probe vorhandenen Verbindungen. Daher konnte aus den nachfolgend ausgewerteten Massenspektren vor allem abgelesen werden, ob neben dem entsprechenden Standardpeptid noch andere Verbindungen vorhanden waren, aber nicht in welchem exakten Konzentrationsverhältnis sie zueinanderstanden. Zuverlässige quantitative Abschätzungen sind allenfalls dann möglich, wenn die Intensitäten der Massensignale ähnlich und die Ionisierungseigenschaften vergleichbar sind.

²² Bezogen auf eine Molekülmasse von 5483,9 g/mol für das TFA-Salz von CAAP48-2xF(D₅).

Ergebnisse

5.1.2.1 Nachweis von Verunreinigungen

Als Erstes wurde CAAP48_{syn} auf das Vorhandensein von Verunreinigungen untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein MALDI-TOF-Spektrum im Massenbereich von m/z 500-6000 Da aufgenommen (Abbildung 11).

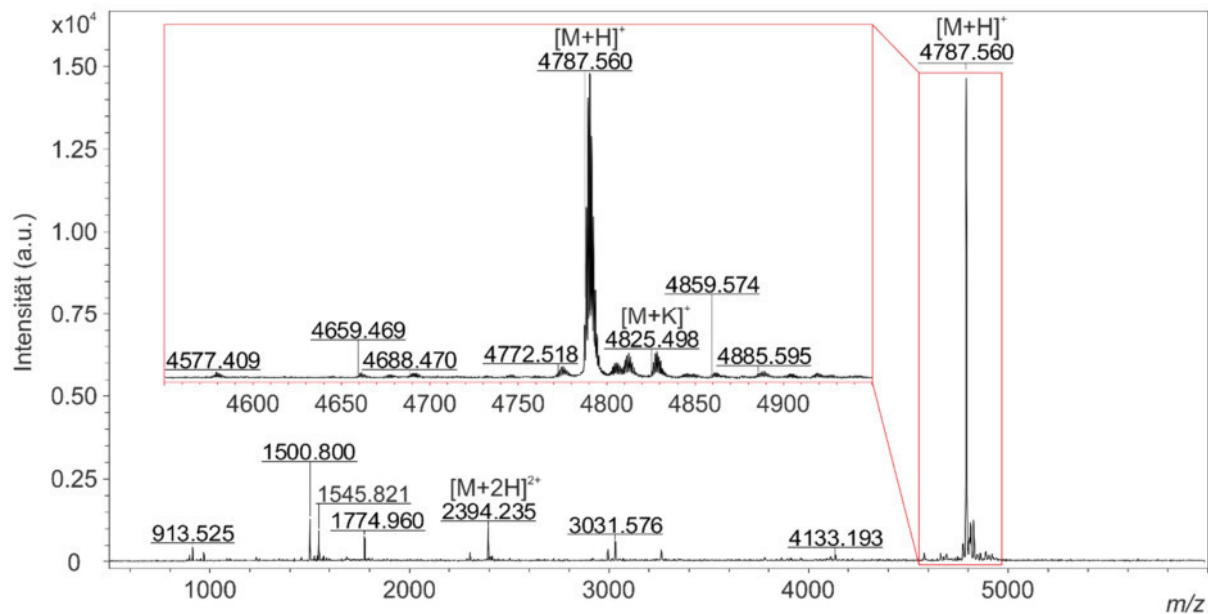


Abbildung 11: MALDI-TOF-Massenspektrum von CAAP48_{syn} („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).

In dem Massenspektrum ist bei m/z 4787,560 ein intensives Massensignal für das einfach geladene (intakte) Molekül-Ion von CAAP48_{syn} zu sehen. Darüber hinaus wurden Massensignale mit deutlich geringerer Intensität für das Natrium- ([M+Na]⁺) und das Kalium-Addukt ([M+K]⁺) von CAAP48_{syn} beobachtet. Ein weiteres Massensignal bei m/z 2394,235 konnte dem zweifach geladenen Molekül-Ion von CAAP48_{syn} zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden im gesamten Massenbereich weitere Signale beobachtet. Deren Anwesenheit ist ein deutlicher Hinweis, dass der Standard neben dem Zielpeptid noch Verbindungen enthielt, bei denen es sich vermutlich um Abbruchsequenzen der Festphasensynthese handelte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei der intensivsten Massensignale (m/z 1545,821 und m/z 1774,960) für eine MS/MS-Analyse ausgewählt. Mit Hilfe der erhaltenen Fragmentspektren konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Massensignale zu den einfach geladenen Molekül-Ionen zweier Peptide mit den Aminosäuresequenzen H₂N-SPLFMGKVVNPTQK-OH und H₂N-TKSPLFMGKVVNPTQK-OH gehören. Die beiden Sequenzen entsprechen den ersten 14 und 16 Aminosäureresten des C-Terminus von CAAP48. Da in der Peptid-Festphasensynthese die Zielverbindung vom C- zum N-Terminus synthetisiert wird, handelte es sich bei den identifizierten Peptiden also um frühe Abbruchsequenzen von CAAP48. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lassen sich auch alle weiteren Massensignale auf

Abbruchsequenzen der Festphasensynthese zurückführen. Der Standard enthielt also eine ganze Reihe weiterer Peptide, bei denen es sich um Nebenprodukte der Synthese handelte.

Als Nächstes erfolgte die Analyse von CAAP48-2xF(D₅), für das ebenfalls ein MALDI-TOF-Spektrum im Massenbereich von m/z 500-6000 Da aufgenommen wurde (Abbildung 12).

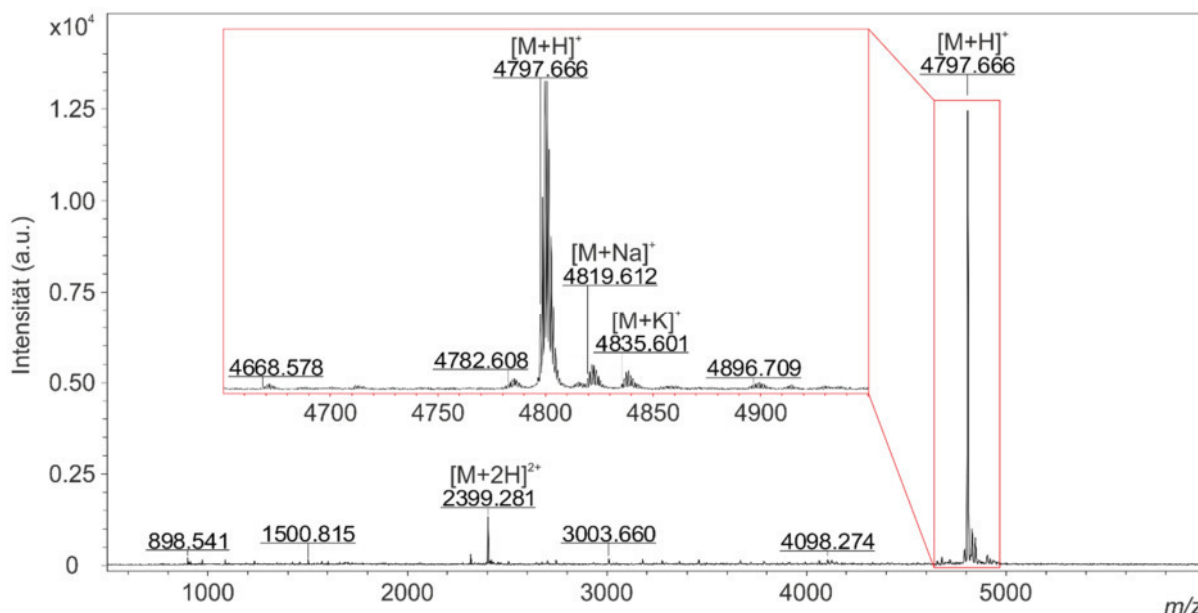


Abbildung 12: MALDI-TOF-Massenspektrum von CAAP48-2xF(D₅) („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).

Das intensivste Signal im Massenspektrum bei m/z 4797,666 konnte dem einfach geladenen (intakten) Molekül-Ion von CAAP48-2xF(D₅) zugeordnet werden, wobei überdies auch Signale mit deutlich geringerer Intensität für das Natrium- ([M+Na]⁺) und das Kalium-Addukt ([M+K]⁺) sowie für das zweifach geladene Molekül-Ion von CAAP48-2xF(D₅) beobachtet wurden. Darüber hinaus waren im Spektrum nur wenige weitere Signale zu sehen, die außerdem nur eine geringe Intensität aufwiesen. Demnach war die Anzahl an Verunreinigungen in Form von Abbruchsequenzen, die der Peptidstandard CAAP48-2xF(D₅) enthielt, nur gering.

Im letzten Schritt wurde ein MALDI-TOF-Spektrum im Massenbereich von m/z 500-6000 Da für CAAP48-3xV aufgenommen (Abbildung 13).

Ergebnisse

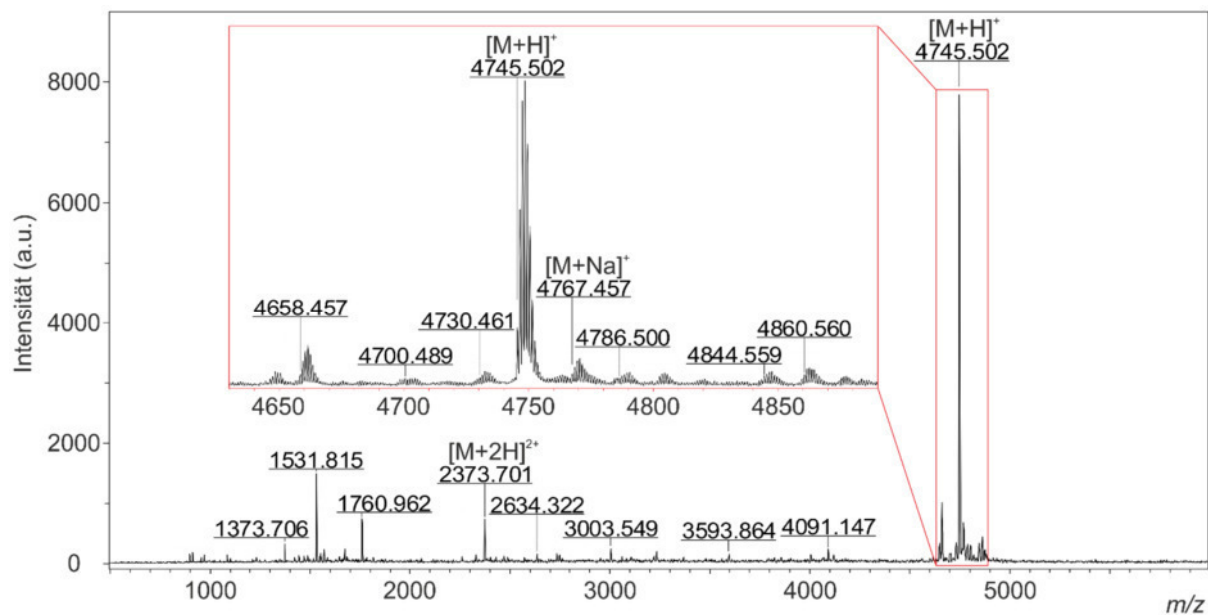


Abbildung 13: MALDI-TOF-Massenspektrum von CAAP48-3xV („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).

Das Signal mit der höchsten Signalintensität im Massenspektrum bei m/z 4745,502 konnte dem einfach geladenen (intakten) Molekül-Ion von CAAP48-3xV zugeordnet werden. Außerdem wurden Signale mit deutlich geringerer Intensität für das Natrium-Addukt ($[M+Na]^+$) und das zweifach geladene Molekül-Ion von CAAP48-3xV beobachtet. Darüber hinaus wurden im gesamten Massenbereich weitere Signale beobachtet, die auf die Gegenwart von Verunreinigungen der Festphasensynthese hinweisen. Analog zur Analyse der Verunreinigungen von CAAP48 erfolgte auch bei CAAP48-3xV die Auswahl der beiden intensivsten Massensignale (m/z 1531,815 und m/z 1760,962) für eine Fragmentierung der entsprechenden Molekül-Ionen mittels CID. Anhand der beiden MS/MS-Spektren konnten den Molekül-Ionen Peptide mit den Aminosäuresequenzen H_2N -SPVFMGKVVNPTQK-OH und H_2N -TKSPVFMGKVVNPTQK-OH zugeordnet werden. Die beiden Sequenzen entsprechen den ersten 14 und 16 Aminosäureresten des C-Terminus von CAAP48-3xV. Wie bei CAAP48 handelt es sich also auch bei CAAP48-3xV um frühe Abbruchsequenzen der Festphasensynthese.

Eine gemeinsame Betrachtung der aufgenommenen Massenspektren zeigt, dass die mit Abstand intensivsten Massensignale ausschließlich dem Molekül-Ion des jeweiligen Standardpeptids zugeordnet werden konnten. Der Hauptbestandteil der Standards sollte demnach in dem entsprechenden Standardpeptid bestanden haben. Darüber hinaus wiesen die Massensignale der Salz-Addukte nur eine geringe Intensität auf und eine Oxidation der in der Sequenz der Standardpeptide enthaltenen Methioninreste wurde überhaupt nicht beobachtet. Damit können für die angedachte Verwendung der Standardpeptide problematische Modifikationen oder Addukte weitgehend ausgeschlossen werden. Auch wurden keine Massensignale beobachtet, die mit den Signalen der einfach geladenen Molekül-Ionen der Standardpeptide überlagerten. Dies ist für den Einsatz letzterer als interne

Standards von besonderer Bedeutung. In Tabelle 12 sind die theoretischen sowie die experimentell bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse für jedes Standardpeptid übersichtsweise aufgeführt.

Tabelle 12 – Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Standardpeptide

Standard-peptide	<i>m/z</i> [M+H] ⁺		Abweichung	
	Theoretisch	Experimentell	Dalton	ppm
CAAP48	4787,574	4787,560	-0,014	-2,9
CAAP48-2xF(D ₅)	4797,637	4797,666	+0,029	+6,1
CAAP48-3xV	4745,527	4745,502	-0,025	-5,3

Der Vergleich der Masse-zu-Ladungsverhältnisse zeigt nur geringe Abweichungen von maximal 6,1 ppm. Die geringen Massenabweichungen sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Standardpeptide intakt waren. Damit sind die untersuchten Standardpeptide für den geplanten Einsatzbereich grundsätzlich verwendbar. Um quantitative Aussagen zur Reinheit zu ermöglichen, wurden die Standardpeptide im Anschluss an die MALDI-TOF-Messungen mittels RP-HPLC-UV analysiert (siehe Abschnitt 5.1.3).

5.1.2.2 Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen

Das grundsätzliche Ziel des Versuchs bestand darin, die Konzentrationen der Standardpeptide in den Stocklösungen so einzustellen, dass diese gleich sind. Dementsprechend sollte eine 1:1-Mischung der Stocklösungen verschiedener Standardpeptide zu Massensignalen mit der gleichen Intensität (MALDI-TOF-Massenspektrometrie) und UV-Signalen mit der gleichen Signalfläche (RP-HPLC-UV) führen. Die Versuche zur Kreuzvalidierung der Konzentrationen der Stocklösungen erfolgten daher während deren Herstellung. Dazu wurden die gefriergetrockneten Standardpeptide als Feststoff zunächst eingewogen und unter Berücksichtigung des Massenanteils der Trifluoressigsäure in einer Konzentration von 1,0 mg/ml in H₂O/TFA (1000/1; v/v) gelöst. Um die Konzentration zu überprüfen, wurden im Anschluss äquimolare Mischungen von zwei oder drei Standardpeptiden hergestellt und diese 20x auf dem Probenträger des MALDI-TOF-Massenspektrometers aufgetragen. In den daraufhin aufgenommenen Massenspektren wurden die Signalintensitäten der einfach geladenen Molekül-Ionen der Standardpeptide miteinander verglichen. Waren die Intensitäten ähnlich, wurden die Stocklösungen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Zeigten sich hingegen Unterschiede, erfolgte unter Berücksichtigung von deren Ausmaß entweder die Verdünnung der Stocklösung mit Lösungsmittel oder die Zugabe von Festsubstanz. Anschließend erfolgte wiederum die Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Als Referenz für den Vergleich der Intensitäten dienten dabei die Massensignale von CAAP48_{syn}.

Ergebnisse

Nachfolgend wird die Kreuzvalidierung der Konzentration von CAAP48-3xV beschrieben, dessen Stocklösung nach Abschluss des Versuch aliquotiert und eingefroren wurde. In Abbildung 14 ist beispielhaft ein MALDI-TOF-Massenspektrum einer äquimolaren Mischung von CAAP48_{syn}, CAAP48-2xF(D₅) und CAAP48-3xV dargestellt.

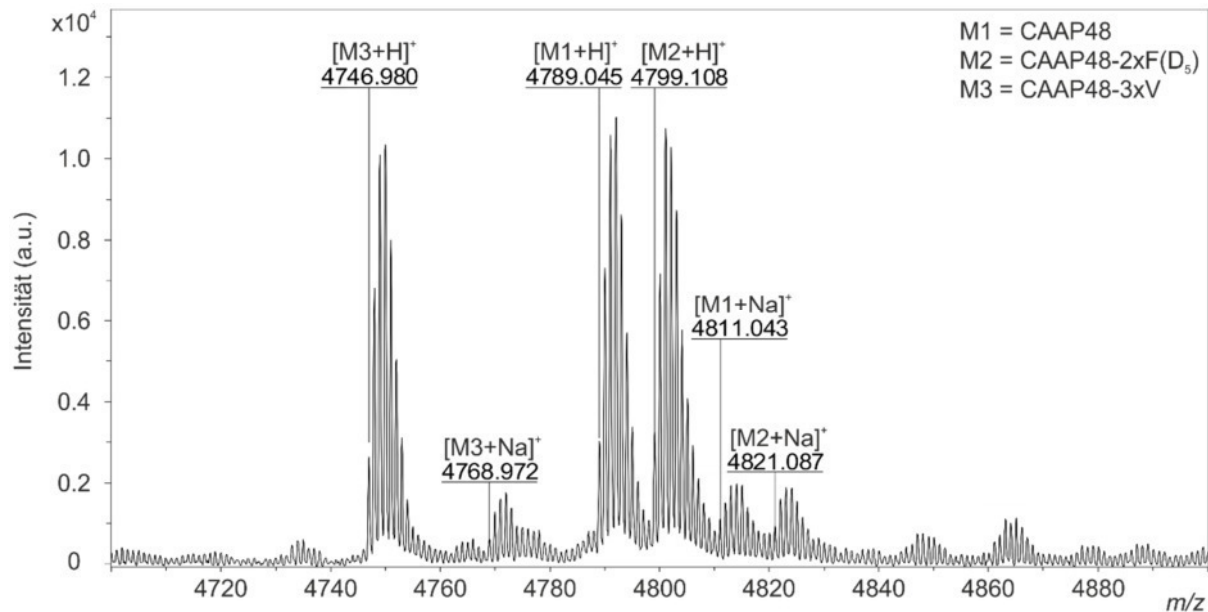


Abbildung 14: MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung mit jeweils 333 ng/ μ l der Standardpeptide CAAP48_{syn}, CAAP48-2xF(D₅) und CAAP48-3xV („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).

Neben den Massensignalen für die einfach geladenen Molekül-Ionen jedes Peptidstandards wurden darüber hinaus auch die Signale der jeweiligen Natrium-Addukte beobachtet, wobei deren Intensität deutlich geringer war. Die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der beobachteten Molekül-Ionen wiesen beträchtliche Abweichungen (>1 Da) von den theoretischen Werten auf. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass für diesen Versuch in Anbetracht der großen Anzahl an Proben sowie der Tatsache, dass lediglich Standardpeptide aufgetragen wurden, auf eine Kalibrierung verzichtet wurde.

An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, dass mit dem Versuch nicht die „richtige“ oder „korrekte“ Konzentration eingestellt werden konnte, sondern es wurde überprüft, wie ähnlich die Konzentrationen der Standardpeptide in den Stocklösungen sind. Dazu wurde in zwei Versuchen jeweils eine äquimolare Mischung (70 μ M) von CAAP48_{syn}, CAAP48-2xF(D₅) sowie CAAP48-3xV hergestellt und 20x auf die Probenplatte des Massenspektrometers aufgetragen. Die Ergebnisse der sich anschließenden MALDI-TOF-Analysen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13 – Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen

Statistische Kennwerte		Signalintensität [M+H] ⁺ (a.u.)			I _{CAAP4.8-2xF(D5)} / I _{CAAP48} (%)	I _{CAAP4.8-3xV} / I _{CAAP48} (%)
		CAAP48 _{syn}	CAAP48-2xF(D ₅)	CAAP48-3xV		
Versuch 1	N	20	20	20	-	-
	Min.	475	439	371	92,3	78,1
	Max.	2274	2166	2481	99,1	128,1
	\bar{x}	1369,3	1315,1	1391,4	96,0	99,1
	s	460,0	440,7	571,5	1,9	13,8
	v (%)	25,6	25,5	27,1	27,3	27,7
Versuch 2	N	20	20	20	-	-
	Min.	1807	1801	1846	91,2	85,2
	Max.	5328	5069	5557	99,7	114,7
	\bar{x}	3098,4	2956,25	3018,5	95,5	96,6
	s	859,75	812,65	964,04	2,1	8,3
	v (%)	24,4	24,9	26,0	25,2	28,2

Wie bereits erwähnt, diente die Signalintensität von CAAP48_{syn} als Referenz, weshalb die in Tabelle 13 aufgeführten mittleren Intensitätsverhältnisse auf CAAP48_{syn} bezogen sind. Ein mittleres Intensitätsverhältnis von 100 % verweist auf die gleiche Intensität der Massensignale und damit auf eine äquimolare Konzentration der Stocklösungen. Bei einem Intensitätsverhältnis von <100 % ist die Konzentration des internen Standards geringer und bei >100 % größer als die von CAAP48_{syn}. In beiden Versuchen wurden annähernd gleiche Signalintensitäten für alle drei Standardpeptide beobachtet, wobei tendenziell die Intensität und damit auch die Konzentration von CAAP48-2xF(D₅) sowie CAAP48-3xV geringfügig kleiner als die von CAAP48_{syn} war.

Die große Anzahl an Messungen pro Versuch ist im Hinblick auf die große Spannweite der Werte für die Intensitätsverhältnisse notwendig gewesen. So wurden im ersten Versuch für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV Intensitätsverhältnisse von immerhin 78,1 % bis 128,1 % erhalten. Die relative Standardabweichung wies daher in beiden Versuchen Werte von teilweise deutlich >25 % auf. Um große Schwankungen der Zielgröße ausgleichen zu können, müssen möglichst viele Messungen pro Probe durchgeführt werden. Daher wurde in allen folgenden Versuchen, in denen die MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Analysenverfahren zum Einsatz kam, jede Probe mehrfach (meist achtfach) aufgetragen und analysiert. Dies gilt auch für die Quantifizierung von CAAP48_{endo} in humanen Blutplasmen.

Der Vergleich der Signalintensitäten ermöglichte auch erste Rückschlüsse auf die Lagerstabilität der Standardpeptide. Während die Stocklösungen von CAAP48_{syn} und CAAP48-2xF(D₅) bereits etwa zwei Jahre bei -20 °C lagerten, wurde CAAP48-3xV für den Versuch „frisch“ eingewogen und gelöst. Wie die Ergebnisse der Kreuzvalidierung zeigten, gab es nur geringfügige Unterschiede zwischen den Konzentrationen der bereits zwei Jahre gelagerten Stocklösungen und der neu hergestellten. Dies deutet darauf hin, dass selbst eine mehrjährige Lagerzeit keinen oder einen nur sehr begrenzten Einfluss auf die Konzentration der Standardpeptide hat. Die Standardpeptide in den Stocklösungen sind demgemäß mit hoher Wahrscheinlichkeit bei -20 °C auch über einen längeren Zeitraum stabil.

5.1.3 RP-HPLC-UV-Analyse

Für jedes der drei verwendeten Standardpeptide wurden RP-HPLC-UV-Analysen durchgeführt. Diese dienten der Einschätzung der Reinheit, der Überprüfung der Verdünnungslinearität, der Kreuzvalidierung der Konzentrationen sowie der Untersuchung der Einfrier-/Auftau-Stabilität der bei -20 °C gelagerten Stocklösungen. Zu diesem Zweck wurden für verschiedene Konzentrationen der einzelnen Standardpeptide (100 ng/μl, 200 ng/μl, 400 ng/μl, 700 ng/μl, 1000 ng/μl) Chromatogramme aufgenommen, wobei für jedes Peptid und jede Konzentration an verschiedenen Analysentagen (Tag 1, 2 und 5) jeweils drei Analysen erfolgten. Zur Herstellung der verschiedenen Proben wurden sowohl für CAAP48 als auch CAAP48-2xF(D₅) Stocklösungen genutzt, die das in H₂O/TFA (1000/1; v/v) gelöste Standardpeptid in einer Konzentration von 1 μg/μl (209 μM) enthielten und bereits eine Lagerzeit von zwei Jahren bei -20 °C aufwiesen. Im Unterschied dazu wurde CAAP48-3xV am ersten Analysentag frisch eingewogen, in einer Konzentration von 1 μg/μl in H₂O/TFA (1000/1; v/v) gelöst und schließlich bei -20 °C eingefroren. Zuvor erfolgte jedoch eine Entnahme von Probenlösung für die RP-HPLC-UV-Analysen des ersten Versuchstages.

Prinzipiell waren die Standardpeptide der mittels RP-HPLC-UV analysierten Proben wesentlich höher konzentriert, als die in den sich anschließenden Versuchen für die MALDI-TOF- und HPLC-ESI-MS/MS-Analysen verwendeten. Allerdings sind Analysen mit vergleichbarer Empfindlichkeit mittels HPLC-UV nicht möglich. Um zumindest einen grundsätzlichen Eindruck der eingangs aufgeführten Parameter für die Standardpeptide zu erhalten, wurden die HPLC-Versuche daher in einem höheren Konzentrationsbereich durchgeführt.

5.1.3.1 Reinheitsanalyse

Zur Beurteilung der Reinheit jedes Standardpeptids wurden RP-HPLC-UV-Chromatogramme hinsichtlich Signalform und Signalfläche ausgewertet (Abbildung 15).

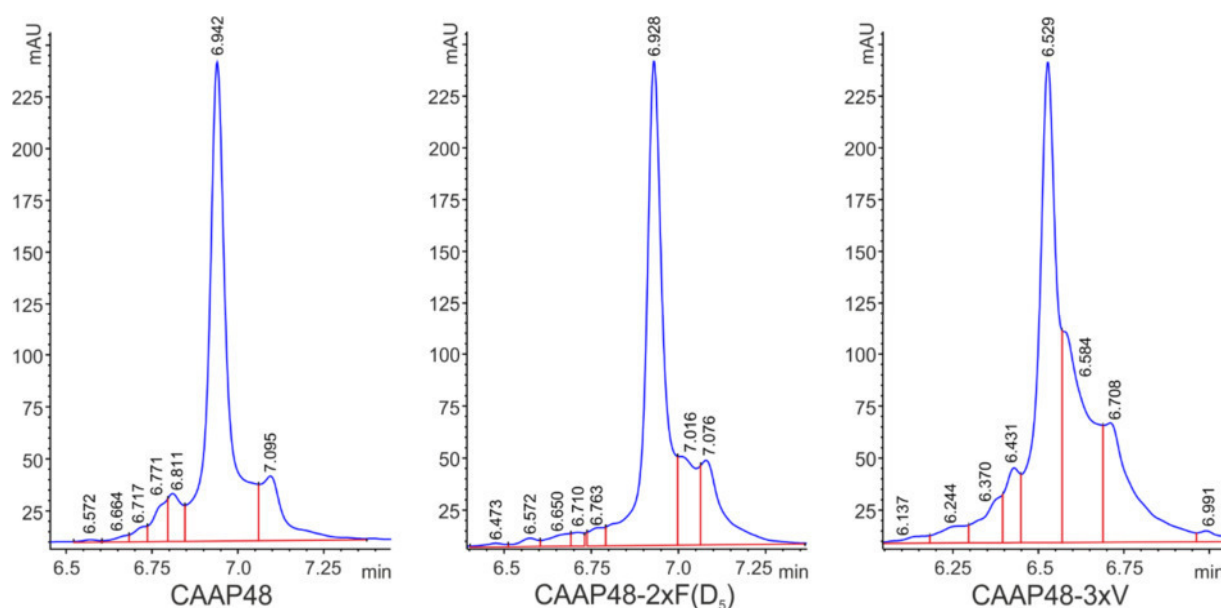


Abbildung 15: RP-HPLC-UV-Chromatogramme (aufgenommen bei 220 nm) von CAAP48, CAAP48-2xF(D₅) und CAAP48-3xV (jeweils 400 ng/μl). Die Grenzen der Integrationsbereiche sind rot dargestellt.

Die für die drei Standardpeptide aufgenommenen Chromatogramme zeigen jeweils ein diskretes Hauptsignal, an dessen Basis sich mehrere Signalschultern befinden. Diese entstehen, wenn die Auflösung für eine Basislinientrennung des Haupt- und der Nebensignale nicht ausreicht. Verursacht werden die Nebensignale vermutlich von Verbindungen mit einer ähnlichen Retentionszeit, aber einer (deutlich) geringeren Konzentration. Da in der MALDI-TOF-Analyse keine artifiziellen Modifikationen der Standardpeptide nachgewiesen werden konnten, kommen als Verunreinigungen insbesondere Abbruchsequenzen der Festphasensynthese in Betracht. Mögliche Kandidaten wurden in Abschnitt 5.1.2 benannt.

Die Ausbildung der Signalschultern war bei CAAP48 am geringsten und bei CAAP48-3xV am intensivsten. Die vermutlich höchste Reinheit wies demnach CAAP48 auf, während der Anteil der Abbruchsequenzen an der Gesamtmenge für CAAP48-3xV wahrscheinlich am größten war.

Für die quantitative Einschätzung der Reinheit der Standardpeptide wurden zunächst die Flächen der UV-Signale in den RP-HPLC-Chromatogrammen durch Integration bestimmt. Allerdings war die Integration im vorliegenden Fall problematisch, da in den Chromatogrammen neben dem jeweiligen Hauptsignal noch mehrere deutlich kleinere Nebensignale bzw. Signalschultern beobachtet wurden. Die Anwendung der „Drop“-Methode zur Integration der Flächen führt in diesem Fall meist dazu, dass selbst wenig intensiven UV-Signalen/Signalschultern eine im Vergleich mit dem Hauptsignal deutlich erhöhte Signalfäche zugemessen wird. Dabei gilt: Umso größer die Intensitätsunterschiede zwischen den Signalen, umso größer der Fehler bei der Integration. Dies lässt sich insbesondere darauf zurückführen,

Ergebnisse

dass das „Tailing“ des Hauptsignals in die Fläche des Nebensignals hineinreicht. Dadurch nimmt die Fläche des Nebensignals zu, während die Fläche des Hauptsignals abnimmt [77].

Die Integration der Signalflächen erfolgte für die drei Standardpeptide lediglich im Retentionszeitbereich von 6,0 bis 8,0 min, da außer den in Abbildung 15 dargestellten Signalen keine weiteren beobachtet wurden. Anhand von Formel 3 konnte im Anschluss die Reinheit der Standardpeptide bestimmt werden. Dabei wurde davon ausgegangen, dass der entsprechende Standard nur für die Ausbildung des Hauptsignals verantwortlich war.

$$\text{Reinheit (\%)} = \frac{\text{Signalfläche}_{\text{Hauptsignal}}}{\text{Signalfläche}_{\text{Hauptsignal}} + \text{Nebensignale}} \cdot 100 \quad (3)$$

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Integration beispielhaft für die mittlere (400 ng/μl) von insgesamt fünf untersuchten Konzentrationen der Standardpeptide aufgeführt. Die absoluten Signalflächen waren für die fünf untersuchten Konzentrationen zwar verschieden, die daraus berechneten Werte der Reinheit jedoch vergleichbar, weshalb nur die Ergebnisse einer Konzentration aufgeführt werden.

Tabelle 14 – Analyse der Reinheit der Standardpeptide

Standard-peptid	Analysen-tag	Signalfläche ²³ (mAU)		Reinheit (%)
		Hauptsignal	Nebensignale ²⁴	
CAAP48	1	883,3 ± 3,6	302,2 ± 1,0	74,5 ± 0,1
	2	872,3 ± 2,8	301,2 ± 5,1	74,3 ± 0,3
	5	885,0 ± 0,4	301,9 ± 2,0	74,6 ± 0,1
CAAP48-2xF(D ₅)	1	789,8 ± 3,8	406,9 ± 3,1	66,0 ± 0,3
	2	780,4 ± 7,1	405,8 ± 6,6	65,8 ± 0,6
	5	809,2 ± 6,4	413,9 ± 4,9	66,2 ± 0,4
CAAP48-3xV	1	771,3 ± 21,5	1060,1 ± 18,2	42,1 ± 1,1
	2	787,8 ± 11,3	1043,5 ± 9,5	43,0 ± 0,6
	5	785,1 ± 11,7	1065,3 ± 9,9	42,4 ± 0,6

Die Flächen der Hauptsignale aller Standardpeptide waren ähnlich groß, wobei CAAP48 die größten und CAAP48-3xV die kleinsten Flächen aufwies. Dieser bereits von der Beschreibung der Signalform bekannte Trend setzt sich auch bei den Werten der Reinheit fort. Mit 74,3-74,6 % zeigte CAAP48 die höchste Reinheit, während sie für CAAP48-3xV lediglich

²³ Bei den aufgeführten Werten handelt es sich um Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

²⁴ Gesamtheit der Flächen aller Nebensignale.

42,1-43,0 % betrug. Allerdings bleibt ungeklärt, ob es sich bei den Verbindungen, die für die Nebensignale verantwortlich waren, um Verunreinigungen in Form von Abbruchsequenzen gehandelt hat oder ob die Standardpeptide selbst (z. B. durch Sekundärstrukturelemente) für die Ausbildung der Signalschultern verantwortlich waren.

5.1.3.2 Einfrier-/Auftau- und Kurzzeitlagerstabilität

Um den Einfluss von Einfrier-/Auftauzyklen sowie der kurzzeitigen Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf die Stabilität der Standardpeptide in den Stocklösungen zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen von CAAP48-3xV an drei Tagen mittels RP-HPLC-UV untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse können aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von CAAP48-3xV mit CAAP48_{syn} und CAAP48-2xF(D₅) mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die beiden letzteren übertragen werden.

Die Analyse am ersten Tag erfolgte unmittelbar nach der Einwaage und dem Lösen von CAAP48-3xV, während die Analysen am zweiten und fünften Tag nach einem Einfrier-/Auftauzyklus und Lagerung für 24 h bzw. 96 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wurden. Der Vergleich der für jeden Tag erhaltenen Ergebnisse ermöglichte Aussagen über die Stabilität des Standardpeptids. Beispielhaft sind einige der erhaltenen Chromatogramme in Abbildung 16 dargestellt.

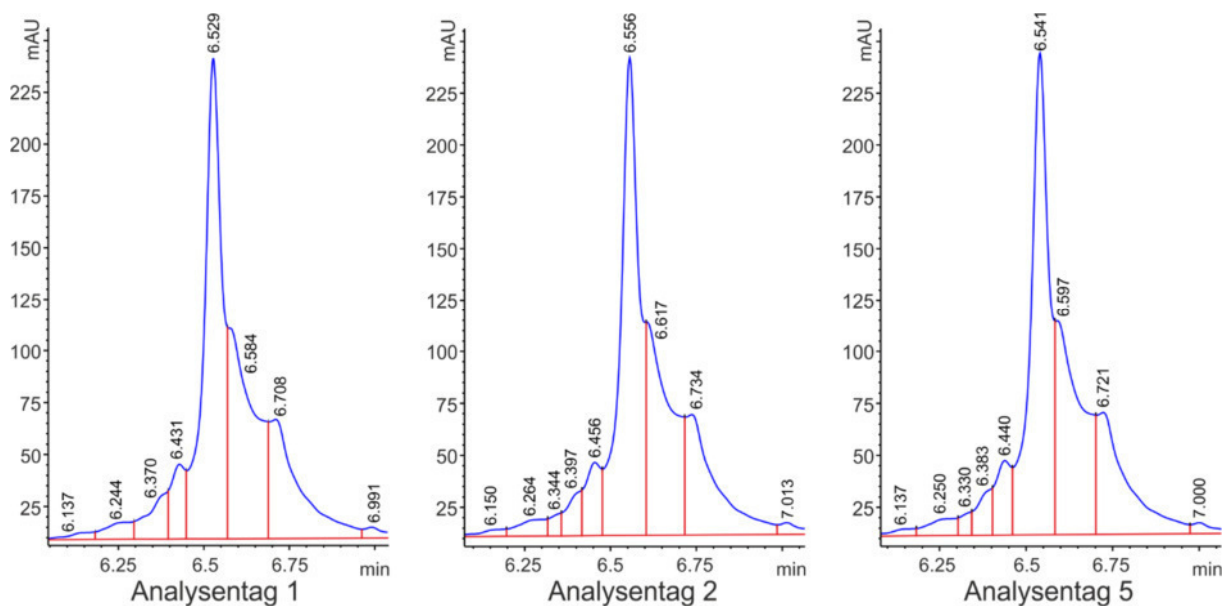


Abbildung 16: HPLC-UV-Chromatogramme von CAAP48-3xV (400 ng/μl) aufgenommen bei 220 nm an drei verschiedenen Analysentagen. Die Grenzen der Integrationsbereiche sind rot dargestellt.

Der Vergleich der in Abbildung 16 abgebildeten Chromatogramme lässt weder Änderungen der Signalform noch der Intensitäten des Haupt- und der Nebensignale erkennen. Auch wurden keine Veränderungen der Retentionszeiten beobachtet. Die für das Hauptsignal der 400 ng/μl-Proben ermittelten Retentionszeiten schwankten innerhalb der drei

Ergebnisse

Analysentage in einem Bereich von lediglich 0,027 min (= 1,6 s). Des Weiteren lassen die für CAAP48-3xV in Tabelle 14 aufgeführten Werte der Signalflächen und der Reinheit über die verschiedenen Analysentage keine Veränderungen erkennen. Ein Einfrier-/Auftau-Zyklus sowie die kurzzeitige Lagerung bei -20 °C haben demnach keinen Einfluss auf die Stabilität von CAAP48-3xV.

5.1.3.3 Verdünnungslinearität

Für die Herstellung von Kalibrierlösungen mussten die Stocklösungen der Standardpeptide verdünnt werden. Da bei der Verdünnung Probleme mit unspezifischer Adsorption auftreten können, wurde die Verdünnungslinearität jedes Standardpeptids anhand der Analyse unterschiedlicher Konzentrationen untersucht. Würde keine Verdünnungslinearität vorliegen, könnte z. B. durch die Erhöhung des Anteils des organischen Lösungsmittels oder durch Zugabe eines Denaturierungsmittels versucht werden, die unspezifische Adsorption zu verringern.

Innerhalb des Versuchs wurden die Stocklösungen der Standardpeptide so verdünnt, dass vier verschiedene Konzentrationen (100 ng/μl, 200 ng/μl, 400 ng/μl, 700 ng/μl) entstanden. Im Anschluss erfolgte mittels RP-HPLC-UV deren Analyse gemeinsam mit der unverdünnten Stocklösung. Insgesamt wurden für jedes Standardpeptid an drei verschiedenen Tagen fünf unterschiedliche Konzentration jeweils dreimal untersucht (entspricht 45 Messungen pro Standard). Die dabei bestimmten Flächen der Hauptsignale sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15 – Signalflächen zur Bestimmung der Verdünnungslinearität

	Statistische Kennwerte	Standard-peptide	[c] _{Standardpeptid} (ng/μl)				
			100	200	400	700	1000
Signalflächen (mAU)	\bar{x}	CAAP48	221,8	457,2	880,2	1580,0	2209,3
		CAAP48-2xF(D ₅)	211,4	377,9	793,1	1379,7	1946,9
		CAAP48-3xV	193,6	386,5	781,4	1320,3	1873,9
	s	CAAP48	0,6	1,8	6,9	6,8	23,6
		CAAP48-2xF(D ₅)	4,0	16,0	14,7	22,8	31,5
		CAAP48-3xV	2,4	7,4	8,9	35,7	29,0
	v (%)	CAAP48	0,3	0,4	0,8	0,4	1,1
		CAAP48-2xF(D ₅)	1,9	4,2	1,9	1,7	1,6
		CAAP48-3xV	1,2	1,9	1,1	2,7	1,6

Die ermittelten Signalflächen wiesen über drei Analysentage und jeweils drei Replikate nur sehr geringe Schwankungen auf. Der maximale Wert für die relative Standardabweichung

betrug lediglich 4,2 %. Für jeden Standard und jede Konzentration wurde der Mittelwert gegen die nominelle Konzentration der Standardpeptide aufgetragen. Die Anpassung der Daten erfolgte im Anschluss mit Hilfe der Regressionsfunktion $y = m \cdot x + n$ (Abbildung 17).

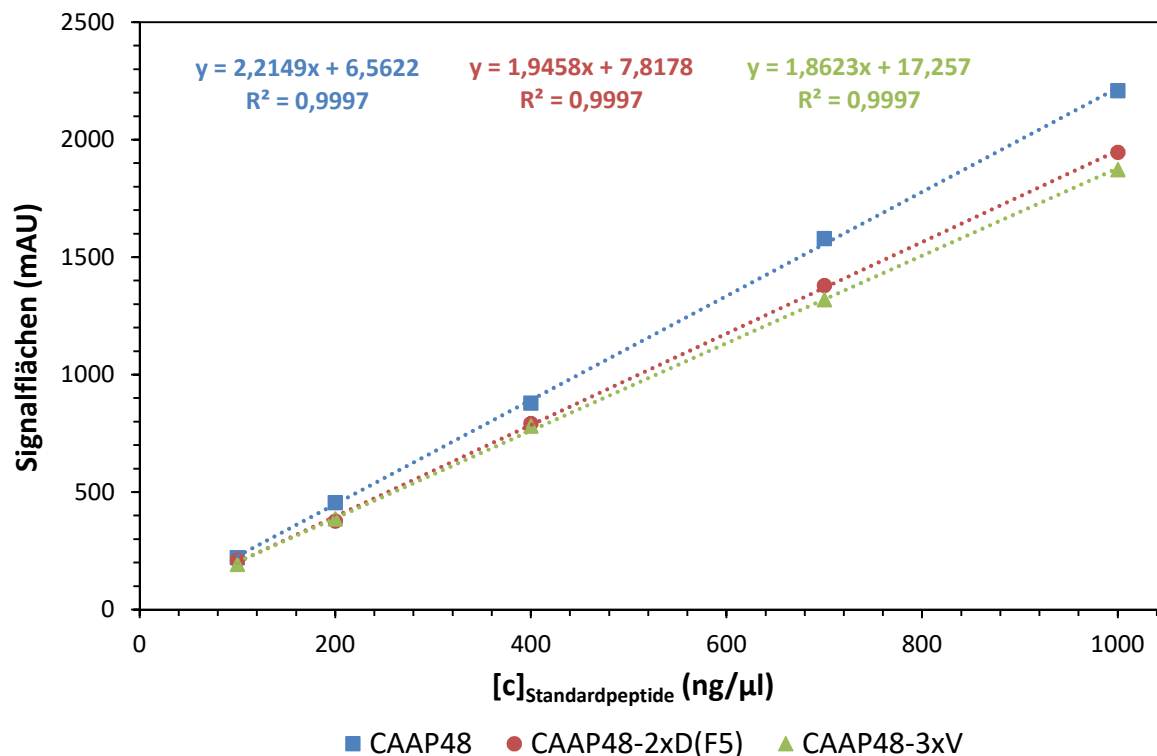


Abbildung 17: Nachweis der Verdünnungslinearität mit Hilfe einer linearen Regressionsfunktion.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionen ermöglichte die Einschätzung der Linearität jeder Verdünnung. Für jedes der drei Standardpeptide wurde ein Bestimmtheitsmaß von 99,97 % erhalten. Die Regressionsfunktion beschreibt demnach jeden Datensatz hinreichend, womit die Linearität jeder Standard-Verdünnung nachgewiesen ist. Damit können zumindest in dem untersuchten Konzentrationsbereich Probleme mit unspezifischer Adsorption ausgeschlossen werden.

5.1.3.4 Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen

Für die Verwendung der Standardpeptide ist es von großer Bedeutung, dass die entsprechenden Stocklösungen eine möglichst ähnliche Konzentration besitzen. Bereits während der Herstellung der Stocklösungen erfolgte eine Überprüfung der Konzentrationen mit Hilfe von MALDI-TOF-Analysen. Anhand der für die Bestimmung der Reinheit, Lagerstabilität und Verdünnungslinearität mittels RP-HPLC-UV erhobenen Daten wurden die Konzentrationen der Standardpeptide in den Stocklösungen erneut kontrolliert.

Im Unterschied zu den MALDI-TOF-Messungen konnten allerdings keine Mischungen der Standardpeptide analysiert werden. Da zwischen den Retentionszeiten von CAAP48 und

Ergebnisse

CAAP48-2xF(D5) keine Unterschiede bestanden, hätten die Signale bei einer Mischung beider Standards vollständig überlagert. Eine Bestimmung der jeweiligen Signalflächen bzw. -höhen und damit deren Vergleich wäre dann nicht möglich gewesen. Die Retentionszeiten von CAAP48 und CAAP48-3xV waren zwar geringfügig verschieden (6,9 min und 6,6 min), allerdings wies CAAP48-3xV mehrerer Signalschultern auf, die mit dem Signal für CAAP48 überlagert hätten. Daher wurden die Standardpeptide in getrennten HPLC-Läufen analysiert.

Die Standardpeptide wiesen deutlich unterschiedliche Reinheitsgrade auf. Ein Vergleich der Standard-Konzentrationen in den Stocklösungen ist daher vermutlich nur unter Nutzung der Intensitäten der Hauptsignale möglich. Diese Ausführung beruht auf der Annahme, dass die Signalflächen stärker durch die Gegenwart von Verunreinigungen beeinflusst werden als die Intensitäten. Während die Verunreinigungen wie bereits beschrieben einen Einfluss auf die Integration ausüben, sollten sie aufgrund der im Vergleich mit den Standardpeptiden unterschiedlichen Retentionszeiten nur geringfügig bis überhaupt nicht zur Intensität von deren Hauptsignal beitragen. Aus diesem Grund sollte die Intensität ein geeignetes Maß für die Konzentration eines Standardpeptids in der entsprechenden Stocklösung sein, weshalb zur Kreuzvalidierung nur die Signalintensitäten verwendet wurden. Die zu diesem Zweck bestimmten Intensitäten der Hauptsignale sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16 – Signalintensitäten zur Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen

	Statistische Kennwerte	Standard-peptide	[c] _{Standardpeptid} (ng/μl)				
			100	200	400	700	1000
Signalintensität (mAU)	\bar{x}	CAAP48	59,0	120,7	228,7	404,6	553,2
		CAAP48-2xF(D ₅)	55,3	108,2	222,5	377,1	524,0
		CAAP48-3xV	53,0	105,5	211,3	352,7	497,5
	s	CAAP48	0,1	0,3	1,7	3,0	6,1
		CAAP48-2xF(D ₅)	0,6	5,3	5,3	7,6	13,2
		CAAP48-3xV	0,1	1,1	0,7	9,9	5,1
	v (%)	CAAP48	0,2	0,2	0,8	0,7	1,1
		CAAP48-2xF(D ₅)	1,1	4,9	2,4	2,0	2,5
		CAAP48-3xV	0,2	1,0	0,3	2,8	1,0

Mit einem maximalen Wert für die relative Standardabweichung von 4,9 % wiesen die über drei Analysentage und jeweils drei Replikate bestimmten Signalintensitäten nur sehr geringe Schwankungen auf. Die für jeden Standard und jede Konzentration bestimmten Mittelwerte der Signalintensität wurden gegen die nominelle Konzentration der

Standardpeptide aufgetragen. Die Anpassung der Daten erfolgte im Anschluss mit Hilfe der Regressionsfunktion $y = m \cdot x + n$ (Abbildung 18).

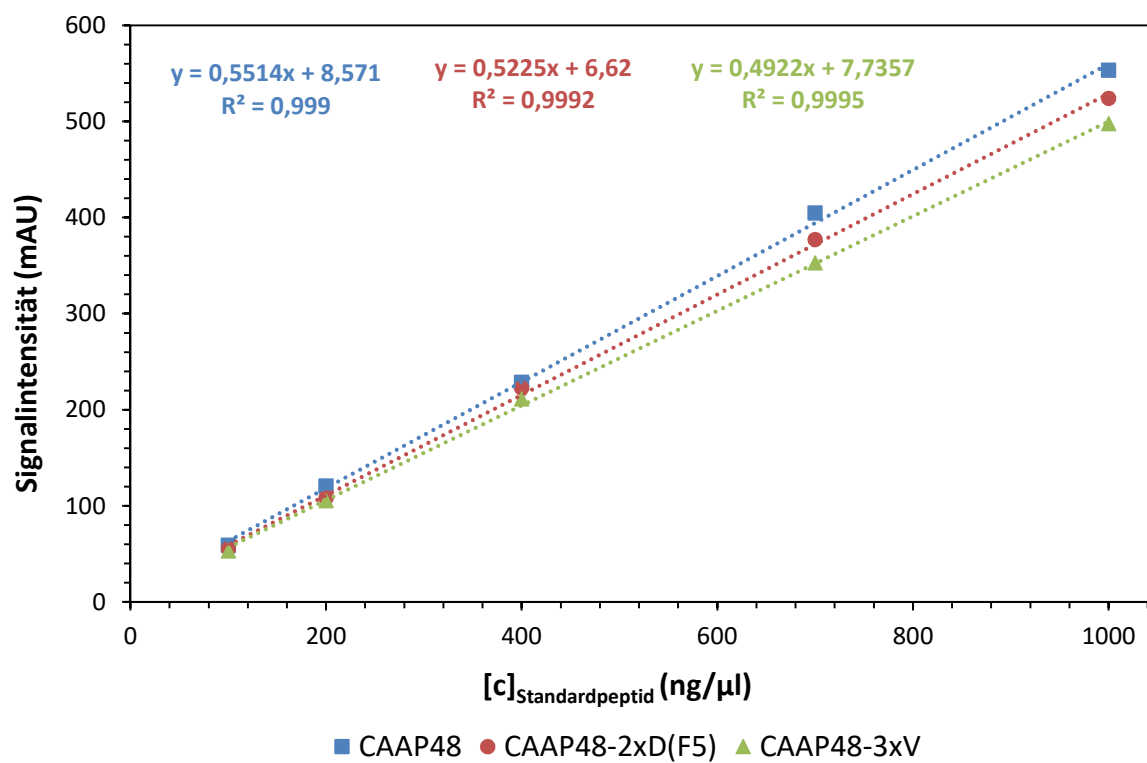


Abbildung 18: Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen in den Stocklösungen anhand des Anstiegs der Regressionsfunktionen.

Bereits bei den in Tabelle 16 zusammengefassten Werten wird deutlich, dass die Hauptsignale der Standardpeptide bei jeder der fünf untersuchten Konzentrationen ähnliche Intensitäten aufwiesen. Um die Standard-Konzentrationen quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden die Anstiege der Regressionsfunktionen betrachtet. Als Referenz fungierte dabei der Wert für CAAP48_{syn}. Ermittelt wurde demnach die auf CAAP48 bezogene relative Konzentration von CAAP48-2xF(D₅) und CAAP48-3xV. Die relative Konzentration von CAAP48-2xF(D₅) betrug in der untersuchten Stocklösung 94,8 %, was gut mit den in den beiden MALDI-TOF-Analysen ermittelten Werten 95,5 % und 96,0 % übereinstimmt. Für CAAP48-3xV wurde als relative Konzentration lediglich 89,3 % ermittelt, was eine geringe Abweichung von den mittels MALDI-TOF bestimmten Werten (96,6 % und 99,1 %) darstellt.

Insgesamt betrachtet, bestätigen die mittels RP-HPLC-UV erhobenen Daten die MALDI-TOF-Analysen. Geringe Abweichungen wurden lediglich für CAAP48-3xV erhalten. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentrationen der Standardpeptide in den Stocklösungen annähernd gleich waren.

5.2 Entwicklung und Validierung eines Massenspektrometrie-basierten Quantifizierungsverfahrens für CAAP48

5.2.1 Probenaufarbeitungsmethode

In der vom Autor betreuten Masterarbeit von Hendrik Michael (Titel: „*Quantification of a Human Sepsis Biomarker*“, 2015) erfolgten bereits Vorarbeiten zur Entwicklung einer Probenaufarbeitungsmethode für CAAP48. Auf Basis dieser Vorarbeiten konnte die Auswahl der zu untersuchenden Probenaufarbeitungsprotokolle und stationären Phasen in der vorliegenden Arbeit von vornherein auf zwei begrenzt werden.

5.2.1.1 Auswahl der stationären Phase

In den Versuch zur Auswahl der zur Aufarbeitung von CAAP48 aus Blutplasma am besten geeigneten stationären Phase wurden die „*Mixed-mode*“-Materialien „*Oasis*[®] *WCX*“ (schwacher Kationenaustauscher) und „*Oasis*[®] *MCX*“ (starker Kationenaustauscher) im Format der „*μElution Plates*“ der Firma Waters (siehe Abschnitt 4.2.1) einbezogen. Der Versuch konzentrierte sich auf die Empfindlichkeit, mit der Analyt und interner Standard nach der Festphasenextraktion analysiert werden können. Aufgrund nahezu identischer physikochemischer Eigenschaften von Analyt und interner Standards (siehe Abschnitt 4.1) wurde der Versuch nur mit CAAP48-2xF(D₅) durchgeführt.

Als Erstes wurde eine Verdünnungsreihe von CAAP48-2xF(D₅) in H₂O/ACN (900/100; v/v) mit 10 mM Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) im Konzentrationsbereich von 0,625 ng/μl bis 100,0 ng/μl hergestellt. Die frühzeitige Zugabe von TCEP sollte die Oxidation der in der Aminosäuresequenz von CAAP48 enthaltenen Methionin-Reste verhindern. Nach dem Mischen der Proben der Verdünnungsreihe mit humanem Plasma eines gesunden Spenders, erfolgte die Aufarbeitung der Mischungen unter Einsatz der beiden stationären Phasen, das Auftragen der Eluate auf den Probenträger sowie deren Analyse. Für letzteres wurde die MALDI-TOF-Massenspektrometrie eingesetzt, da für diese – im Unterschied zur LC-MS/MS – keine aufwändige Methodenentwicklung notwendig war und selbst die Analyse einer größeren Anzahl von Proben mit begrenztem Zeitaufwand möglich ist. Für jede Konzentration der Verdünnungsreihe von CAAP48-2xF(D₅) wurden 8 Spots auf dem Probenträger mit Probenlösung versehen und anschließend analysiert. Folglich wurden für jede Konzentration 8 MALDI-TOF-Massenspektren aufgenommen. Als Zielparameter der Auswertung fungierte die Anzahl der pro Konzentration erhaltenen Massenspektren mit einem Massensignal für das einfach geladene Molekül-Ion von CAAP48-2xF(D₅). Das Massensignal musste, damit es registriert wurde, ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens 6 aufweisen. Die Auswahl der stationären Phase erfolgte schließlich auf Basis der niedrigsten Konzentration von CAAP48-2xF(D₅), für die nach der Aufreinigung mittels Festphasenextraktion noch Massenspektren mit Massensignalen beobachtet wurde.

In Abbildung 19 sind für das Ergebnis des Versuchs repräsentative MALDI-TOF-Massenspektren der mit Hilfe von „Oasis® WCX“ aufgearbeiteten Proben der Verdünnungsreihe von CAAP48-2xF(D₅) dargestellt.

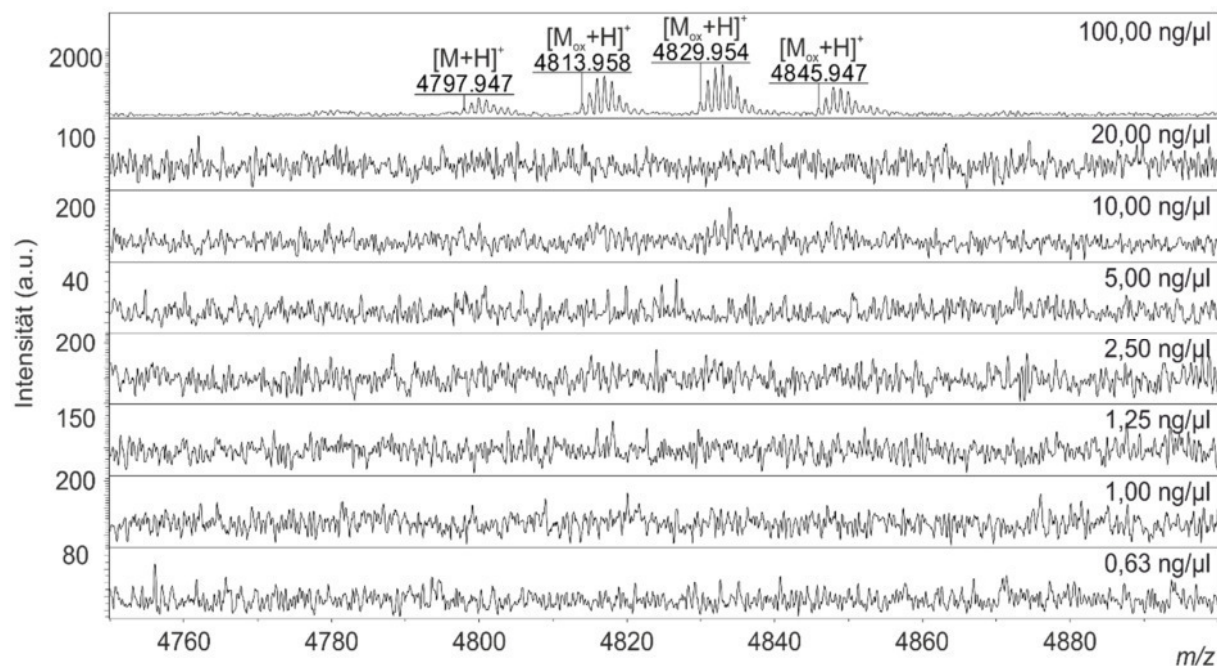


Abbildung 19: MALDI-TOF-Massenspektren der mit Hilfe von „Oasis® WCX“ aufgearbeiteten Proben.

Aus den abgebildeten Beispielspektren für die Probenaufarbeitung mit „Oasis® WCX“ ist ersichtlich, dass nur für die höchste Konzentration von CAAP48-2xF(D₅) ein Massensignal für das einfach geladene Molekül-Ion (m/z 4797,947) beobachtet wurde. In allen anderen Beispielspektren ist kein entsprechendes Signal zu finden. Darüber hinaus zeigt das Massenspektrum für die 100 ng/µl-Probe intensive Signale für die einfach (m/z 4813,958), zweifach (m/z 4829,954) und dreifach (m/z 4845,947) oxidierte Form von CAAP48-2xF(D₅). Eine durch die Probenaufarbeitung verursachte und damit artifizielle Modifikation der Methionin-Reste ist durch die „Aufspaltung“ des Massensignals für das einfach geladene Molekül-Ion mit einem deutlichen Empfindlichkeitsverlust verbunden. Interessanterweise erfolgte die Oxidation der Seitenkette der Methionin-Reste trotz der Zugabe eines starken Reduktionsmittels in Form von TCEP. Die genaue Ursache konnte nicht bestimmt werden, allerdings wurde die Oxidation nur bei Verwendung des „Oasis® WCX“-Materials beobachtet.

Ergebnisse

In Abbildung 20 sind für das Ergebnis des Versuchs repräsentative MALDI-TOF-Massenspektren der mit Hilfe von „Oasis® MCX“ aufgearbeiteten Proben der Verdünnungsreihe von CAAP48-2xF(D₅) dargestellt.

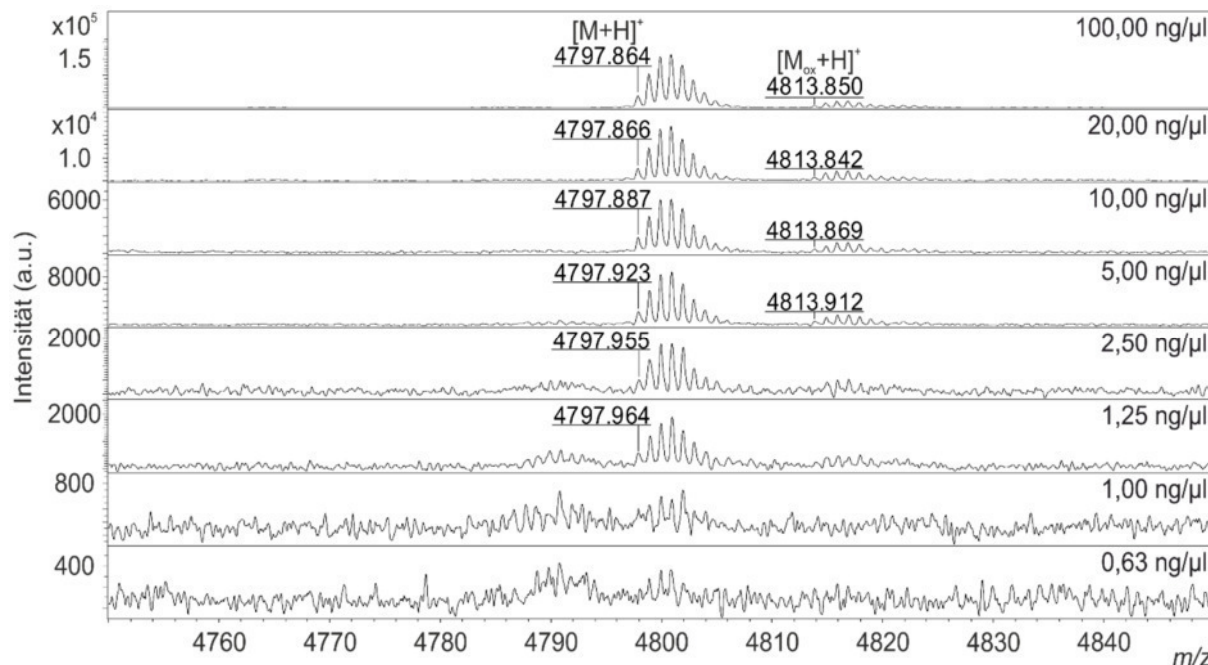


Abbildung 20: MALDI-TOF-Massenspektren der mit Hilfe von „Oasis® MCX“ aufgearbeiteten Proben.

In den für die Probenaufarbeitung mit „Oasis® MCX“ dargestellten Beispielspektren konnte bis zu einer Konzentration von 1,25 ng/µl das Massensignal für das einfach geladene Molekül-Ion (z.B. m/z 4797,864) von CAAP48-2xF(D₅) beobachtet werden. Für die einfach oxidierte Form von CAAP48-2xF(D₅) wurde hingegen nur ein wenig intensives Signal (z. B. m/z 4813,850) erhalten. Die durch die Probenaufarbeitung verursachte Oxidation der Methionin-Seitenketten ist demnach bei Verwendung von „Oasis® MCX“ wesentlich geringer ausgeprägt als bei „Oasis® WCX“.

In Tabelle 17 ist die Anzahl der MALDI-TOF-Massenspektren mit Signalen für das einfach geladene Molekül-Ion von nicht oxidiertem und oxidiertem CAAP48-2xF(D₅) für jede Konzentration der Verdünnungsreihe zusammengefasst.

Tabelle 17 – Massensignale für CAAP48-2xF(D₅)

[c] _{CAAP48-2xF(D₅)} (ng/μl)	„Oasis® WCX“		„Oasis® MCX“	
	[M+H] ⁺	[M _{ox} +H] ⁺	[M+H] ⁺	[M _{ox} +H] ⁺
0,63	0/8	0/8	0/8	0/8
1,00	0/8	0/8	4/8	0/8
1,25	0/8	0/8	7/8	0/8
2,50	0/8	0/8	8/8	0/8
5,00	0/8	0/8	8/8	8/8
10,00	0/8	0/8	8/8	7/8
20,00	0/8	0/8	8/8	8/8
100,00	8/8	8/8	8/8	8/8

Für die mit Hilfe von „Oasis® MCX“ aufgearbeiteten Proben konnte bis zu einer Konzentration von 1,25 ng/μl in der Mehrheit der Spektren ein Massensignal für die nicht oxidierte Form von CAAP48-2xF(D₅) beobachtet werden. Auch bei einer Konzentration von 1,0 ng/μl fand sich in immerhin der Hälfte der Spektren noch ein entsprechendes Signal. Damit ermöglichte „Oasis® MCX“ eine im Vergleich mit „Oasis® WCX“ wesentlich empfindlichere Analyse von CAAP48-2xF(D₅) in humanem Blutplasma. Damit ist die „Oasis® MCX“-Phase offenkundig besser für die Aufreinigung des Analyten und der internen Standards aus Blutplasma geeignet.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist der vom Hersteller des SPE-Materials angegebene Anwendungsbereich ein erster Anhaltspunkt. Demnach ist die „Oasis® WCX“-Phase am besten für stark basische Analyten mit einem pK_S-Wert ≥10 geeignet, während die „Oasis® MCX“-Phase bei der Aufreinigung von Analyten mit einem pK_S-Wert zwischen 2 und 10 optimale Ergebnisse erzielen. Folglich sollte „Oasis® MCX“ für die Aufreinigung von CAAP48 (theoretischer pI von 9,4) sowie der internen Standards am besten geeignet sein, was die experimentellen Daten auch bestätigen.

Darüber hinaus dürfte das für die Aufreinigung mittels „Oasis® WCX“ verwendete generische Protokoll zu einer Beeinträchtigung der Bindung des Analyten an die stationäre Phase geführt haben. Dem Protokoll entsprechend erfolgte die Äquilibrierung der stationären Phase mit hochreinem entionisiertem Wasser, dessen pH-Wert etwa 5,5 betrug. Folglich dürften die Carboxy-Funktionen der stationären Phase mit einem pK_S-Wert von ca. 5 ungeladen gewesen sein. Die Bindung des Analyten konnte unter diesen Bedingungen nur über hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen. Durch die Zugabe der Probe, die einen (stark) sauren pH-Wert aufwies, war die stationäre Phase jedoch positiv geladen. Eine Bindung des ebenfalls positiv geladenen Analyten an die stationäre Phase allein über hydrophobe

Wechselwirkungen dürfte unter diesen Umständen vermutlich nur in begrenztem Umfang möglich gewesen sein.

Um die Bindung des Analyten zu gewährleisten, müssen die funktionellen Gruppen der stationären Phase des „Oasis® WCX“-Materials negativ und die des Analyten positiv geladen sein. Dafür ist es notwendig, dass die pH-Werte aller verwendeten Lösungen mindestens eine pH-Stufe oberhalb des pKs-Wertes (ca. 5) der stationären Phase sowie eine pH-Stufe unterhalb des pI-Wertes (ca. 9,4) des Analyten liegen. Demnach hätte sich der pH-Wert der Probe sowie aller zur Äquilibration der stationären Phase verwendeten Lösungen in einem Bereich von pH 6-8 bewegen müssen. Unter diesen Umständen wäre zu Beginn der Probenaufarbeitung ein Ansäuern der Probenlösung zum Aufbrechen molekularer Wechselwirkungen und damit die Freisetzung des endogenen Analyten aus Alpha-1-Antitrypsin nicht möglich gewesen.

Ein alternatives Protokoll nutzt zur Verdünnung der Plasmaprobe und zur Äquilibration der stationären Phase ein Lösungsmittelgemisch bestehend aus H₂O/NH₄OH²⁵ (950/50; v/v), das einen pH-Wert von etwa 11 besitzt. Unter Berücksichtigung des pI-Wertes von CAAP48 würde dieses, ebenso wie die stationäre Phase, negativ geladen sein. Damit wäre eine Bindung des Analyten ebenso unwahrscheinlich wie bei dem im vorliegenden Versuch verwendeten Protokoll.

Aus den vorstehenden Ausführungen wird deutlich, dass nur das „Oasis® MCX“-Material für die Aufreinigung von CAAP48 und seiner internen Standards aus Blutplasma eingesetzt werden kann, da die für das „Oasis® WCX“-Material verfügbaren Protokolle aufgrund des pI-Wertes von CAAP48 für dieses nicht anwendbar sind.

5.2.2 Entwicklung einer MALDI-TOF-basierten Quantifizierungsmethode

Das wesentliche Ziel bei der Entwicklung einer MALDI-TOF-basierten Quantifizierungsmethode bestand in der Bestimmung einer Kalibrierfunktion, mit deren Hilfe die Konzentration des Analyten aus dem Verhältnis der Signalintensität oder Signalfläche von Analyt und internem Standard im Massenspektrum ermittelt werden kann.

In Vorversuchen wurde zunächst ermittelt, dass sich DHB-Matrix hinsichtlich Auflösung und Signalintensität (bzw. Signal-zu-Rausch-Verhältnis) am besten für die Analyse von CAAP48 eignet. Auch einzelne Geräteparameter wie der optimale Durchmesser des Laserstrahls wurden untersucht und gegebenenfalls optimiert. Die Aufnahme von Massenspektren erfolgte ausschließlich im Reflektormodus. Grundlage hierfür war die Notwendigkeit, dass Isotopenmuster von Analyt und internem Standard mit möglichst hoher Auflösung abbilden zu können. Dadurch können mögliche Überlagerungen leichter erkannt und ihr Einfluss auf die Quantifizierung von CAAP48 eingeschätzt werden. Außerdem erfolgte die Aufnahme der Massenspektren mit positiver Polarität, da Probemessungen mit negativer Polarität eine dramatische Verringerung der Empfindlichkeit für CAAP48 zeigten.

²⁵ ≥13,3 mol/l (≥25 %)

Als primäre Zielgröße der Versuche standen die Intensität und Fläche eines einzelnen Isotopensignals oder des gesamten Isotopenmusters zur Auswahl. Die in mehreren Messungen einer Probe beobachtbaren Schwankungen von relativer Intensität und Fläche der einzelnen Signale eines Isotopenmusters verdeutlichen jedoch, dass es sinnvoller ist alle Signale gemeinsam zu betrachten, statt sich z. B. auf das monoisotopische Signal zu konzentrieren. Letzteres weist für CAAP48 im Vergleich mit dem intensivsten Signal des Isotopenmusters ohnehin nur noch eine relative Intensität von 26 % auf. Insbesondere bei den kleinsten untersuchten Konzentrationen sind die Intensität und Fläche des monoisotopischen Signals daher besonders anfällig für Schwankungen, ausgelöst z. B. durch die Überlagerung mit Hintergrundsignalen. Die Entscheidung, ob die Signalfläche oder die -intensität des Isotopenmusters als primäre Zielgröße verwendet werden sollte, wurde zwar zugunsten der Signalintensität getroffen, allerdings ergab der Vergleich von Intensität und Fläche von Beispieldaten nahezu keine Unterschiede. Erklärt werden kann die Beobachtung damit, dass sowohl Signalintensität als auch -fläche auf Basis eines für das entsprechende Massensignal erzeugten theoretischen Isotopenmusters berechnet werden und somit auf der gleichen Funktion beruhen (siehe Abschnitt 8.2.5.2).

Die in Tabelle 18 aufgeführten Konzentrationen von Analyt und internem Standard wurden für alle Versuche zur Bestimmung einer Kalibrierfunktion verwendet, allein Probenmatrix (Lösungsmittelgemisch oder humanes Blutplasma) und Probenaufarbeitung (Festphasenextraktion oder direkter Probenauftrag ohne Vorbereitung) variierten.

Tabelle 18 – Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS

$[c]_{IS, \text{ nominell}} \text{ (ng/}\mu\text{l)}$	$[c]_{\text{Analyt, nominell}} \text{ (ng/}\mu\text{l)}$						
2,5	1,0	1,3	2,0	2,5	3,1	5,0	6,3
10,0	4,0	5,0	8,0	10,0	12,5	20,0	25,0
50,0	20,0	25,0	40,0	50,0	62,5	100,0	125,0
$[c]_{\text{Analyt}}/[c]_{IS}$	0,4	0,5	0,8	1,0	1,25	2,0	2,5

5.2.2.1 Kalibrierfunktion in Lösungsmittelgemisch

Die Mischungen von Analyt und internem Standard wurden in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus 10 mM TCEP in H₂O/ACN (900/100; v/v) hergestellt und jede Probe ohne Probenaufarbeitung auf jeweils acht Spots des Probenträgers des MALDI-TOF-Massenspektrometers aufgetragen. Die Datenaufnahme erfolgte automatisch, wobei für jedes Konzentrationsverhältnis acht Massenspektren erhalten wurden. Aus jedem Massenspektrum konnte wiederum ein Wert für das Signalintensitätsverhältnis Analyt/Interner Standard abgelesen werden (Tabelle 19).

Tabelle 19 – Signalintensitätsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch

[c] _{IS, nominell} (ng/μl)	I _{Analyt/IS}	[c] _{Analyt, nominell} /[c] _{IS, nominell}						
		0,4	0,5	0,8	1,0	1,25	2,0	2,5
2,5	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,24	0,32	0,46	0,83	0,93	1,65	2,48
	s	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04
	v (%)	1,6	1,9	2,7	1,8	2,0	1,1	1,6
10,0	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,33	0,39	0,82	0,98	1,40	2,29	3,01
	s	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04
	v (%)	3,4	2,2	2,1	2,2	1,6	1,1	1,5
50,0	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,39	0,50	0,83	1,12	1,44	2,27	2,82
	s	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03
	v (%)	1,2	1,8	1,5	1,5	1,8	1,3	1,2

Für jede Probe konnte in jeweils acht Massenspektren das Signalintensitätsverhältnis Analyt/IS bestimmt werden, wobei nur eine geringe Streuung der Werte beobachtet wurde. So betrug der Durchschnitt aller Werte der relativen Standardabweichung nur 1,8 % (Minimum 1,1 %, Maximum 3,4 %). Demnach zeichnen sich die Analysen durch eine gute Präzision aus.

Bei gleicher Konzentration von Analyt und internem Standard (nominelles Konzentrationsverhältnis 1,0) sollte die Intensität der beiden Massensignale ausgeglichen sein, dass Signalintensitätsverhältnis also 1,0 betragen. Dies wurde annäherungsweise lediglich für die mit einer Konzentration des internen Standards von 10,0 ng/μl ausgestatteten Proben beobachtet. Die mit 2,5 ng/μl bzw. 50,0 ng/μl des internen Standards versehenen Proben wiesen hingegen teilweise deutliche Abweichungen auf. Dennoch lässt sich aus den Signalintensitätsverhältnissen aller Proben eine allgemeine Tendenz ableiten: Umso größer bzw. kleiner das Konzentrationsverhältnis, umso stärker die Abweichung des Signalintensitätsverhältnisses. Sinkt die Konzentration des Analyten im Vergleich zum internen Standard, nimmt die Differenz der Signalintensität überproportional stark zu. Der gleiche Trend zeigt sich bei steigender Konzentration.

Um zu überprüfen, ob der Zusammenhang zwischen Signalintensitäts- und Konzentrationsverhältnis linear ist, wurden die entsprechenden Werte gegeneinander aufgetragen und mit Hilfe der linearen Funktion $y = m \cdot x + n$ eine Regressionsanalyse durchgeführt (Abbildung 21).

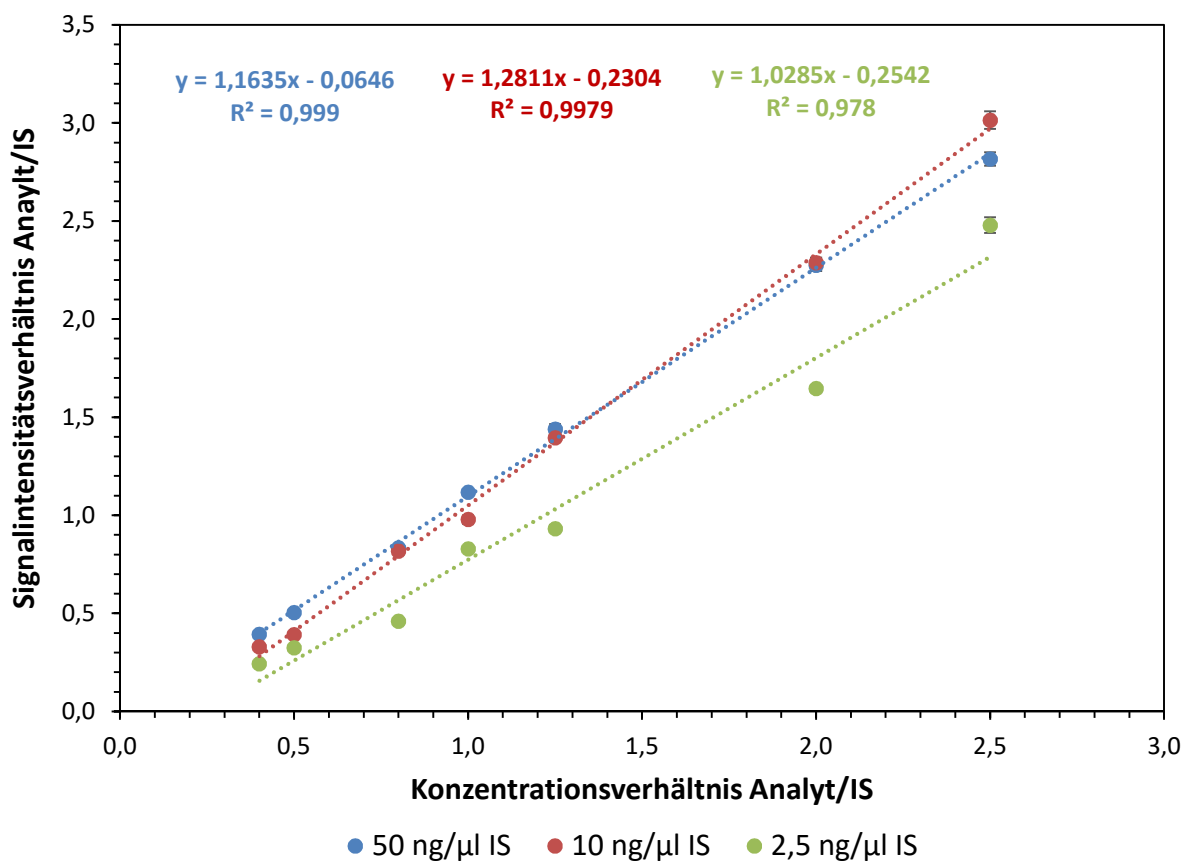


Abbildung 21: Regressionsanalyse der in einem Lösungsmittelgemisch bestimmten Signalintensitätsverhältnisse für Analyt und internen Standard.

Anhand der für die verschiedenen Konzentrationen des internen Standards erhaltenen Regressionsgeraden konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentrations- und Signalintensitätsverhältnis für den jeweiligen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Die Anstiege der drei Regressionsgeraden wiesen begrenzte Unterschiede auf, aus denen sich allerdings keine Aussagen über grundsätzliche Beziehungen von Signalintensitäts- und Konzentrationsverhältnis ableiten lassen. Vielmehr scheinen die Unterschiede Ausdruck der Streuung der Messwerte zu sein. Aus diesem Grund wurde auf Basis der Daten aller drei Konzentrationen des internen Standards eine gemeinsame Regressions- bzw. Kalibrierfunktion ($y = 1,1577 \cdot x - 0,1831$, $R^2 = 95,06$) erstellt. Um einschätzen zu können, ob eine gemeinsame Kalibrierfunktion zur Auswertung auch von mit verschiedenen Konzentrationen des internen Standards bestimmter Signalintensitätsverhältnisse geeignet ist, wurde im Anschluss die Richtigkeit für jedes Konzentrationsverhältnis von Analyt und internem Standard bestimmt (Tabelle 20).

Tabelle 20 – Richtigkeit der experimentell bestimmten Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch

	[c] _{IS, nominell} (ng/μl)	[c] _{Analyt, nominell} /[c] _{IS, nominell}						
		0,4	0,5	0,8	1,0	1,25	2,0	2,5
I _{Analyt/IS}	2,5	0,24	0,32	0,46	0,83	0,93	1,65	2,48
	10,0	0,33	0,39	0,82	0,98	1,40	2,29	3,01
	50,0	0,39	0,50	0,83	1,12	1,44	2,27	2,82
[c] _{Analyt, exp.} / [c] _{IS, exp.}	2,5	0,37	0,44	0,56	0,87	0,96	1,58	2,30
	10,0	0,44	0,50	0,86	1,00	1,36	2,13	2,76
	50,0	0,50	0,59	0,88	1,12	1,40	2,12	2,59
Richtigkeit (%)	2,5	91,8	87,6	69,4	87,4	77,1	79,0	92,0
	10,0	110,7	99,2	108,0	100,3	109,1	106,7	110,5
	50,0	124,5	118,8	109,8	112,3	112,1	106,1	103,6

In der Validierung massenspektrometrischer Methoden sind Abweichungen der Richtigkeit von höchsten ± 15 % erlaubt. Die meisten (16 von 21) der mit Hilfe der gemeinsamen Kalibrierfunktion berechneten Werte der Richtigkeit halten diese Grenze ein. Abweichungen (in Tabelle 20 rot markiert) wurden insbesondere für Proben mit 2,5 ng/μl und 50 ng/μl internen Standard erhalten. Allerdings wichen für diese Proben bei gleicher Konzentration von Analyt und internem Standard die Intensitäten der beiden Massensignale deutlich voneinander ab. Die dadurch verursachte Streuung der Messdaten führt schließlich dazu, dass für einige der errechneten Konzentrationsverhältnisse starke Abweichungen beobachtet wurden. Dies sollte aber keine generelle Beeinträchtigung der Verwendbarkeit der gemeinsamen Kalibrierfunktion zur Auswertung der Daten von Proben mit drei verschiedenen Konzentrationen des internen Standards sein.

5.2.2.2 Kalibrierfunktion in Lösungsmittelgemisch nach Festphasenextraktion

Das Ziel dieses Versuchs bestand darin, den Einfluss der Festphasenextraktion auf die Kalibrierfunktion zu bestimmen. Dazu wurden als erstes Mischungen von Analyt und internem Standard in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus 10 mM TCEP in H₂O/ACN (900/100; v/v) hergestellt und mittels Festphasenextraktion („Oasis® MCX“) aufgereinigt. Das Eluat von jeder Probe wurde im Anschluss auf jeweils acht Spots des Probenträgers des MALDI-TOF-Massenspektrometers aufgetragen. Datenaufnahme und -auswertung erfolgten analog zum vorhergehenden Versuch. Aus jedem Massenspektrum konnte ein Wert für das Signalintensitätsverhältnis Analyt/Interner Standard abgelesen werden (Tabelle 21).

Tabelle 21 – Signalintensitätsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch nach Festphasenextraktion

[c] _{IS, nominell} (ng/μl)	I _{Analyt/IS}	[c] _{Analyt, nominell} /[c] _{IS, nominell}						
		0,4	0,5	0,8	1,0	1,25	2,0	2,5
2,5	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,26	0,34	0,58	0,77	0,98	2,17	2,54
	s	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,05
	v (%)	3,4	1,9	1,6	1,5	1,4	2,2	2,1
10,0	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,29	0,39	0,74	0,92	1,30	2,17	2,83
	s	0,02	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,05
	v (%)	7,2	0,9	1,4	1,0	1,4	1,3	1,7
50,0	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,38	0,49	0,80	1,05	1,38	2,12	2,71
	s	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,06
	v (%)	1,9	2,2	1,7	0,8	1,3	0,5	2,4

Für jede Probe konnte in jeweils acht Massenspektren das Signalintensitätsverhältnis Analyt/IS bestimmt werden. Abgesehen von einem Ausreißer war die Streuung der Intensitätsverhältnisse gering. Der Durchschnitt der Werte der relativen Standardabweichung betrug nur 1,9 % (Minimum 0,5 %, Maximum 3,4 %, Ausreißer 7,2 %²⁶). Bei einem nominellen Konzentrationsverhältnis von 1,0 konnten nahezu ausgeglichene Signalintensitäten für Proben mit 10,0 ng/μl und 50,0 ng/μl des internen Standards beobachtet werden. Deutliche Abweichungen wiesen hingegen die Proben mit 2,5 ng/μl interner Standard auf. Wie bereits im vorherigen Versuch konnte aus den Messdaten die allgemeine Tendenz abgelesen werden, dass die Signalintensitätsverhältnisse umso stärker abweichen, umso kleiner bzw. größer das nominelle Konzentrationsverhältnis ist.

Um zu überprüfen, ob der Zusammenhang zwischen Signalintensitäts- und Konzentrationsverhältnis linear ist, wurden die entsprechenden Werte gegeneinander aufgetragen und mit Hilfe der linearen Funktion $y = m \cdot x + n$ eine Regressionsanalyse durchgeführt (Abbildung 22).

²⁶ Wert befindet sich mehr als 2,5 Standardabweichungen oberhalb des Mittelwertes.

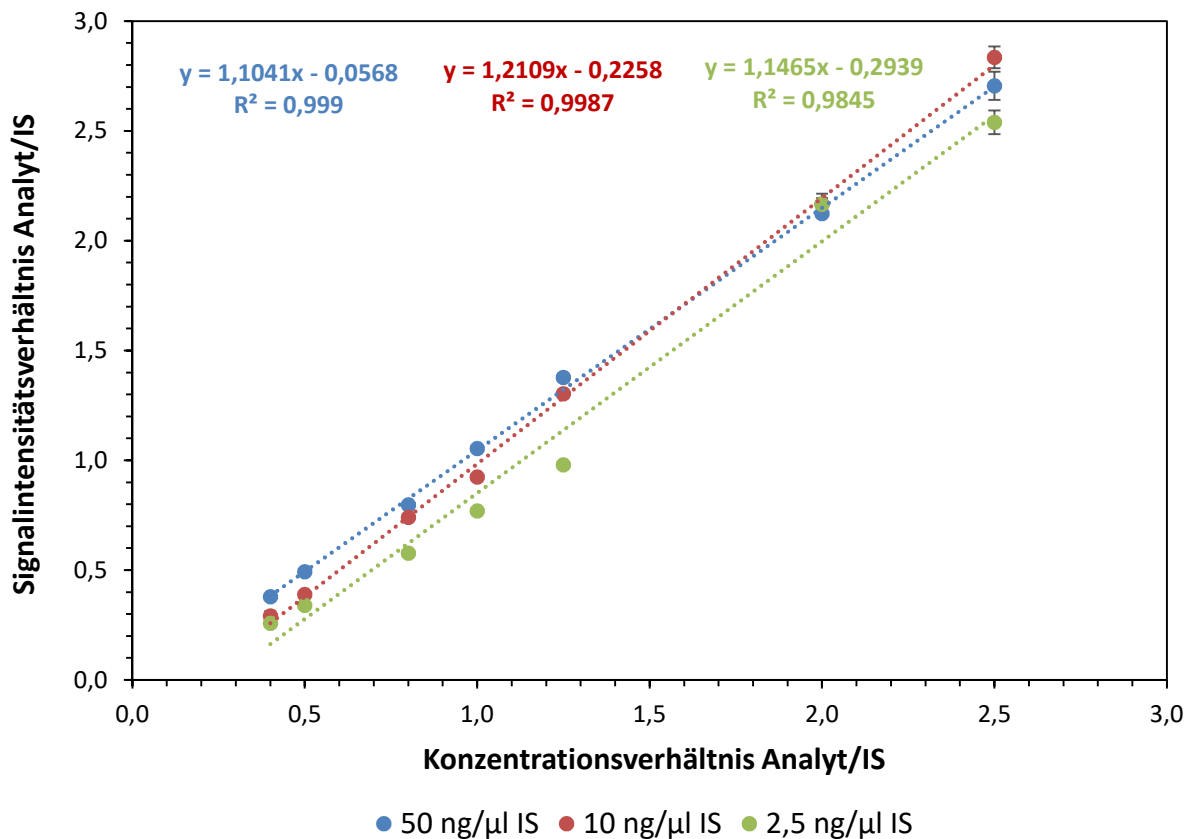


Abbildung 22: Regressionsanalyse der in einem Lösungsmittelgemisch nach Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion bestimmten Signalintensitätsverhältnisse für Analyt und internen Standard.

Wie bereits im vorhergehenden Versuch konnte anhand der für die verschiedenen Konzentrationen des internen Standards erhaltenen Regressionsgeraden ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentrations- und Signalintensitätsverhältnis für den jeweiligen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Die Anstiege der drei Regressionsgeraden zeigten untereinander begrenzte Abweichungen, sie stimmten aber hinsichtlich der Größe des Anstiegs und des Abweichungsbereichs gut mit den im vorherigen Versuch erhaltenen Werten überein. Die Abweichungen waren vermutlich wieder Ausdruck der Streuung der Messwerte, weshalb auf Basis der Daten eine für alle drei Konzentrationen des internen Standards gemeinsame Regressions- bzw. Kalibrierfunktion ($y = 1,1538 \cdot x - 0,1922$, $R^2 = 98,37$) erstellt wurde. Diese stimmt mit der gemeinsamen Kalibrierfunktion aus dem vorherigen Versuch, in welchem keine Festphasenextraktion durchgeführt wurde, überein. Demnach hat Letztere offenkundig keinen Einfluss auf die Signalintensitätsverhältnisse.

Um wieder einschätzen zu können, ob die erstellte gemeinsame Kalibrierfunktion zur Auswertung auch von mit verschiedenen Konzentrationen des internen Standards bestimmter Signalintensitätsverhältnisse geeignet ist, wurde die Richtigkeit für jedes Konzentrationsverhältnis von Analyt und internem Standard bestimmt (Tabelle 22).

Tabelle 22 – Richtigkeit der experimentell bestimmten Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch nach Festphasenextraktion

	[c] _{IS, nominell} (ng/μl)	[c] _{Analyt, nominell} /[c] _{IS, nominell}						
		0,4	0,5	0,8	1,0	1,25	2,0	2,5
I _{Analyt/IS}	2,5	0,26	0,34	0,58	0,77	0,98	2,17	2,54
	10,0	0,29	0,39	0,74	0,92	1,30	2,17	2,83
	50,0	0,38	0,49	0,80	1,05	1,38	2,12	2,71
[c] _{Analyt, exp.} / [c] _{IS, exp.}	2,5	0,39	0,46	0,67	0,83	1,02	2,04	2,37
	10,0	0,42	0,50	0,81	0,97	1,30	2,04	2,62
	50,0	0,50	0,59	0,86	1,08	1,36	2,01	2,51
Richtigkeit (%)	2,5	97,5	92,3	83,4	83,4	81,3	102,2	94,7
	10,0	105,0	100,8	101,0	96,8	103,7	102,2	104,9
	50,0	123,9	118,8	107,2	108,0	108,8	100,4	100,5

Wie beim vorherigen Versuch wiesen die meisten (16 von 21) der mit Hilfe der gemeinsamen Kalibrierfunktion berechneten Werte der Richtigkeit Abweichungen von unter $\pm 15\%$ auf. Abweichungen von mehr als $\pm 15\%$ wurden insbesondere für Proben mit 2,5 ng/μl und 50 ng/μl internen Standard erhalten. Darüber hinaus zeigte die Richtigkeit für Proben mit 2,5 ng/μl internem Standard fast durchgängig zu geringe und für Proben mit 50,0 ng/μl internem Standard zu hohe Werte. Ein nahezu identisches Bild wurde im vorherigen Versuch beobachtet. Die Proben mit 2,5 ng/μl internem Standard wiesen eine deutliche Abweichung in Richtung einer zu geringen Analyt-Konzentration auf, während für die Proben mit 50,0 ng/μl die Abweichung in Richtung einer zu hohen Analyt-Konzentration zeigte. Diese Beobachtung weist auf unspezifische Adsorption hin, welche sich vorrangig auf kleine Konzentrationen auswirkt und letztendlich zu einer Beeinträchtigung der gemeinsamen Kalibrierfunktion geführt hat. Das Vorgehen, aus allen Messdaten eine gemeinsame Kalibrierfunktion zu erzeugen, wird dadurch jedoch nicht infrage gestellt.

5.2.2.3 Kalibrierfunktion in Blutplasma nach Festphasenextraktion

Innerhalb des letzten Versuchs wurde der Einfluss einer biologischen Matrix, im vorliegenden Fall von humanem Blutplasma, auf die Kalibrierfunktion untersucht. Dazu erfolgte zunächst das Herstellen einer Verdünnungsreihe von Analyt und internem Standard in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus 10 mM TCEP in H₂O/ACN (900/100; v/v). Im Anschluss wurden die Standard-Proben mit humanem Blutplasma eines gesunden Spenders gemischt und mittels Festphasenextraktion („Oasis® MCX“) aufgereinigt. Das Eluat von jeder Probe wurde auf jeweils acht Spots des Probenträgers des MALDI-TOF-Massenspektrometers aufgetragen. Datenaufnahme und -auswertung erfolgten analog der beiden vorhergehenden

Ergebnisse

Versuche. Aus fast jedem Massenspektrum konnte ein Wert für das Signalintensitätsverhältnis Analyt/Interner Standard abgelesen werden (Tabelle 23).

Tabelle 23 – Signalintensitätsverhältnisse Analyt/IS in Blutplasma nach Festphasenextraktion

[c] _{IS, nominell} (ng/μl)	I _{Analyt/IS}	[c] _{Analyt, nominell} /[c] _{IS, nominell}						
		0,4	0,5	0,8	1,0	1,25	2,0	2,5
2,5	N	7	8	8	8	7	8	6
	\bar{x}	0,53	0,63	0,93	1,13	1,25	2,20	2,78
	s	0,05	0,03	0,06	0,09	0,07	0,07	0,14
	v (%)	9,1	4,1	6,3	8,1	5,4	3,1	4,9
10,0	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,34	0,48	0,79	1,05	1,40	2,46	3,18
	s	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,09	0,04
	v (%)	3,2	3,5	2,0	2,4	2,2	3,6	1,3
50,0	N	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{x}	0,35	0,45	0,78	1,05	1,34	2,39	2,76
	s	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,05
	v (%)	1,4	1,2	1,1	0,9	1,1	2,1	1,9

Für die meisten Proben konnte in jeweils acht Massenspektren das Signalintensitätsverhältnis Analyt/IS bestimmt werden. Die Streuung der Intensitätsverhältnisse war im Vergleich zu den beiden vorherigen Versuchen deutlich größer. Der Durchschnitt der Werte der relativen Standardabweichung betrug 3,3 % (Minimum 0,9 %, Maximum 9,1 %). Insbesondere die Proben mit der kleinsten Konzentration (2,5 ng/μl) des internen Standards zeigten eine deutliche Streuung, was auf die Nähe zur Grenze der Empfindlichkeit verweist.

Für alle Proben konnten hingegen bei einem nominellen Konzentrationsverhältnis von 1,0 nahezu ausgeglichene Signalintensitäten beobachtet werden. Darüber hinaus konnte aus den Messdaten wieder die allgemeine Tendenz abgelesen werden, dass die Signalintensitätsverhältnisse umso stärker abweichen, umso kleiner bzw. größer das nominelle Konzentrationsverhältnis ist. Auf diesen Zusammenhang hat demnach auch die Gegenwart von Plasma keinen Einfluss.

Um wieder zu überprüfen, ob der Zusammenhang zwischen Signalintensitäts- und Konzentrationsverhältnis linear ist, wurden die entsprechenden Werte gegeneinander aufgetragen und mit Hilfe der linearen Funktion $y = m \cdot x + n$ eine Regressionsanalyse durchgeführt (Abbildung 23).

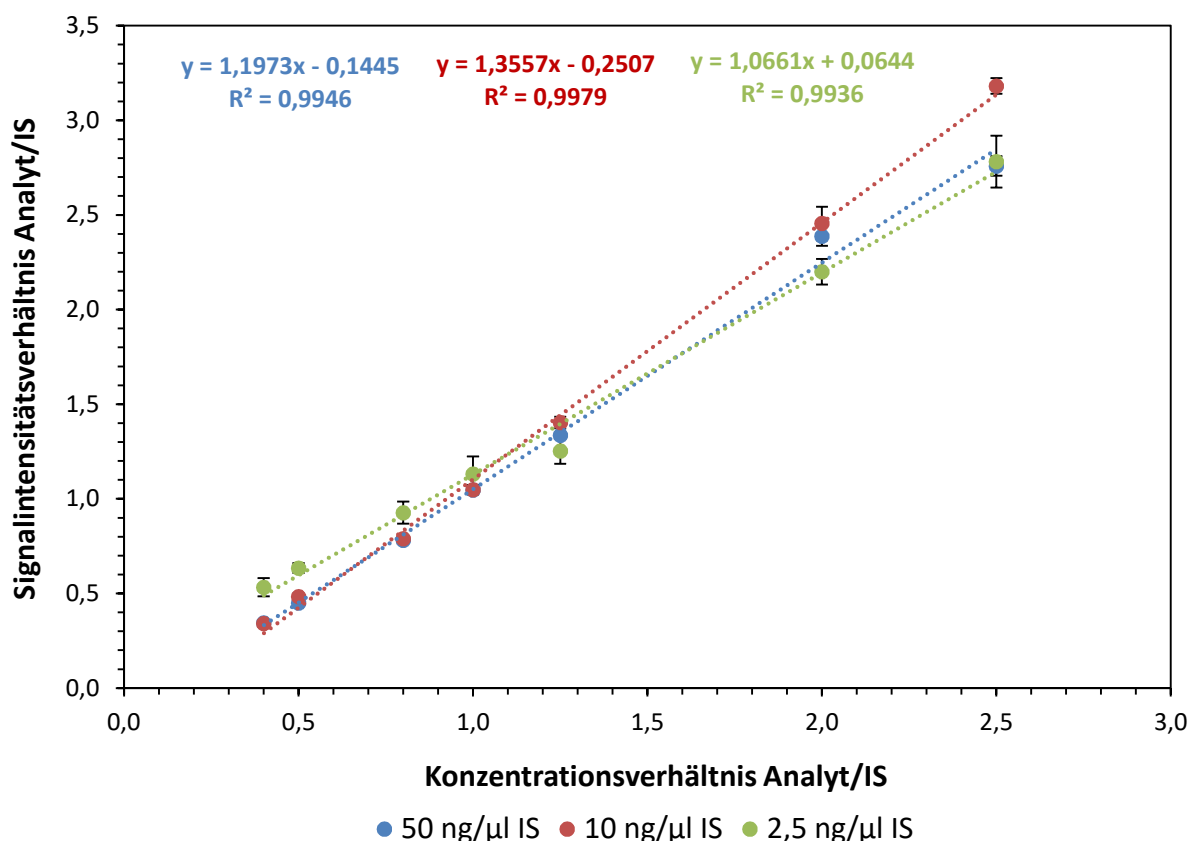


Abbildung 23: Regressionsanalyse der in Blutplasma nach Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion bestimmten Signalintensitätsverhältnisse für Analyt und internen Standard.

Wie bereits in den beiden vorhergehenden Versuchen konnte anhand der für die verschiedenen Konzentrationen des internen Standards erhaltenen Regressionsgeraden ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentrations- und Signalintensitätsverhältnis für den jeweiligen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Auch die Anstiege der drei Regressionsgeraden zeigten untereinander wieder begrenzte Abweichungen, sie stimmten aber hinsichtlich der Größe des Anstiegs und des Abweichungsbereichs gut überein. Die Abweichungen waren vermutlich wieder Ausdruck der Streuung der Messwerte, weshalb auf Basis der Daten eine für alle drei Konzentrationen des internen Standards gemeinsame Regressions- bzw. Kalibrierfunktion ($y = 1,2064 \cdot x - 0,1103$, $R^2 = 98,47$) erstellt wurde. Diese stimmt mit der gemeinsamen Kalibrierfunktion aus den vorherigen beiden Versuchen gut überein. Demnach hat weder die Gegenwart von Blutplasma noch die Durchführung einer Festphasenextraktion in dem untersuchten Bereich der Konzentrationsverhältnisse Einfluss auf die Signalintensitätsverhältnisse.

Mit Hilfe der gemeinsamen Kalibrierfunktion wurde die Richtigkeit für jedes Konzentrationsverhältnis von Analyt und internem Standard bestimmt (Tabelle 24 **Abbildung 22**).

Tabelle 24 – Richtigkeit der experimentell bestimmten Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS in Blutplasma nach Festphasenextraktion

	[c] _{IS, nominell} (ng/μl)	[c] _{Analyt, nominell} /[c] _{IS, nominell}						
		0,4	0,5	0,8	1,0	1,25	2,0	2,5
I _{Analyt/IS}	2,5	0,53	0,63	0,93	1,13	1,25	2,20	2,78
	10,0	0,34	0,48	0,79	1,05	1,40	2,46	3,18
	50,0	0,35	0,45	0,78	1,05	1,34	2,39	2,76
[c] _{Analyt, exp.} / [c] _{IS, exp.}	2,5	0,53	0,62	0,86	1,03	1,13	1,91	2,40
	10,0	0,37	0,49	0,75	0,96	1,25	2,13	2,73
	50,0	0,38	0,46	0,74	0,96	1,20	2,07	2,38
Richtigkeit (%)	2,5	133,3	123,4	107,4	103,0	90,4	95,7	95,9
	10,0	93,4	98,4	93,2	96,0	100,3	106,3	109,1
	50,0	94,4	92,9	92,4	95,9	95,9	103,5	95,1

Abweichungen der Richtigkeit von mehr als ±15 % wurden lediglich für die beiden kleinsten Analyt-Konzentrationen der Proben mit 2,5 ng/μl internem Standard erhalten. Grundsätzliche Tendenzen konnten anhand der Richtigkeit, im Unterschied zu den beiden vorhergehenden Versuchen, nicht abgelesen werden.

Auch für die Proben mit gleicher Konzentration von Analyt und internem Standard wurden Massensignale mit ähnlicher Intensität erhalten. Dies verdeutlicht, dass die in den vorherigen Versuchen beobachtete unspezifische Adsorption die Messergebnisse des vorliegenden Versuchs nicht oder nur sehr begrenzt beeinträchtigt hat. Eine Erklärung hierfür bietet die Vorbereitung der Proben für die Festphasenextraktion. Diese umfasst insbesondere die Denaturierung mit 5,0 M GdmCl, wodurch die Prozesse der unspezifischen Adsorption weitgehend eliminiert werden.

Da die in Blutplasma bestimmten Signalintensitätsverhältnisse daher eine besonders geringe Streuung aufweisen, ermöglicht die gemeinsame Kalibrierfunktion eine gute Anpassung der Messdaten. Darauf weist auch das Bestimmtheitsmaß von 98,47 % hin.

5.2.2.4 Zusammenfassung

Für jeden der durchgeführten Versuche konnte eine gemeinsame Kalibrierfunktion zur Auswertung der mit verschiedenen Konzentrationen des internen Standards bestimmten Signalintensitätsverhältnisse erstellt werden. Weder Festphasenextraktion noch die Verwendung von humanem Blutplasma als biologische Matrix hatten einen nachweisbaren Einfluss auf diese Kalibrierfunktionen. Allerdings waren die gewählten Konzentrationsbereiche auch sehr klein. Sie umfassten lediglich das 2,5-fache Konzentrationsverhältnis von Analyt und internem Standard. Aus diesem Grund konnten die

Messdaten vermutlich auch mittels linearer Regression ausgewertet werden, während in verschiedenen Arbeiten, die zur MALDI-TOF-basierten Quantifizierung veröffentlicht wurden, Potenzfunktionen genutzt wurden [48; 78]. In diesen Arbeiten wurden jedoch deutlich größere Konzentrationsbereiche untersucht (bis zu 10-faches Konzentrationsverhältnis von Analyt und internem Standard). Durch den Einsatz einer Potenzfunktion ($y = 1,0746 \cdot x^{1,086}$) zur Auswertung der Messdaten des zuletzt beschriebenen Versuchs (Kalibrierfunktion in Blutplasma nach Festphasenextraktion) konnte hingegen keine Verbesserung erzielt werden ($R^2 = 97,48 \%$). Daher wurde für die Quantifizierung von CAAP48 in humanen Blutplasmaproben von Sepsispatienten die Kalibrierfunktion $y = 1,2064 \cdot x - 0,1103$ verwendet. Die Festlegung des Quantifizierungsbereichs erfolgte anhand der Signalintensitätsverhältnisse (minimal 0,25 und maximal 3,5). Innerhalb dieses Bereichs der Signalintensitätsverhältnisse kann CAAP48 demnach mit Hilfe der linearen Kalibrierfunktion quantifiziert werden.

5.2.3 Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode

Für die Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von humanem CAAP48 wurden insgesamt drei synthetische Peptide verwendet: CAAP48_{syn} (synthetisches Analogon der endogenen Form) sowie CAAP48-4xF(D₅) und CAAP48-3xV als interne Standards.

Der Einbau von vier Phenylalanin-Bausteinen, deren Ringprotonen gegen Deuterium ausgetauscht waren, lieferte den internen Standard CAAP48-4xF(D₅). Die Massendifferenz zwischen CAAP48 und CAAP48-4xF(D₅) betrug 20,1 Da, weshalb das Isotopenmuster des Letzteren mit dem des Natrium-Addukts (+22 Da) von CAAP48 überlagerte. Aus dieser Überlagerung resultierten Interferenzen zwischen den Massenübergängen, die eine Verwendung von CAAP48-4xF(D₅) als internen Standard ausschlossen und die Entwicklung einer Alternative notwendig machten.

Da in der Sequenz von CAAP48 über die vier Phenylalanin-Reste hinaus keine weiteren zu finden sind, konnte die Anzahl der deuterierten Aminosäurereste nicht einfach erhöht werden. Stattdessen wurde der Austausch von Isoleucin- und Leucin-Resten gegen Valin als Alternative betrachtet. Die im Vergleich mit CAAP48 deutlich geringere Masse von CAAP48-3xV (Differenz -42,1 Da) verminderte die Gefahr von Interferenzen zwischen Analyt und internem Standard erheblich.

CAAP48-3xV weist darüber hinaus im Vergleich zum Analyten geringfügig andere physikochemische Eigenschaften auf (siehe Abschnitt 4.1). Dies zeigt sich vor allem in einer leicht verringerten Hydrophobizität, welche bei Verwendung einer C₁₈-Phase zu unterschiedlichen Retentionszeiten führt, was eine chromatographische Trennung ermöglicht und damit die Gefahr von Interferenzen weiter verringert.

Von großer Bedeutung für die Probenvorbereitung sowie die nachfolgende massenspektrometrische Analyse sind der Ladungszustand bei einem bestimmten pH-Wert sowie die Ionisierungseigenschaften. In beiden Punkten besitzen Analyt und CAAP48-3xV

Ergebnisse

identische Eigenschaften. Einzig CAAP48-3xV wurde daher als interner Standard für die Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode für CAAP48 in humanem Blutplasma verwendet.

5.2.3.1 Entwicklung einer MS/MS-Methode

Der erste Schritt in der Entwicklung einer MS/MS-Methode für CAAP48 und CAAP48-3xV bestand in der Aufnahme von Q1-Scans. Dazu wurden beide Peptide nacheinander mit Hilfe einer Spritzenpumpe in die Ionenquelle des Tripelquadrupol-Massenspektrometers infundiert, mittels Elektrospray ionisiert und schließlich Massenspektren mit den Signalen der intakten Molekül-Ionen aufgenommen (Methode = „Q1 MS“, Polarität = Positiv, Scan-Modus = „Profile“, Schrittweite = 0,1 Da, Auflösung (Q1) = „Unit“). Der Q1-Scan für CAAP48_{syn} ist in Abbildung 24 dargestellt.

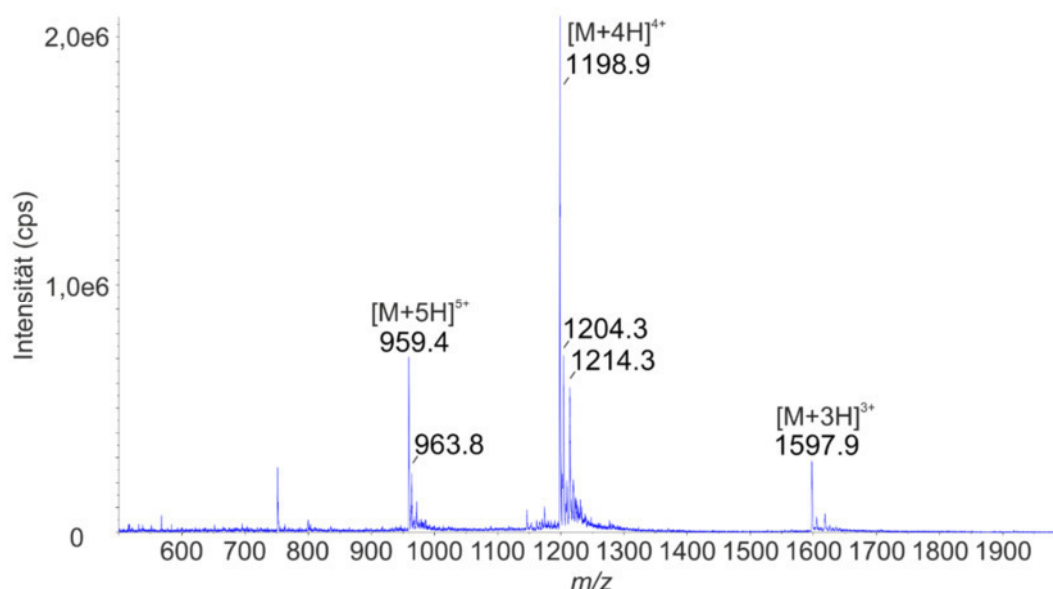


Abbildung 24: Q1-Scan von CAAP48_{syn} im Massenbereich von m/z 500-2000.

In dem für CAAP48_{syn} aufgenommenen Massenspektren wurden insgesamt drei verschiedene Ladungszustände beobachtet, wobei das Signal für das vierfach positiv geladene Molekül-Ion ($[M+4H]^{4+}$) die höchste Intensität aufwies (Tabelle 25).

Tabelle 25 – Massen und Ladungszustände von CAAP48_{syn}

	$[M_{Avg}+3H]^{3+}$	$[M_{Avg}+4H]^{4+}$	$[M_{Avg}+5H]^{5+}$
$m/z_{theoretisch}$	1597,6	1198,4	959,0
$m/z_{experimentell}$	1597,9	1198,9	959,4
Intensität (cps)	ca. $3,0 \cdot 10^5$	ca. $2,1 \cdot 10^6$	ca. $7,0 \cdot 10^5$

Für CAAP48-3xV wurden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten. Der entsprechende Q1-Scan für ist in Abbildung 25 dargestellt.

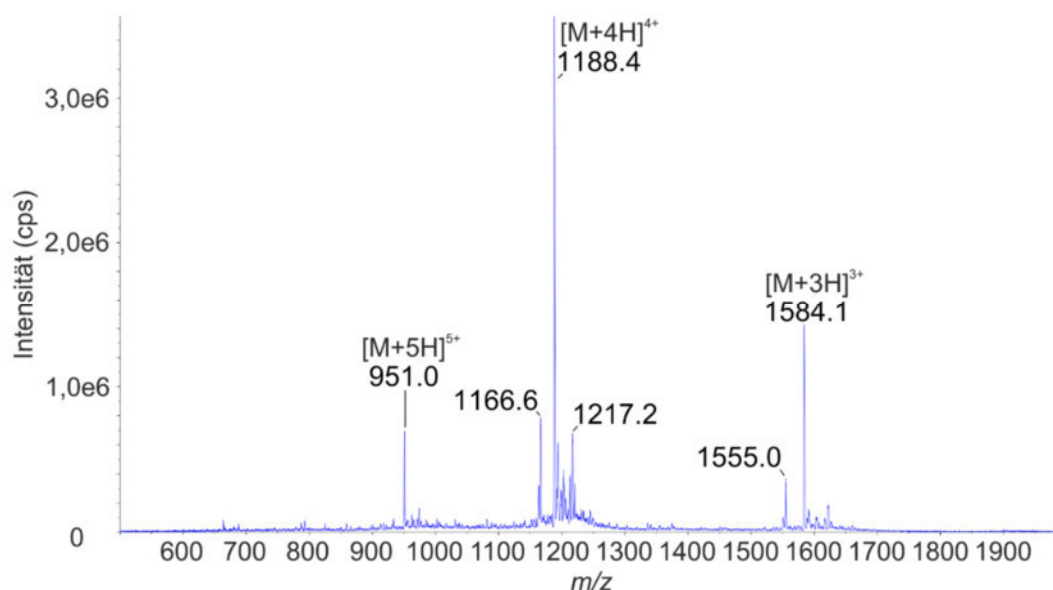


Abbildung 25: Q1-Scan von CAAP48-3xV im Massenbereich von m/z 500-2000.

Insgesamt drei verschiedene Ladungszustände konnten in dem für CAAP48-3xV aufgenommenen Massenspektren beobachtet werden, wobei ebenfalls das Signal für das vierfach positiv geladene Molekül-Ion ($[M+4H]^{4+}$) die höchste Intensität aufwies (Tabelle 26).

Tabelle 26 – Massen und Ladungszustände von CAAP48-3xV

	$[M_{\text{Avg}}+3H]^{3+}$	$[M_{\text{Avg}}+4H]^{4+}$	$[M_{\text{Avg}}+5H]^{5+}$
$m/z_{\text{theoretisch}}$	1583,6	1187,9	950,5
$m/z_{\text{experimentell}}$	951,0	1188,4	951,0
Intensität (cps)	$1,4 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^5$

Versuchsweise wurden auch Q1-Scans mit negativer Polarität aufgenommen. Selbst die intensivsten Signale der Molekül-Ionen wiesen im Vergleich zu den Signalen in den mit positiver Polarität aufgenommenen Massenspektren eine um den Faktor 100 verringerte Intensität auf. Der Ansatz, die Quantifizierung von CAAP48 im negativen Modus durchzuführen, wurde daher verworfen.

Sowohl für CAAP48_{syn} (m/z 1198,9, $z = 4$) als auch für CAAP48-3xV (m/z 1188,4, $z = 4$) zeigte das vierfach geladene Molekül-Ion die höchste Signalintensität, weshalb es jeweils als Vorläufer-Ion für den nächsten Schritt der Methodenentwicklung, die Aufnahme eines Produkt-Ionen-Scans, ausgewählt wurde. Zuvor wurden jedoch für beide Molekül-Ionen zwei

Ergebnisse

Geräteparameter optimiert, das „*Declustering Potential*“ (DP) sowie das „*Entrance Potential*“ (EP). Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Bestimmung des Optimums des DP und im Anschluss des EP (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27 – Optimierung von Geräteparametern der Vorläufer-Ionen

Potential	Optimierungsbereich	Optimum für $[M+4H]^{4+}$ von	
		CAAP48 _{syn}	CAAP48-3xV
„ <i>Declustering Potential</i> “ (DP)	0-200 V	120 V	120 V
„ <i>Entrance Potential</i> “ (EP)	0-12 V	12 V	12 V

Der Produkt-Ionen-Scan umfasste die Auswahl des Vorläufer-Ions mit der höchsten Intensität und dessen gezielte Fragmentierung in der Kollisionszelle des Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers (Methode = „*MS2*“, Polarität = Positiv, Scan-Modus = „*Profile*“, Schrittweite = 0,1 Da, Auflösung (Q1 und Q3) = „*Unit*“). In Abbildung 26 und Abbildung 27 sind die Produkt-Ionen-Scans für das vierfach geladene Molekül-Ion von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV dargestellt.

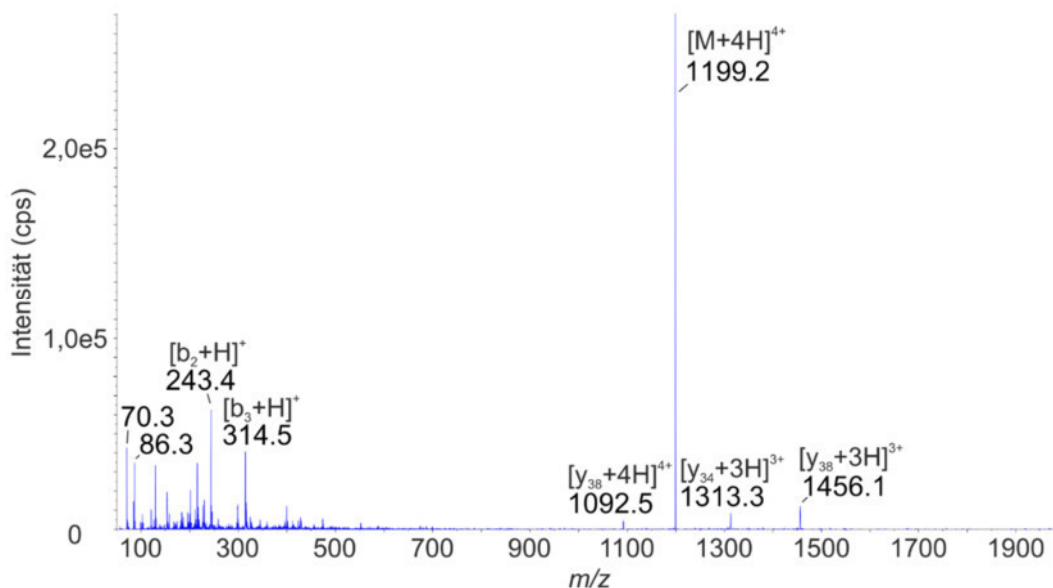


Abbildung 26: Produkt-Ionen-Scan des vierfach geladenen Molekül-Ions von CAAP48_{syn} (m/z 1198,9) im Massenbereich von m/z 50-2000.

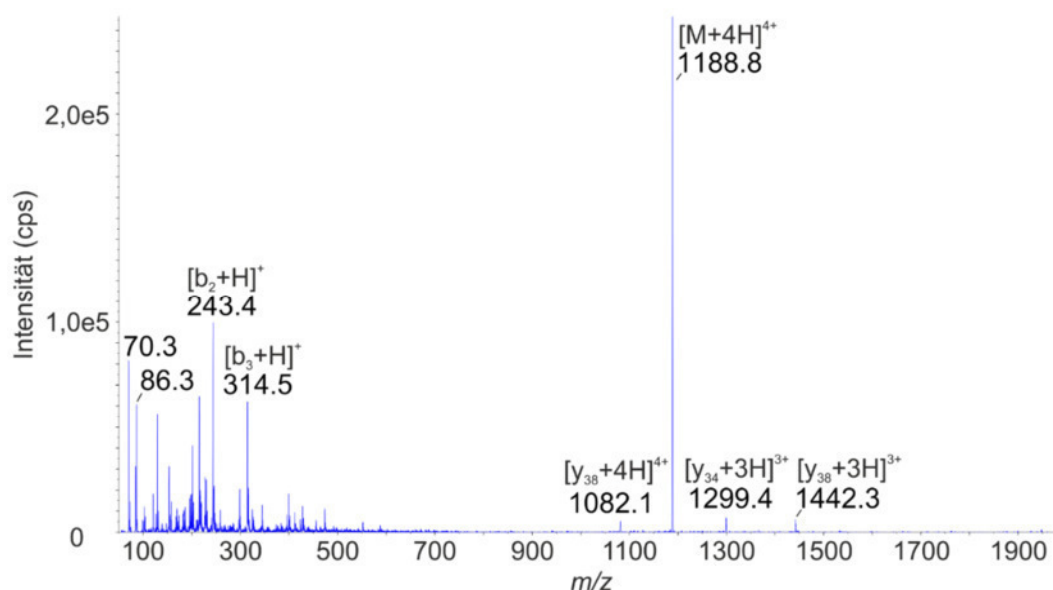


Abbildung 27: Produkt-Ionen-Scan des vierfach geladenen Molekül-Ions von CAAP48-3xV (m/z 1188,4) im Massenbereich von m/z 50-2000.

In den für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV aufgenommenen Scans wurden jeweils etwa 20 Signale für Produkt-Ionen beobachtet, von denen die mit der höchsten Intensität in Tabelle 28 aufgeführt sind.

Tabelle 28 – Produkt-Ionen für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV

Vorläufer-Ionen			Produkt-Ionen			
Peptid	m/z _{experimentell}	z	m/z _{experimentell}	m/z _{theoretisch} ²⁷	z	Art ²⁸
CAAP48	1198,9	4	1456,1	1455,4	3	γ_{38} -Ion ²⁹
CAAP48-3xV	1188,4	4	1442,4	1441,4	3	γ_{38} -Ion ³⁰
CAAP48	1198,9	4	1313,2	1312,6	3	γ_{34} -Ion ³¹
CAAP48-3xV	1188,4	4	1299,3	1298,5	3	γ_{34} -Ion ³²
CAAP48	1198,9	4	1092,7	1091,8	4	γ_{38} -Ion ²⁹
CAAP48-3xV	1188,4	4	1082,0	1081,3	4	γ_{38} -Ion ³⁰

²⁷ Berechnet mit Hilfe der relativen Molekülmasse.

²⁸ Bezeichnung orientiert sich an Roepstorff *et al.* [79].

²⁹ H₃N⁺-PMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK-OH

³⁰ H₃N⁺-PMSIPPEVKFNKPFVFMVEQNTKSPVFMGKVVNPTQK-OH

³¹ H₃N⁺-PPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK-OH

³² H₃N⁺-PPEVKFNKPFVFMVEQNTKSPVFMGKVVNPTQK-OH

Tabelle 28 – Produkt-Ionen für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (Fortsetzung)

Vorläufer-Ionen			Produkt-Ionen			
Peptid	$m/z_{\text{experimentell}}$	z	$m/z_{\text{experimentell}}$	$m/z_{\text{theoretisch}}^{27}$	z	Art ²⁸
CAAP48	1198,9	4	314,5	314,4	1	b ₃ -Ion ³³
CAAP48-3xV	1188,4	4				
CAAP48	1198,9	4	243,4	243,3	1	b ₂ -Ion ³⁴
CAAP48-3xV	1188,4	4				
CAAP48	1198,9	4	86,3	86,2	1	Immonium-Ion (Ile, Leu)
CAAP48-3xV	1188,4	4				
CAAP48	1198,9	4	70,2	70,1	1	Immonium-Ion (Pro)
CAAP48-3xV	1188,4	4				

Für diese Produkt-Ionen sollte der Fragment-Ionen-Typ sowie die entsprechende Aminosäuresequenz bestimmt werden. Dazu wurden als erstes die experimentell bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse mit den Werten der theoretisch möglichen Fragment-Ionen verglichen. Die Auswahl geeigneter Fragment-Ionen orientierte sich dabei vor allem an der Tatsache, dass bei der Fragmentierung von Peptiden mittels CID hauptsächlich b- und y-Ionen entstehen. Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs konnte den intensivsten Produkt-Ionen der entsprechende Fragment-Ionen-Typ sowie eine Struktur zugeordnet werden.

Die Massengenauigkeit insbesondere bei den größeren Produkt-Ionen war jedoch begrenzt (Abweichungen von teilweise bis zu 0,9 Da), weshalb die Übereinstimmung von experimentell ermitteltem und theoretischem Masse-zu-Ladungsverhältnis nicht allein als Bestätigung für die Richtigkeit der zugeordneten Struktur dienen konnte. Für die sichere Zuordnung des Fragment-Ionen-Typs sowie der Aminosäuresequenz wurden daher die vier intensivsten Produkt-Ionen von CAAP48_{syn} mittels MS³ analysiert (Methode = „MS3“, Polarität = Positiv, Scan-Modus = „Profile“, Schrittweite = 0,08 Da, Auflösung (Q1) = „Unit“, Auflösung (Q3) = „LIT“, Scan-Rate = 4000 Da/s, „Dynamic Fill Time“ = Aktiviert, Anregungszeit = 0,1). Die entsprechenden Fragmentspektren für CAAP48_{syn} sind in Abbildung 28 bis Abbildung 32 dargestellt.

³³ H₂N-LEA⁺³⁴ H₂N-LE⁺

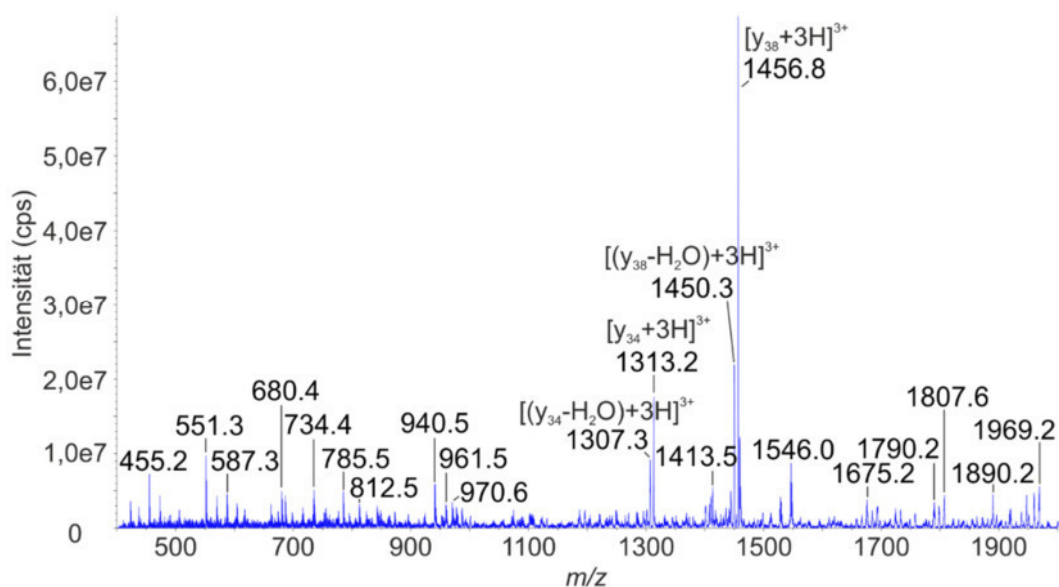


Abbildung 28: MS³-Spektrum des Fragment-Ions m/z 1456,1 ($z = 3$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48_{syn}.

In dem für m/z 1456,1, dem vermutlichen y_{38} -Ion, aufgenommenen MS³-Spektrum wurde ein intensives Signal für m/z 1313,2 beobachtet. Letzteres trat bereits im Produktionen-Scan auf und wurde anhand seines Masse-zu-Ladungsverhältnisses als dreifach geladenes y_{34} -Ion annotiert. Der Nachweis eines Signals bei m/z 1313,2 im MS³-Spektrum für m/z 1456,1 ist ein deutlicher Hinweis auf eine enge strukturelle Verwandtschaft.

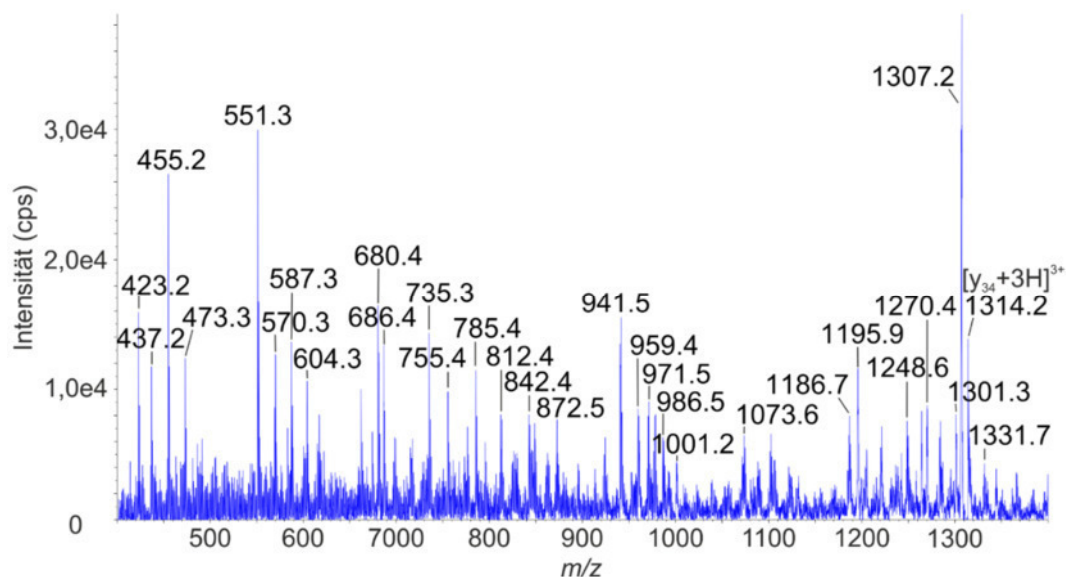


Abbildung 29: Massenbereich m/z 400-1400 des MS³-Spektrum des Fragment-Ions m/z 1313,2 ($z = 3$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48_{syn}.

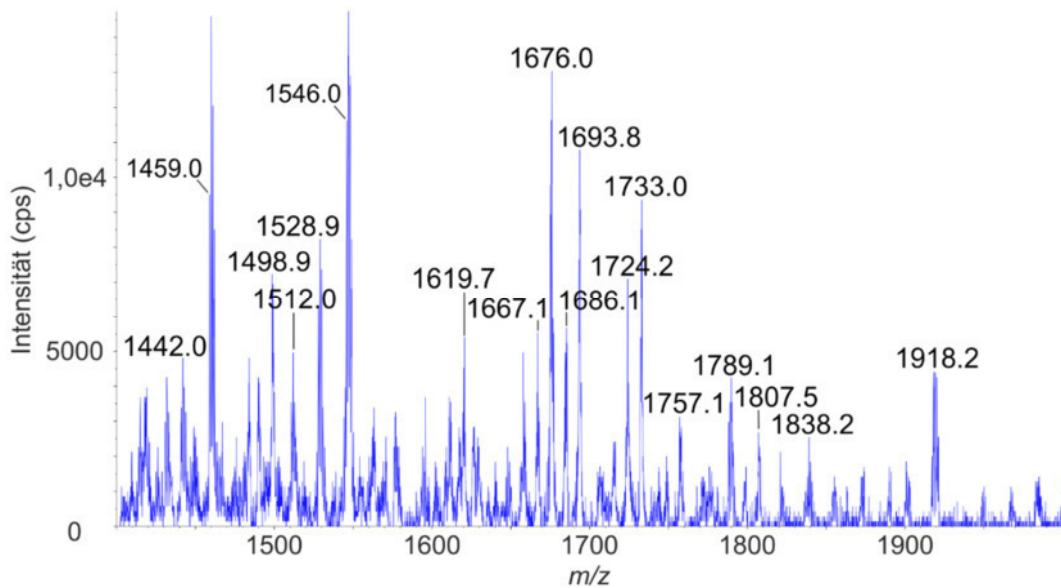


Abbildung 30: Massenbereich m/z 1400-2000 des MS^3 -Spektrum des Fragment-Ions m/z 1313,2 ($z = 3$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48_{syn}.

Die MS^3 -Analyse von m/z 1313,2 lieferte wiederum ein Fragmentspektrum, in welchem nahezu die gleichen Fragment-Ionen-Signale auftraten wie im MS^3 -Spektrum für m/z 1456,1. Damit ist eine weitgehende Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen beider Fragment-Ionen gesichert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei m/z 1456,1 und m/z 1313,2 also um das jeweils dreifach geladene y_{38} - und y_{34} -Fragment-Ion.

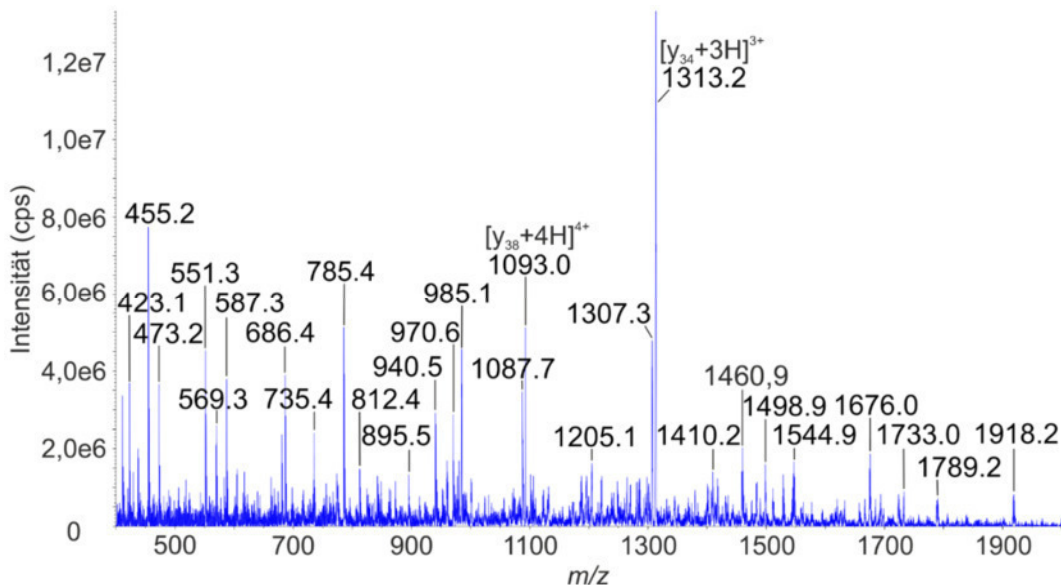


Abbildung 31: MS^3 -Spektrum des Fragment-Ions m/z 1092,7 ($z = 4$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48_{syn}.

Weitere Bestätigung erfährt diese Annahme durch das MS³-Spektrum von m/z 1092,7, in welchem m/z 1313,2 als intensivstes Signal beobachtet wurde. Bereits im MS³-Spektrum für m/z 1456,1 wurde ein intensives Signal für das dreifach geladene γ_{34} -Ion beobachtet. Es erscheint daher sinnvoll, m/z 1092,7 als das vierfach geladene γ_{38} -Ion zu annotieren. Außerdem traten alle weiteren im MS³-Spektrum von m/z 1092,7 erfassten Fragment-Ionen-Signale auch in den MS³-Spektren der dreifach geladenen γ_{38} - und γ_{34} -Ionen auf. Eine enge strukturelle Verwandtschaft ist also offensichtlich. Die Zuordnung von m/z 1092,7 als vierfach geladenes γ_{38} -Ion erscheint daher sinnvoll.

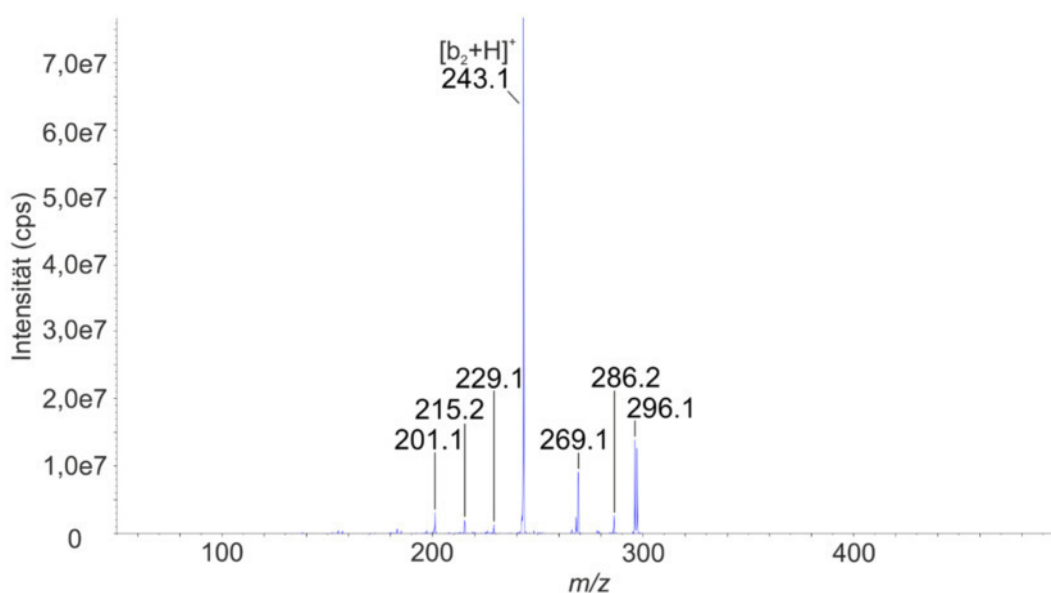


Abbildung 32: MS³-Spektrum des Fragment-Ions m/z 314,5 ($z = 1$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48_{syn}.

Bei den kleineren Fragmenten war es nur für m/z 314,5 möglich ein MS³-Spektrum aufzunehmen. In diesem wurde ein intensives Fragment-Ionensignal bei m/z 243,4 beobachtet, was auf die enge strukturelle Verwandtschaft von m/z 314,5 mit dem bereits beim Produkt-Ionen-Scan beobachteten m/z 243,4 hindeutet. Demzufolge handelt es sich bei m/z 314,5 vermutlich um das b_3 -Ion und bei m/z 243,4 um das b_2 -Ion von CAAP48.

Die beiden kleinsten Fragment-Ionen m/z 86,3 und m/z 70,2 entstanden höchstwahrscheinlich durch die Freisetzung einzelner Aminosäurereste an den für die Bildung der zuvor beschriebenen b- und γ -Ionen notwendigen Bruchstellen. Sowohl in N- als auch in C-terminaler Richtung finden sich an den Bruchstellen lediglich Prolin- und Isoleucin-Reste. Werden diese infolge der Fragmentierung als einzelne Moleküle freigesetzt, kann es zu einer strukturellen Umlagerung kommen. Dadurch wird eine stabile Ionenspezies gebildet, die als Immonium-Ion bezeichnet wird und für welche die eingangs erwähnten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse charakteristisch sind.

Ergebnisse

Für CAAP48-3xV wurden zur Identifizierung der beobachteten Produkt-Ionen keine MS³-Spektren aufgenommen. Durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit mit CAAP48 konnten die Ergebnisse, die bei dessen MS³-Analyse ermittelt wurden, auf CAAP48-3xV übertragen werden.

Auf Basis der beobachteten Vorläufer- und Produkt-Ionen wurden nun MRM-Übergänge festgelegt, für welche im Anschluss eine Optimierung der „Collision Energy“ (CE) zwischen 0 V und 130 V und des „Collision Cell Exit Potential“ (CXP) zwischen 0 V und 55 V erfolgte. Die festgelegten MRM-Übergänge für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV, die ermittelten Optima sowohl für CE als auch CXP sowie die mittels EIC bestimmten Intensitäten der MRM-Übergänge sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29 – Optimierte MRM-Übergänge für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV

Peptid	MRM-Übergang	Verweilzeit (s)	CE (V)	CXP (V)	Intensität (CPS)
CAAP48	1198,9→1456,1	0,25	50,0	29,0	3,1 · 10 ⁵
CAAP48-3xV	1188,4→1442,4	0,20	49,0	34,0	2,8 · 10 ⁵
CAAP48	1198,9→1313,3	0,25	52,5	26,0	9,0 · 10 ⁴
CAAP48-3xV	1188,4→1299,3	0,20	53,0	32,0	1,7 · 10 ⁵
CAAP48	1198,9→1092,5	0,25	49,0	22,0	6,0 · 10 ⁴
CAAP48-3xV	1188,4→1082,0	0,20	50,0	30,0	1,4 · 10 ⁵
CAAP48	1198,9→314,5	0,25	59,0	7,0	1,7 · 10 ⁵
CAAP48-3xV	1188,4→314,5	0,20	59,0	18,0	1,2 · 10 ⁵
CAAP48	1198,9→243,4	0,25	82,0	4,0	2,1 · 10 ⁵
CAAP48-3xV	1188,4→243,4	0,20	80,0	19,0	2,4 · 10 ⁵
CAAP48	1198,9→86,3	0,25	130,0	6,0	2,6 · 10 ⁵
CAAP48-3xV	1188,4→86,3	0,20	130,0	6,0	1,9 · 10 ⁵
CAAP48	1198,9→70,2	0,25	130,0	4,0	3,3 · 10 ⁵
CAAP48-3xV	1188,4→70,2	0,20	130,0	5,0	4,1 · 10 ⁵

Für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV wurden jeweils sieben MRM-Übergänge bestimmt und optimiert. Die beiden intensivsten Übergänge wurden als „Quantifier“ und „Qualifier“ in eine vorläufige MRM-Methode übernommen (siehe Tabelle 30). Diese bildete die Grundlage für die Entwicklung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode.

Tabelle 30 – Vorläufige MRM-Methode

Peptid	MRM-Übergang	Verweilzeit (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	
CAAP48 _{syn}	„Quantifier“	1198,9→70,2	0,35	120	12	130	4
CAAP48-3xV		1188,4→70,2	0,35	120	12	130	4
CAAP48 _{syn}	„Qualifier“	1198,9→1456,1	0,35	120	12	50	29
CAAP48-3xV		1188,4→1442,4	0,35	120	12	50	29

5.2.3.2 Entwicklung und Optimierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode

Der erste Schritt zur Entwicklung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode bestand in der Analyse der analytischen Interferenz. Dabei wurde untersucht, ob und wie stark die Massenübergänge von CAAP48 und CAAP48-3xV interferieren. Der entsprechende Versuch umfasste zunächst die Herstellung von jeweils einer Probe für CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus ACN/H₂O/NH₄OH (500/500/5; v/v/v), wobei die Konzentration der beiden Standardpeptide jeweils 5,0 ng/μl betrug. Von jeder Probe wurden im Anschluss 3 x 5 μl injiziert, mit Hilfe eines linearen HPLC-Gradienten (Tabelle 31 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) und einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt (Länge der Chromatographiesäule: 100 mm) sowie unter Nutzung der vorläufigen MRM-Methode analysiert.

Tabelle 31 – HPLC-Gradient zur Analyse der analytischen Interferenz

Zeit (min)	A1 (%)	B1 (%)
0,0	85	15
2,0	85	15
10,0	5	95
11,0	5	95
12,0	85	15
14,0	85	15

Das für CAAP48_{syn} aufgenommene „Extracted Ion Chromatogram“ (EIC) ist in Abbildung 33 dargestellt. Für die Auswertung wurden lediglich die absoluten Signalfächen jedes einzelnen MRM-Übergangs verwendet.

Ergebnisse

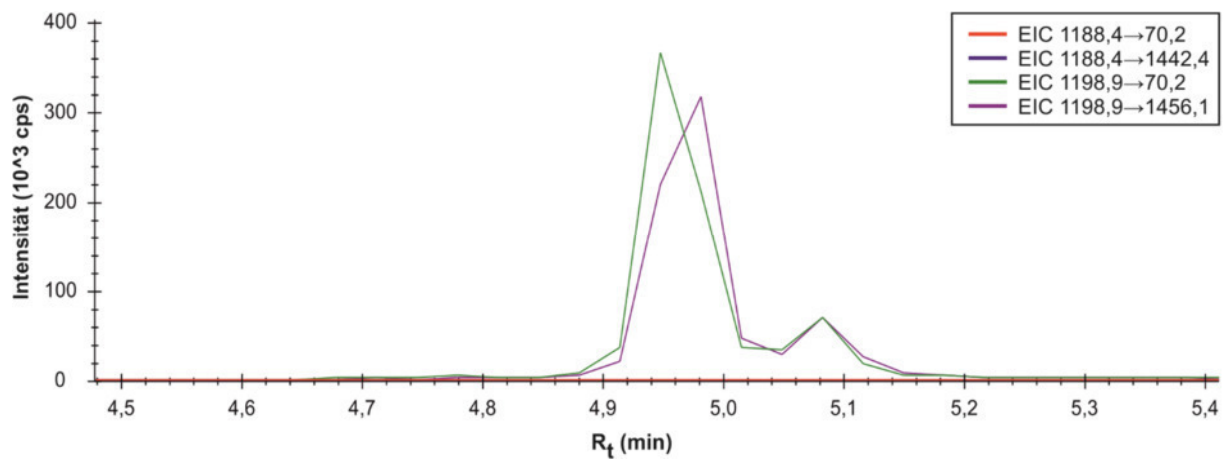


Abbildung 33: „Extracted Ion Chromatogram“ für CAAP48_{syn} (5,0 ng/μl).

Das „Extracted Ion Chromatogram“ für CAAP48_{syn} zeigt deutlich, dass zur Retentionszeit des Analyten keine Signale für die MRM-Übergänge des internen Standards beobachtet werden können. Die Auswertung der experimentellen Daten bestätigt diese Beobachtung: In Abwesenheit des internen Standards wurde für diesen ein MRM-Signal erhalten (zur Retentionszeit des Analyten), dass im Mittel lediglich 0,5 % der Signalfäche des Analyten umfasste (Tabelle 32).

Tabelle 32 – Analytische Interferenz für CAAP48

#	MRM-Übergang	[c] (ng/μl)		R _t (min)		MRM-Signalfäche („Counts“)		MRM-Signalfäche IS/Analyt (%)
		Analyt	IS	Analyt	IS	Analyt	IS	
1	1188,4→70,2 und 1198,9→70,2 („Quantifier“)	5,0	0	4,96	4,94	1,79 · 10 ⁶	1,32 · 10 ⁴	0,74
2				4,97	4,95	1,68 · 10 ⁶	1,44 · 10 ⁴	0,86
3				4,97	4,95	1,65 · 10 ⁶	1,51 · 10 ⁴	0,92
4				4,96	4,93	1,63 · 10 ⁶	1,46 · 10 ⁴	0,90
5				4,97	4,94	1,62 · 10 ⁶	1,84 · 10 ⁴	1,14
6				4,97	4,93	1,59 · 10 ⁶	1,49 · 10 ⁴	0,94
1	1188,4→1442,4 und 1198,9→1456,1 („Qualifier“)	5,0	0	4,97	4,95	1,67 · 10 ⁶	2,19 · 10 ³	0,13
2				4,97	4,97	1,56 · 10 ⁶	2,44 · 10 ³	0,16
3				4,97	4,96	1,58 · 10 ⁶	2,45 · 10 ³	0,16
4				4,97	4,95	1,55 · 10 ⁶	2,61 · 10 ³	0,17
5				4,97	4,96	1,56 · 10 ⁶	2,81 · 10 ³	0,18
6				4,97	4,95	1,54 · 10 ⁶	2,58 · 10 ³	0,17

Das für CAAP48-3xV erhaltene „*Extracted Ion Chromatogram*“ ist in Abbildung 34 dargestellt.

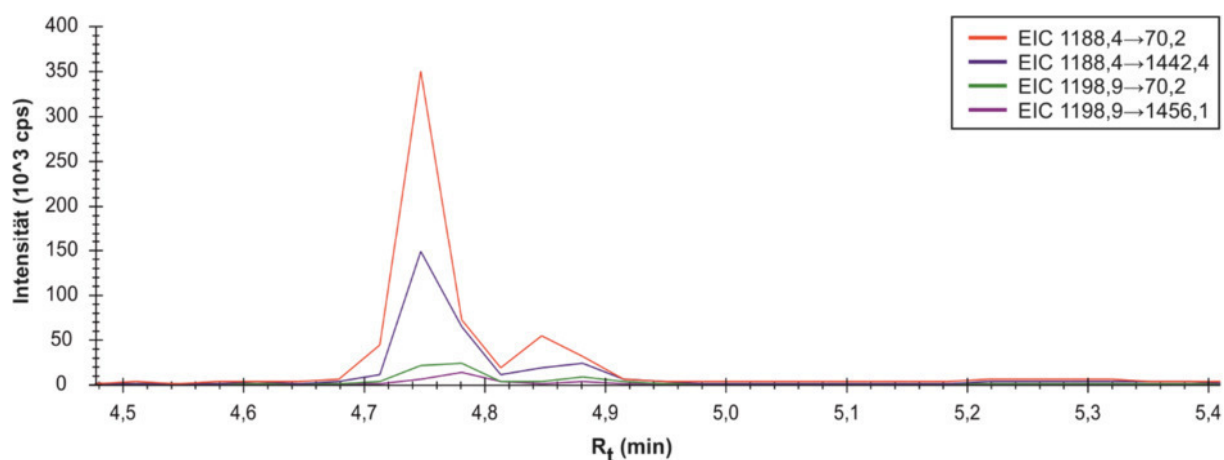


Abbildung 34: „*Extracted Ion Chromatogram*“ für CAAP48-3xV (5,0 ng/μl).

Bei der Betrachtung des „*Extracted Ion Chromatogram*“ wird deutlich, dass zur Retentionszeit des internen Standards CAAP48-3xV auch Signale für die MRM-Übergänge des Analyten CAAP48 beobachtet werden können. Da CAAP48 und CAAP48-3xV jedoch unterschiedliche Retentionszeiten besitzen (5,0 min bzw. 4,8 min), muss davon ausgegangen werden, dass die Interferenz auf den MRM-Übergängen des Analyten durch den internen Standard verursacht wird und nicht auf dessen Verunreinigung mit CAAP48_{syn} zurückgeführt werden kann. Wäre Letzteres der Fall, müssten die MRM-Signale für CAAP48 erst bei dessen Retentionszeit (5,0 min) zu sehen sein.

Die Daten zur Bestimmung der analytischen Interferenz des internen Standards sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33 – Analytische Interferenz für CAAP48-3xV

#	MRM-Übergang	[c] (ng/μl)		R _t (min)		MRM-Signalfläche („Counts“)		MRM-Signalfläche Analyt/IS (%)
		Analyt	IS	Analyt	IS	Analyt	IS	
1	1188,4→70,2 und 1198,9→70,2 („Quantifier“)	0	5,0	4,76	4,74	1,44 · 10 ⁵	1,24 · 10 ⁶	11,61
2				4,76	4,74	1,43 · 10 ⁵	1,26 · 10 ⁶	11,35
3				4,77	4,76	1,44 · 10 ⁵	1,22 · 10 ⁶	11,80
4				4,76	4,73	1,44 · 10 ⁵	1,14 · 10 ⁶	12,63
5				4,76	4,73	1,43 · 10 ⁵	1,15 · 10 ⁶	12,43
6				4,77	4,74	1,44 · 10 ⁵	1,12 · 10 ⁶	12,86

Tabelle 33 – Analytische Interferenz für CAAP48-3xV (Fortsetzung)

#	MRM-Übergang	[c] (ng/μl)		R _t (min)		MRM-Signalfläche („Counts“)		MRM-Signalfläche Analyt/IS (%)
		Analyt	IS	Analyt	IS	Analyt	IS	
1	1188,4→1442,4 und 1198,9→1456,1 („Qualifier“)	0	5,0	4,77	4,75	6,42 · 10 ⁴	6,22 · 10 ⁵	10,32
2				4,77	4,76	6,31 · 10 ⁴	6,25 · 10 ⁵	10,10
3				4,78	4,76	6,59 · 10 ⁴	5,93 · 10 ⁵	11,11
4				4,76	4,74	7,38 · 10 ⁴	6,01 · 10 ⁵	12,28
5				4,76	4,74	7,78 · 10 ⁴	6,13 · 10 ⁵	12,69
6				4,77	4,75	7,58 · 10 ⁴	5,84 · 10 ⁵	12,98

Der Vergleich der für Analyt und internen Standard bestimmten Signalflächen verweist darauf, dass trotz Abwesenheit des Analyten in der Probe für diesen ein MRM-Signal erhalten wurde, dass im Mittel etwa 12 % der Signalfläche des internen Standards umfasste. Dies gilt sowohl für die als „Qualifier“ als auch für die als „Quantifier“ genutzten MRM-Übergänge. Demnach konnte eine analytische Interferenz lediglich für den internen Standard nachgewiesen werden. Da die Interferenz aber nur zu dessen Retentionszeit auftritt und nicht bei der des Analyten, hat sie keinen Einfluss auf die Quantifizierung von CAAP48. Die chromatographische Trennung der MRM-Signale für Analyt und internen Standard sollte also jegliche Auswirkungen der Interferenz auf die Analysenergebnisse verhindern. Da die Intensität der MRM-Signale des internen Standards jedoch sehr hoch war, wurde dessen Konzentration in allen folgenden Experimenten von 5,0 ng/μl auf 2,5 ng/μl gesenkt. Dies verringerte gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit für die zumindest theoretisch möglichen nachteiligen Auswirkungen der analytischen Interferenz.

Der nächste Schritt zur Entwicklung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode bestand in der Optimierung des HPLC-Gradienten. Dazu wurden fünf verschiedene Gradienten (Tabelle 34) untersucht, wobei pro Gradient nacheinander 3 x 5 μl einer Mischung bestehend aus CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV gelöst in ACN/H₂O/NH₄OH (750/250/5; v/v/v)) injiziert wurden. Die Konzentration der beiden Standardpeptide betrug jeweils 10,0 ng/μl und die Auftrennung erfolgte für alle Gradienten mit einer Flussrate von 0,3 ml/min (Länge der Chromatographiesäule: 150 mm).

Tabelle 34 – Optimierung des HPLC-Gradienten

Gradient 2			Gradient 3			Gradient 4			Gradient 5			Gradient 6		
Zeit (min)	A1 (%)	B1 (%)	Zeit (min)	A1 (%)	B1 (%)	Zeit (min)	A1 (%)	B1 (%)	Zeit (min)	A1 (%)	B1 (%)	Zeit (min)	A1 (%)	B1 (%)
0,0	85	15	0,0	85	15	0,0	85	15	0,0	85	15	0,0	85	15
3,0	85	15	3,0	85	15	3,0	85	15	3,0	85	15	3,0	85	15
5,0	71	29	4,0	78	22	5,0	71	29	3,5	80	20	19,0	5	95
10,0	71	29	10,0	70	30	7,0	71	29	7,0	71	29	21,0	5	95
19,0	5	95	19,0	5	95	16,0	5	95	9,0	71	29	23,0	85	15
21,0	5	95	21,0	5	95	18,0	5	95	16,0	5	95	27,0	85	15
23,0	85	15	23,0	85	15	20,0	85	15	18,0	5	95			
27,0	85	15	27,0	85	15	23,0	85	15	20,0	85	15			
									23,0	85	15			

Die für jeden Gradient aufgezeichneten MRM-Übergänge von Analyt und internem Standard sind in Abbildung 35 bis Abbildung 39 dargestellt.

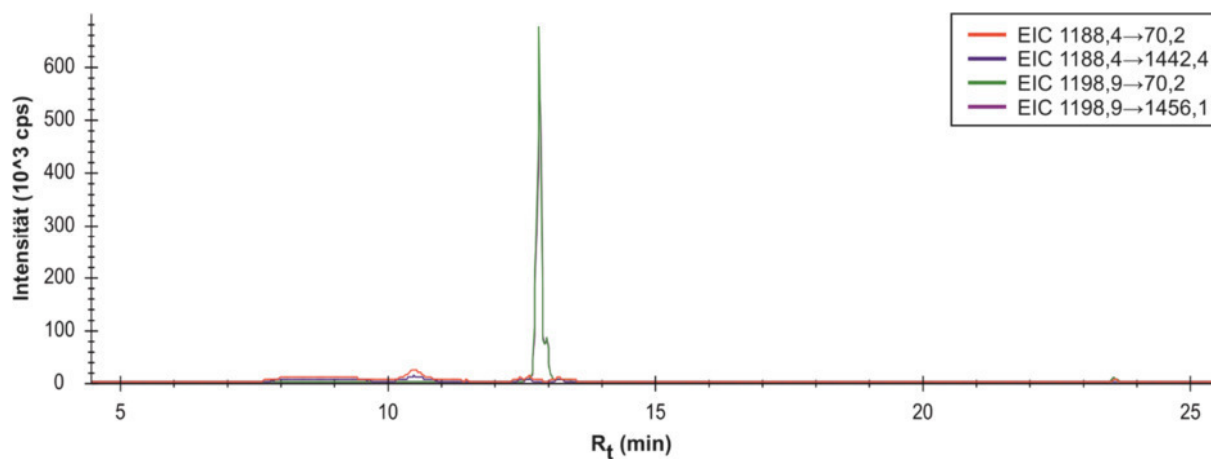


Abbildung 35: „Extracted Ion Chromatogram“ für eine mit Hilfe von Gradient 2 aufgetrennte Mischung von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl).

Ergebnisse

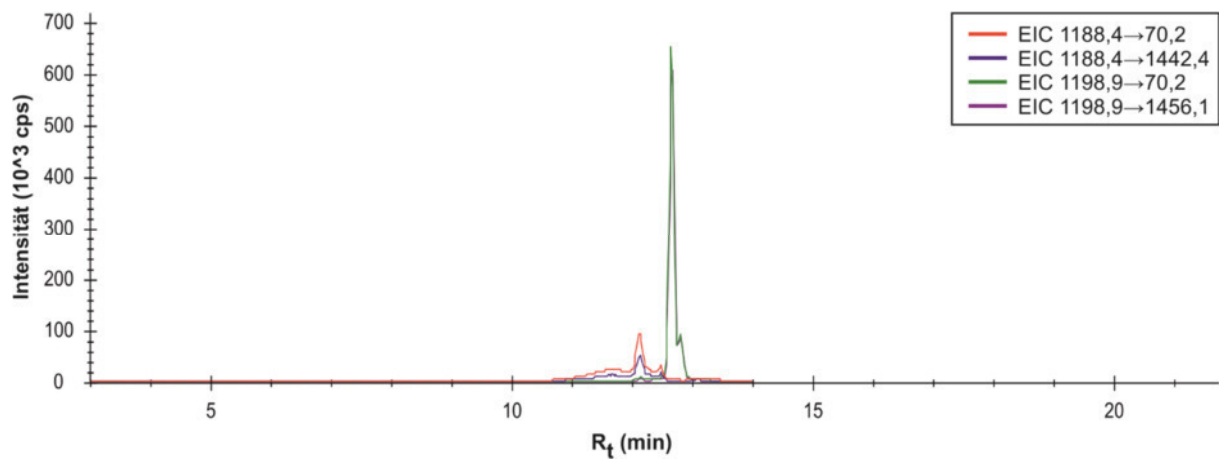


Abbildung 36: „Extracted Ion Chromatogram“ für eine mit Hilfe von Gradient 3 aufgetrennte Mischung von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/ μ l).

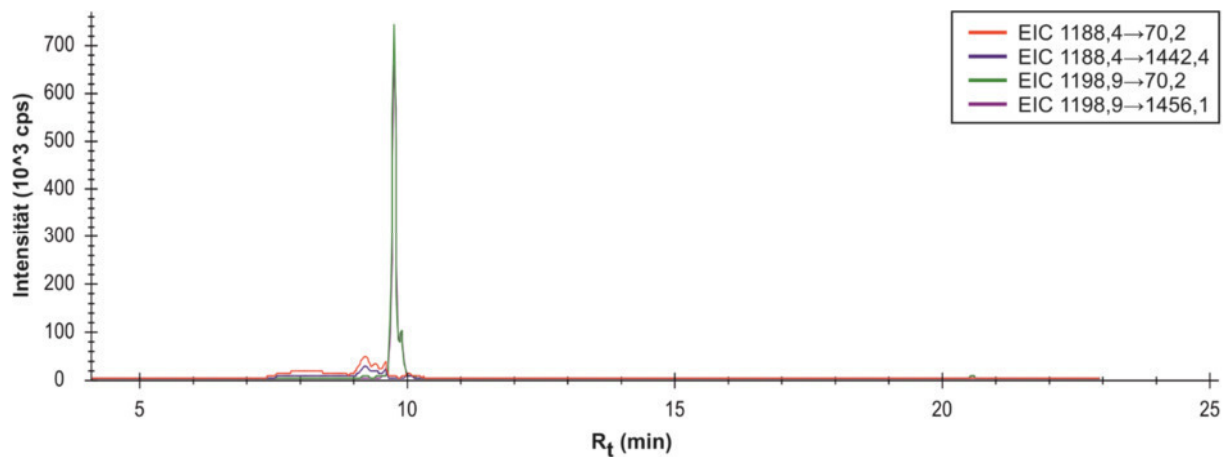


Abbildung 37: „Extracted Ion Chromatogram“ für eine mit Hilfe von Gradient 4 aufgetrennte Mischung von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/ μ l).

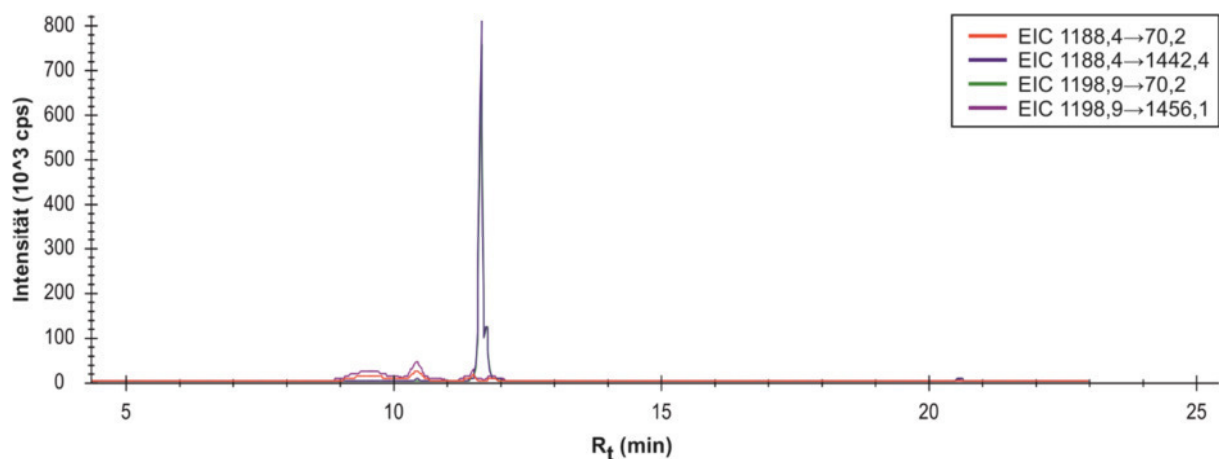


Abbildung 38: „Extracted Ion Chromatogram“ für eine mit Hilfe von Gradient 5 aufgetrennte Mischung von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/ μ l).

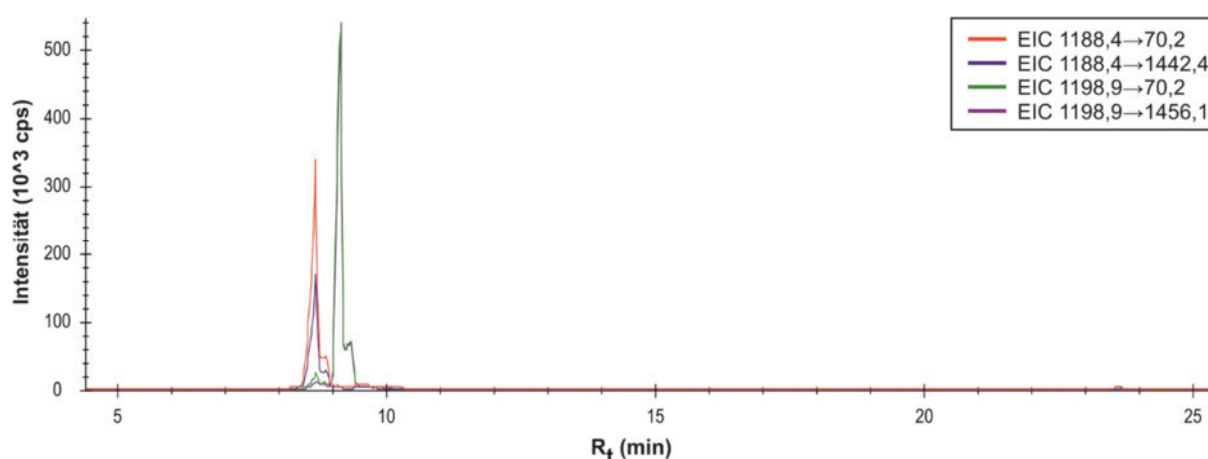


Abbildung 39: „*Extracted Ion Chromatogram*“ für eine mit Hilfe von Gradient 6 aufgetrennte Mischung von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl).

Für die Gradienten 2 bis 5 wurde insbesondere für die MRM-Übergänge des internen Standards eine drastische Signalverbreiterung und -aufspaltung beobachtet. Eine Verwendung dieser Gradienten für die Quantifizierung von CAAP48 erschien daher ausgeschlossen. Nur die Anwendung von Gradient 6 erzielte sowohl für den Analyten als auch den internen Standard diskrete MRM-Signale, die, abgesehen von einem leichten „*Tailing*“, keine Aufspaltung zeigten. Gleichzeitig betrug die Retentionszeitdifferenz von Analyt und internem Standard im Mittel 0,45 min (= 27 s), was für eine Basislinientrennung der MRM-Signale ausreichend war (Tabelle 35).

Tabelle 35 – Retentionszeitdifferenzen³⁵ für Analyt und internen Standard

Gradient	R _t „ <i>Quantifier</i> “ (min)			R _t „ <i>Qualifier</i> “ (min)		
	1198,9→70,2	1188,4→70,2	ΔR _t	1198,9→1456,1	1188,4→1442,4	ΔR _t
2	12,83	10,50	2,33	12,90	10,53	2,37
3	12,70	12,10	0,60	12,70	12,13	0,57
4	9,78	9,27	0,51	9,79	9,27	0,52
5	11,60	10,43	1,17	11,60	10,47	1,13
6	9,15	8,70	0,45	9,16	8,70	0,46

Der unterschiedliche Einfluss der Gradienten auf die Signalform von Analyt und internem Standard wird insbesondere bei Betrachtung der Signalfächen deutlich. Während für CAAP48_{endo} sowohl für „*Qualifier*“ als auch „*Quantifier*“ ähnliche Werte erhalten wurden, konnten für CAAP48-3xV deutliche Intensitätsunterschiede zwischen den mit verschiedenen Gradienten erzeugten MRM-Signalen beobachtet werden (Tabelle 36).

³⁵ Mittelwert von drei Analysen.

Tabelle 36 – Signalfleichen³⁵ für Analyt und internen Standard

Gradient	CAAP48 _{endo} („Counts“)		CAAP48-3xV („Counts“)	
	1198,9→70,2	1198,9→1456,1	1188,4→70,2	1188,4→1442,4
2	4,22 · 10 ⁶	4,06 · 10 ⁶	4,20 · 10 ⁵	2,20 · 10 ⁵
3	4,21 · 10 ⁶	4,08 · 10 ⁶	9,92 · 10 ⁵	4,79 · 10 ⁵
4	4,19 · 10 ⁶	3,94 · 10 ⁶	8,93 · 10 ⁵	4,87 · 10 ⁵
5	4,24 · 10 ⁶	4,08 · 10 ⁶	4,63 · 10 ⁵	2,52 · 10 ⁵
6	4,27 · 10 ⁶	4,22 · 10 ⁶	3,04 · 10 ⁶	1,60 · 10 ⁶

Auf Grundlage der Retentionszeitdifferenzen sowie der Signalfleichen und -formen eignete sich nur Gradient 6 für die Verwendung in einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode.

Ein hoher Anteil an organischem Lösungsmittel in der Probenlösung kann die Bindung des Analyten sowie des internen Standards an die stationäre Phase beeinträchtigen. Dies führt im Allgemeinen zu einer Verschiebung der Retentionszeit und/oder zur Verbreiterung und Aufspaltung des MRM-Signals. Da der Volumenanteil des Acetonitrils in den Eluaten der Festphasenextraktion immerhin 75 % betrug, bestand die Gefahr einer Beeinträchtigung der chromatographischen Auftrennung. Um die Frage, ob der Volumenanteil des Acetonitrils in dem für die Elution genutzten Lösungsmittelgemisch zu hoch ist, beantworten zu können, wurden Mischungen von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl) in drei verschiedenen Lösungsmittelgemischen mit 25 % Acetonitril (ACN/H₂O/NH₄OH (250/750/5; v/v/v)) 50 % (ACN/H₂O/NH₄OH (500/500/5; v/v/v)) sowie 75 % (ACN/H₂O/NH₄OH (750/250/5; v/v/v)) hergestellt, nacheinander jeweils 3 x 5 μl injiziert und die MRM-Übergänge von Analyt und internem Standard aufgezeichnet (Abbildung 40 bis Abbildung 42).

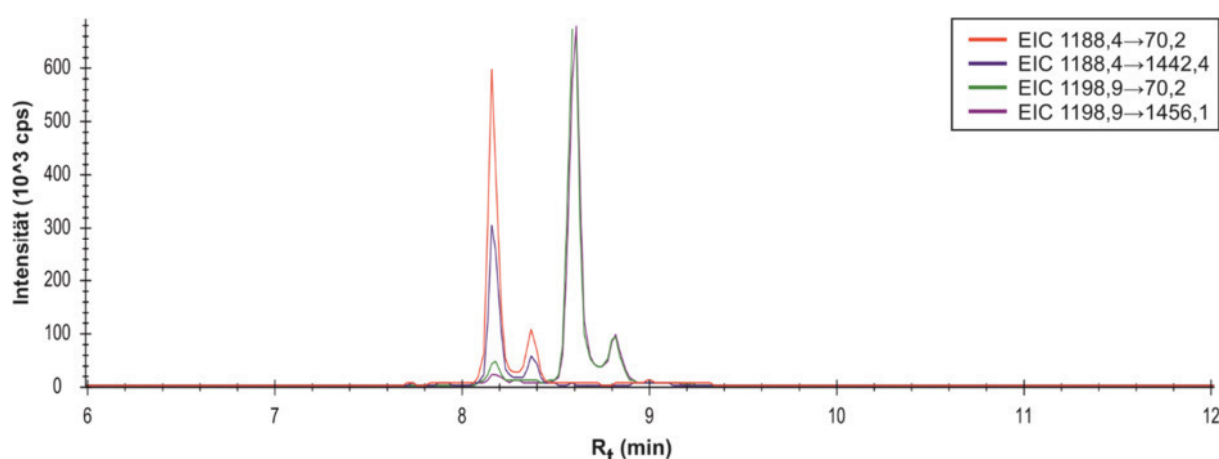


Abbildung 40: „Extracted Ion Chromatogram“ aufgenommen nach Injektion von 5 μl einer Mischung bestehend aus CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl) gelöst in einem Lösungsmittelgemischen mit 25 % Acetonitril.

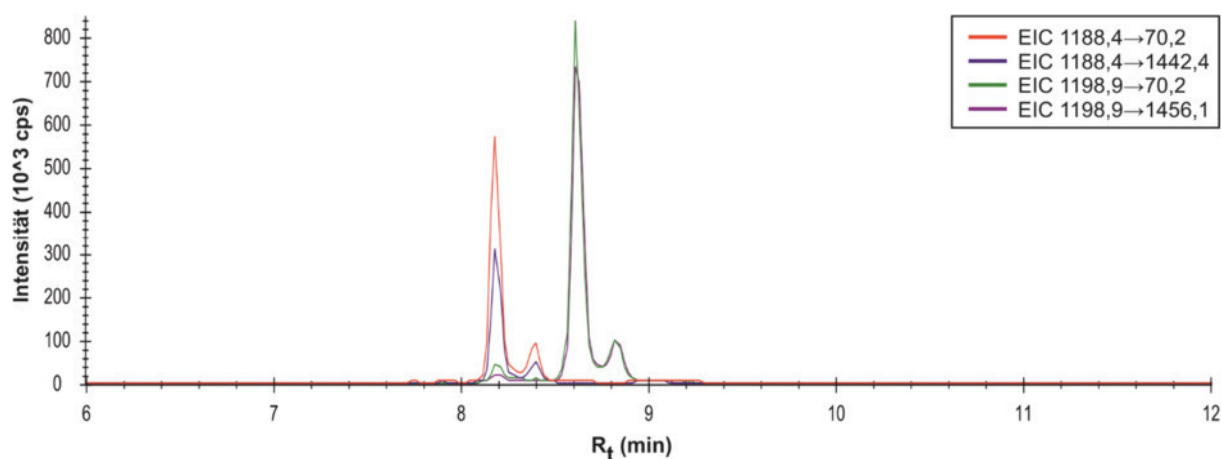


Abbildung 41: „*Extracted Ion Chromatogram*“ aufgenommen nach Injektion von 5 μl einer Mischung bestehend aus CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/ μl) gelöst in einem Lösungsmittelgemischen mit 50 % Acetonitril.

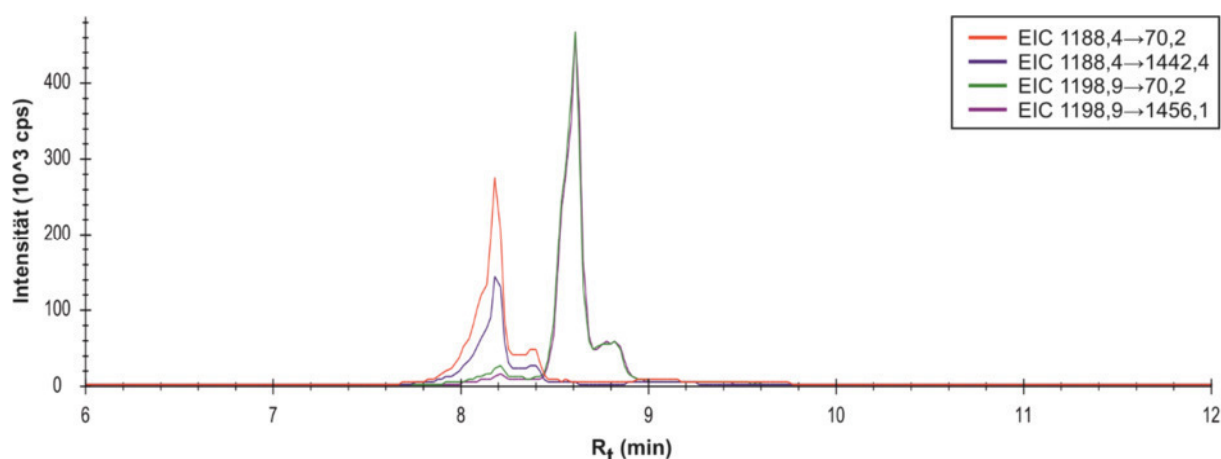


Abbildung 42: „*Extracted Ion Chromatogram*“ aufgenommen nach Injektion von 5 μl einer Mischung bestehend aus CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/ μl) gelöst in einem Lösungsmittelgemischen mit 75 % Acetonitril.

Die „*Extracted Ion Chromatograms*“ der Proben, die in Lösungsmittelgemischen mit 25 % und 50 % Acetonitril gelöst wurden, zeigten keine Auffälligkeiten. Weder war eine Beeinträchtigung der Signalform noch eine Verschiebung der Retentionszeiten zu beobachten. Lediglich die „*Extracted Ion Chromatograms*“ der in einem Lösungsmittelgemisch mit 75 % Acetonitril gelösten Probe wiesen eine Verbreiterung der MRM-Signale auf. Gleichzeitig war die Signalintensität verringert.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde das Protokoll der Festphasenextraktion dahingehend angepasst, dass zu den 40 μl Eluat vor der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse noch 10 μl H₂O zugegeben werden, um den Volumenanteil des Acetonitrils auf 60 % zu verringern und damit mögliche Auswirkungen auf die Auftrennung zu minimieren.

Ergebnisse

Die finale Auswahl der als „Quantifier“ und „Qualifier“ genutzten MRM-Übergänge erfolgte anhand der Analyse von jeweils vier verschiedenen Blutplasmaproben aus Ratte und Mensch, wobei Letztere weder an Sepsis noch an einer akuten Infektionskrankheit litten. Die Analysen wurden ohne Kenntnis der vermutlichen Konzentration von CAAP48_{endo} durchgeführt. Im Mittelpunkt standen einzig die Signalflächen für die verschiedenen Massenübergänge von Analyt und internem Standard. Die Plasmaproben wurden vor der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse daher lediglich denaturiert und mittels Festphasenextraktion gereinigt. Es erfolgte keine Zugabe von Standardpeptiden.

Das Ziel der Analyse war die Bestimmung der Massenübergänge, die in der Ratte eine möglichst geringe und beim Menschen eine möglichst hohe Intensität aufweisen. Dies lässt sich dahingehend begründen, dass im Blutplasma von Ratten weder CAAP48 noch CAAP48-3xV vorhanden sind, weshalb die Intensität der MRM-Übergänge nur sehr gering sein sollte. Würde eine hohe Intensität für einen bestimmten MRM-Übergang beobachtet werden, wäre dies ein Hinweis auf interferierende Matrixbestandteile. Der entsprechende Massenübergang wäre dann nicht für die Nutzung in einer Quantifizierungsmethode für CAAP48 geeignet.

In humanem Blutplasma sollte die Intensität der MRM-Übergänge für den Analyten möglichst hoch sein, da CAAP48_{endo} vermutlich auch in Menschen, die nicht an Sepsis erkrankt sind, in geringer Konzentration gebildet wird. Die hohe Intensität eines MRM-Übergangs würde daher auf eine hohe Empfindlichkeit für CAAP48_{endo} verweisen. Im Unterschied dazu sollte die Intensität der MRM-Übergänge für den internen Standard jedoch möglichst gering sein, da CAAP48-3xV *in vivo* nicht entstehen dürfte. Eine hohe Intensität eines MRM-Übergangs für den internen Standard würde auf interferierende Matrixbestandteile hinweisen. In Tabelle 37 sind die Ergebnisse für CAAP48_{endo} zusammengefasst.

Tabelle 37 – Intensität der MRM-Übergänge für CAAP48_{endo} in Blutplasmen

Plasma- probe	Intensität (CPS) der MRM-Übergänge 1198,9→						
	70,2	86,3	243,4	314,5	1092,7	1313,3	1456,1
Ratte 1	1600	2200	<100	<100	<100	<100	<100
Ratte 2	1600	3100	100	<100	<100	<100	<100
Ratte 3	1900	3700	200	<100	<100	<100	<100
Ratte 4	1700	4100	100	<100	<100	<100	<100
Human 1	2400	2400	1500	1500	200	600	1900
Human 2	2300	2300	1600	1600	300	700	2200
Human 3	5000	5500	4000	4200	600	1600	4200
Human 4	3500	3700	2800	2800	400	1200	3300

Intensitätsskala: Sehr gering (<100 cps) Gering (100-500 cps) Mittel (501-1000 cps) Hoch (>1000 cps)

Die beiden „kleinsten“ Massenübergänge 1198,9→70,2 und 1198,9→86,3 zeigten sehr deutlich eine Interferenz mit Matrixbestandteilen, weshalb ihre weitere Verwendung ausgeschlossen werden konnte. Für die Nutzung als „Quantifier“ blieben daher lediglich 1198,9→243,4 sowie 1198,9→314,5 zur Auswahl. Beide zeigten annähernd gleiche Intensitäten im humanen und im Rattenplasma. Die Entscheidung, welcher der beiden Massenübergänge als „Quantifier“ zu nutzen ist, wurde daher erst nach Auswertung der Daten für CAAP48-3xV getroffen. Von den hohen Massenübergängen erfüllte 1198,9→1456,1 die eingangs beschriebenen Kriterien am besten. In Tabelle 38 sind die Ergebnisse für CAAP48-3xV zusammengefasst.

Tabelle 38 – Intensität der MRM-Übergänge für CAAP48-3xV in Blutplasmen

Plasma- probe	Intensität (CPS) der MRM-Übergänge 1188,4→						
	70,2	86,3	243,4	314,5	1082,0	1299,3	1444,2
Ratte 1	2700	1300	<100	<100	<100	<100	<100
Ratte 2	900	700	<100	<100	<100	<100	<100
Ratte 3	2200	3800	100	<100	<100	<100	<100
Ratte 4	2600	4400	100	<100	<100	<100	<100
Human 1	1200	1100	<100	100	<100	<100	<100
Human 2	600	900	<100	100	<100	<100	<100
Human 3	1100	1400	<100	200	<100	<100	<100
Human 4	700	1400	<100	200	<100	<100	<100

Intensitätsskala: Sehr gering (<100 cps) Gering (100-500 cps) Mittel (501-1000 cps) Hoch (>1000 cps)

Abgesehen von 1188,4→70,2 sowie 1188,4→86,3, für die aufgrund der hohen Intensitäten eine Interferenz mit Matrixbestandteilen angenommen werden muss, zeigten alle weiteren Massenübergänge von CAAP48-3xV nur sehr geringe Intensitäten. Dies gilt für die Blutplasmen aus Ratte und Mensch in gleichem Maße. Lediglich für 1188,4→314,5 wurden im humanen Plasma geringfügig erhöhte MRM-Intensitäten beobachtet, weshalb 1188,4→243,4 vermutlich besser für die Verwendung als „Qualifier“ geeignet ist. Die letztendlich für die Verwendung als „Quantifier“ und „Qualifier“ ausgewählten MRM-Übergänge sind in Tabelle 39 zusammen mit den weiteren in der finalen MRM-Methode verwendeten Geräteparameter aufgeführt.

Tabelle 39 – Finale MRM-Methode

Peptid	MRM-Übergang	Verweilzeit (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	
CAAP48 _{syn}	„Quantifier“	1198,9→243,4	0,35	120	12	82	4
CAAP48-3xV		1188,4→243,4	0,35	120	12	80	19
CAAP48 _{syn}	„Qualifier“	1198,9→1456,1	0,35	120	12	50	29
CAAP48-3xV		1188,4→1442,4	0,35	120	12	50	29

5.2.4 Validierung der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode

Die Validierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode erfolgte in Anlehnung an die Leitlinien von FDA und EMA sowie der darin formulierten Grenzen. Experimentell bestimmte Validierungsparameter, die außerhalb dieser Grenzen lagen, wurden rot markiert.

5.2.4.1 Selektivität

Der Nachweis der Selektivität der entwickelten HPLC-ESI-MS/MS-Methode beruhte auf der Bestimmung der Interferenzen, die Verbindungen aus der Probenmatrix auf den MRM-Übergängen von Analyt und internem Standard verursachen. Dazu wurde unter Verwendung von CAAP48_{syn} und CAAP48-3xV für vier Proben der Referenzmatrix (Rattenplasma von vier verschiedenen Individuen) jeweils ein Doubleblank, Blank und LLOQ hergestellt, mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet und schließlich mit HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Die Analyse umfasste für jede Rattenplasmaprobe zunächst die Injektion des Doubleblanks, dann der LLOQ-Probe und zuletzt des Blanks. Da im Blank weder synthetischer noch endogener Analyt enthalten waren, beruhte die auf Basis des „Quantifier“ MRM-Übergangs ermittelte „Area Ratio“ auf den endogenen Matrixverbindungen. Der Vergleich der für die LLOQ-Probe und den Blank bestimmten Werte der „Area Ratio“ ermöglichte die Bestimmung der Interferenz auf dem „Quantifier“ MRM-Übergang des Analyten (siehe Formel 4).

$$Interferenz_{Analyt} (\%) = \frac{Signalfläche_{Analyt, BL}}{Signalfläche_{Analyt, LLOQ}} \cdot 100 \quad (4)$$

Durch die Verwendung der „Area Ratio“ für die Bestimmung der Interferenz auf dem „Quantifier“ MRM-Übergang des Analyten konnten Schwankungen in der Signalintensität ausgeglichen werden, da eine Normalisierung auf die Intensität des internen Standards erfolgte. Um die Selektivität für den internen Standard in Rattenplasma zu berechnen, wurden die Signalflächen für den „Quantifier“ MRM-Übergang in einem Blank und einem Doubleblank bestimmt und miteinander verglichen (siehe Formel 5).

$$Interferenz_{IS} (\%) = \frac{Signalfläche_{IS, DBL}}{Signalfläche_{IS, BL}} \cdot 100 \quad (5)$$

Die Ergebnisse der Experimente zur Bestimmung der Interferenz sind in Tabelle 40 zusammengefasst.

Tabelle 40 – Interferenzen für Analyt und internen Standard in Rattenplasma

Proben- typ	[c] _{nominell}		Signalfläche („Counts“)		„Area Ratio“	Interferenz (%)	
	Analyte	IS	Analyte	IS		Analyt	IS
DBL-1	0	0	190	151	-	1,4	0,3
LLOQ-1	0,1	1,25	5800	43600	0,133		
BL-1	0	1,25	85	45200	0,002		
DBL-2	0	0	116	144	-	1,2	0,3
LLOQ-2	0,1	1,25	1910	13300	0,144		
BL-2	0	1,25	77	43300	0,002		
DBL-3	0	0	199	382	-	2,4	0,8
LLOQ-3	0,1	1,25	918	5970	0,154		
BL-3	0	1,25	172	46200	0,004		
DBL-4	0	0	379	398	-	11,3	0,4
LLOQ-4	0,1	1,25	4080	35700	0,114		
BL-4	0	1,25	1230	96400	0,013		

Für die ersten drei Rattenplasmen wurden nur minimale Interferenzen von 1,2 % bis 2,4 % beobachtet. Die Interferenz für den Analyten in der vierten Plasmaprobe betrug immerhin 11,3 %. Als Grenze der zulässigen Interferenz werden von der EMA 20 % der Intensität oder Fläche des MRM-Signals des LLOQs festgelegt. Das Ausmaß der Interferenzen auf dem „Quantifier“ MRM-Übergang des Analyten überschreitet demnach auch für die vierte Probe nicht die festgelegte Grenze. Damit sollte die Methode den Analyten in Rattenplasma mit ausreichender Selektivität quantifizieren können. Auf dem „Quantifier“ MRM-Übergang des internen Standards wurde nahezu keine Interferenz beobachtet. Die vier Plasmaproben wiesen Werte zwischen 0,3 % und 0,8 % auf, was deutlich unterhalb der von der EMA vorgegebenen Höchstgrenze von 5 % ist. Auch für den internen Standard ist die Methode damit selektiv. Die in Rattenplasma enthaltenen Verbindungen verursachen demnach nur in geringem Umfang Interferenzen auf den MRM-Übergängen von Analyt und internem Standard, weshalb ein Einfluss auf die Ergebnisse der Quantifizierung von CAAP48 in Plasmaproben als unwahrscheinlich bezeichnet werden kann.

5.2.4.2 Richtigkeit und Präzision

Da jeder Analysenlauf der in der vorliegenden Arbeit genutzten HPLC-ESI-MS/MS-Methode 30 min dauerte und Probenserien daher meist zwei bis drei Tage Analysenzeit in Anspruch nahmen, wurde lediglich die „Inter-run“-Richtigkeit und -Präzision bestimmt. Die Berechnung der Richtigkeit der experimentell ermittelten Analyt-Konzentration erfolgte anhand von Formel 6.

$$Richtigkeit (\%) = \frac{[c]_{Analyt, exp.}}{[c]_{Analyt, nom.}} \cdot 100 \quad (6)$$

Zur Bestimmung der Präzision wurde für jede nominelle Konzentration die relative Standardabweichung v berechnet. Die für die Qualitätskontrollen aller für die Validierung genutzten Versuche ermittelten Werte der Richtigkeit und Präzision sind in Tabelle 41 zusammengefasst.

Tabelle 41 – Bestimmung von Richtigkeit und Präzision

	Analysen- tag	[c] _{Analyt, nom.} (ng/μl)			
		0,1 (LLOQ)	0,25 (LQC)	2,5 (MQC)	15,0 (HQC)
[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)	34	0,11	0,28	2,34	14,90
	114	0,08	0,25	2,84	17,90
	124	0,11	0,29	2,03	11,10
Richtigkeit (%)	34	110	113	93,8	99,3
	114	80,2	99,7	114,0	119,0
	124	108,0	117,0	81,1	73,7
Statistische Kennwerte	N	3	3	3	3
	\bar{x}	99,4	109,9	96,3	97,3
	s	16,7	9,1	16,6	22,7
	v (%)	16,8	8,2	17,2	23,3

Die für die einzelnen Qualitätskontrollen bestimmten Werte der Richtigkeit wiesen deutliche Schwankungen auf (80,2 % bis 119,0 %). Dennoch wich keiner der damit berechneten Mittelwerte stärker als 9,9 % von der nominellen Analyt-Konzentration ab. Die Methode besitzt also eine (im Mittel) ausreichende Richtigkeit. Für die Präzision wurden hingegen andere Ergebnisse erhalten. Infolge der Schwankungen wies die für jede Qualitätskontrolle bestimmte relative Standardabweichung v Werte von 16,8 % bis 23,3 % auf. Einzige Ausnahme bildete die Qualitätskontrollen mit 0,25 ng/μl nomineller Analyt-

Konzentration. Für diese betrug die relative Standardabweichung v lediglich 8,2 %. Die Ergebnisse zeigen, dass die Präzision für die untersuchten Analyt-Konzentrationen außerhalb des von EMA und FDA festgelegten Annahmebereichs lag. Damit ist die Methode offenbar nicht ausreichend präzise, wenngleich die Abweichung vom Annahmebereich gering ist.

5.2.4.3 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden zunächst die Analyt-Konzentrationen mit Hilfe der als „Quantifier“ genutzten MRM-Übergänge von Analyt und internem Standard ermittelt sowie im Anschluss die Richtigkeit berechnet. In Tabelle 42 sind die experimentell bestimmten Analyt-Konzentrationen einschließlich der entsprechenden Richtigkeit für jede in der Validierung verwendete Kalibrierung aufgeführt.

Tabelle 42 – Linearität der Kalibrierungen

	Analysen- tag	[c] _{Analyt, nom.} (ng/μl)						
		0,1	0,25	1,25	2,5	7,5	15,0	20,0
[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)	1	0,10	0,27	1,29	2,66	7,83	14,40	19,60
	4	0,11	0,22	1,27	2,70	6,99	16,60	19,10
	8	0,10	0,25	1,25	2,35	7,65	15,00	20,60
	34	0,10	0,25	1,15	2,59	6,96	14,80	22,30
	114	0,10	0,23	1,28	2,54	7,00	14,20	22,50
Richtigkeit (%)	1	96,0	107,0	103,0	106,0	104,0	96,1	98,0
	4	105,0	86,3	101,0	108,0	93,1	111,0	95,4
	8	99,9	101,0	100,0	94,1	102,0	100,0	103,0
	34	100,0	101,0	92,2	104,0	92,7	98,9	111,0
	114	103,0	92,5	102,0	102,0	93,4	94,9	112,0

Jeder der 35 Kalibranten in den fünf Kalibrierungen wies eine ausreichende Richtigkeit auf. Alle innerhalb der Validierung durchgeführten Kalibrierungen erfüllten also die durch FDA und EMA festgelegten Kriterien. Die auf Basis dieser Kalibrierungen erstellten Kalibrierfunktionen konnten demnach für die Einschätzung der Linearität verwendet werden. Für die Anpassung der Kalibrierungen wurde die lineare Funktion $y = m \cdot x + n$ verwendet, wobei als y -Werte die „Area Ratio“ und als x -Werte die nominellen Analyt-Konzentration aufgetragen wurde. Dies erfolgte für die Messdaten zum einen gewichtet ($1/x^2$) mit Hilfe der Software „Analyst“ (Version 1.6.3, Sciex) und zum anderen ohne Wichtung mittels „Excel“ (Version 2016, Microsoft). Der Anstieg m , der Schnittpunkt n sowie das Bestimmtheitsmaß der für jede Kalibrierung ermittelten Funktion sind in Tabelle 43 zusammengefasst.

Tabelle 43 – Kalibrierfunktionen und Linearität

Analysen- tag	Kalibrierfunktion (gewichtet)			Kalibrierfunktion (nicht gewichtet)		
	Anstieg m	Schnittpunkt n	R ² (%)	Anstieg m	Schnittpunkt n	R ² (%)
1	1,30	0,0245	99,5	1,27	0,0231	99,85
4	1,18	0,0002	99,1	1,18	0,0633	99,07
8	1,14	0,0162	99,9	1,17	-0,0516	99,97
34	1,38	0,0128	99,5	1,49	-0,3736	99,31
114	1,12	0,0409	99,4	1,20	-0,2683	98,91
N	5	5	-	5	5	-
\bar{x}	1,22	0,02	99,5	1,26	-0,12	99,4
s	0,11	0,02	0,3	0,13	0,19	0,5
v (%)	9,1	-	-	10,4	-	-

Entscheidend für die Bewertung, ob eine Kalibrierfunktion die Messdaten adäquat wiedergibt, ist das Bestimmtheitsmaß R². Dieses betrug für die gewichteten Funktionen im Mittel 99,5 % und für die nicht gewichteten 99,4 %. Angesichts der Werte für das jeweilige Bestimmtheitsmaß kann davon ausgegangen werden, dass die Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 0,1 ng/μl bis 20 ng/μl CAAP48 linear waren.

Die Analysendaten wurden mit Hilfe der Beziehung 1/x² gewichtet, damit die niedrigen Konzentrationen bei der Bestimmung der Kalibrierfunktion in gleichem Maße berücksichtigt werden wie die hohen. In diesem Zusammenhang ist es jedoch wichtig nachzuweisen, ob und wenn ja in welchem Umfang die Wichtung das Ergebnis einer Kalibrierung beeinflusst. Daher wurden in Tabelle 43 sowohl die mit als auch ohne Wichtung erstellten Kalibrierfunktionen aufgeführt. Die entsprechenden Daten zeigen, dass eine Wichtung der Daten mittels 1/x² auf das Endergebnis einer Kalibrierung, die Kalibrierfunktion, nahezu keinen Einfluss hat. Lediglich die Streuung der Kalibrierdaten wird durch die Wichtung minimal verringert. Der Wert für die Standardabweichung des Anstiegs m der Funktionen ist bei den gewichteten Kalibrierungen mit 0,11 geringfügig kleiner als der Wert 0,13 für die nicht gewichteten. Die gleiche Aussage kann für die relative Standardabweichung v des Anstiegs der Kalibrierfunktion (9,1 % gewichtet versus 10,4 % nicht gewichtet) getroffen werden.

5.2.4.4 Empfindlichkeit

Um das „Lower Limit of Quantification“ (LLOQ) zu bestimmen, wurden jeweils fünf Proben für drei verschiedene Konzentrationen (0,05 ng/μl, 0,10 ng/μl, 0,25 ng/μl) des synthetischen Analyten CAAP48_{syn} in einem Lösungsmittelgemisch hergestellt. Die Konzentration des internen Standards CAAP48-3xV betrug in allen Proben 1,25 ng/μl. Die

Proben wurden schließlich mit Rattenplasma gemischt, mittels Festphasenextraktion gereinigt und final mit HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Die Bestimmung der Analyt-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe der als „Quantifier“ genutzten MRM-Übergänge von Analyt und internem Standard.

Die Ermittlung des LLOQ erfolgte unter Nutzung der in Tabelle 44 aufgeführten Ergebnisse der HPLC-ESI-MS/MS-Analysen sowie unter Anwendung der in den Leitlinien von EMA und FDA angegebenen Kriterien.

Tabelle 44 – Bestimmung des „Lower Limit of Quantification“ (LLOQ)

#	[c] _{Analyt, nom.} = 0,05 ng/μl			[c] _{Analyt, nom.} = 0,10 ng/μl			[c] _{Analyt, nom.} = 0,25 ng/μl		
	S/N	[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)	Richtig-keit (%)	S/N	[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)	Richtig-keit (%)	S/N	[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)	Richtig-keit (%)
1	4,4	0,051	103,0	8,6	0,105	105,0	19,8	0,216	86,3
2	3,8	0,053	105,0	7,4	0,103	103,0	20,0	0,238	95,1
3	3,9	0,045	89,5	8,3	0,125	125,0	20,5	0,254	102,0
4	4,5	0,051	101,0	8,8	0,105	105,0	17,4	0,248	99,0
5	3,6	0,062	123,0	10,6	0,134	134,0	14,9	0,232	93,0
N	5	5	-	5	5	-	5	5	-
\bar{x}	4,1	0,052	-	8,7	0,114	-	18,5	0,238	-
s	0,4	0,006	-	1,2	0,014	-	2,3	0,015	-
v (%)	9,5	11,7	-	13,7	12,4	-	12,7	6,2	-

Für die erste Konzentrationsreihe (0,05 ng/μl CAAP48_{syn}) waren die für den Analyten erfassten Signalintensitäten zu gering, weshalb das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durchgehend Werte unter 5 aufwies. Daher konnte die Verwendung von 0,05 ng/μl als LLOQ ausgeschlossen werden. Die für die Konzentrationsreihen mit 0,10 ng/μl und 0,25 ng/μl CAAP48_{syn} ermittelten Signal-zu-Rausch-Verhältnisse waren hingegen ≥ 5 . Auch die relative Standardabweichung v zur Beurteilung der Präzision erfüllte mit 12,4 % und 6,2 % das entsprechende Kriterium, damit jede der beiden Konzentrationen als LLOQ genutzt werden könnte. Allerdings wichen zwei Proben der Konzentrationsreihe mit 0,10 ng/μl CAAP48_{syn} um mehr als +20 % von der nominellen Konzentration ab. Damit erfüllte nur die Konzentrationsreihe mit 0,25 ng/μl CAAP48_{syn} alle Kriterien, die Voraussetzung für die Verwendung als LLOQ sind. Allerdings betraf die für die Konzentrationsreihe mit 0,1 ng/μl CAAP48_{syn} beobachtete Abweichung nur die Richtigkeit, während alle anderen Kriterien erfüllt wurden. Aus diesem Grund wurden 0,1 ng/μl CAAP48 als LLOQ festgelegt.

5.2.4.5 Verschleppungen

Um die Verschleppung des Analyten zu ermitteln, wurden zunächst fünf Proben mit internem Standard (1,25 ng/μl) sowie der LLOQ-Konzentration des synthetischen Analyten (0,1 ng/μl) in einem Lösungsmittelgemisch hergestellt. Für die Bestimmung war weiterhin eine Probe mit der höchsten Konzentration des Analyten im Quantifizierungsbereich (ULOQ mit 20 ng/μl Analyt und 1,25 ng/μl internem Standard) sowie drei Blank-Proben (mit 1,25 ng/μl internem Standard) notwendig. Alle Proben wurden im Anschluss an ihre Herstellung mit Rattenplasma gemischt und mittels Festphasenextraktion gereinigt sowie nachfolgend mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Für die Auswertung der Daten wurden ausschließlich die als „Quantifier“ genutzten MRM-Übergänge von Analyt und internem Standard verwendet.

Der Ablauf des Experiments zur Bestimmung der Verschleppung des Analyten sowie die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 45 dargestellt. Als erstes wurden die LLOQ-Proben injiziert, unmittelbar im Anschluss die ULOQ-Probe und nachfolgend drei Blank-Proben. Für jede Probe wurde die Konzentration des Analyten bestimmt.

Tabelle 45 – Verschleppung Analyt

Probentyp	[c] _{Analyt} (ng/μl)		Verschleppung Analyt in % des	
	Nominell	Experimentell	ULOQ _{exp.}	LLOQ _{exp.}
LLOQ	0,10	0,11 ³⁶	-	-
ULOQ	20,00	19,10	-	-
BL	0	0,05	0,3	47,5
BL	0	0,01	0,1	9,9
BL	0	0,00	0,0	2,7

Infolge der Injektion der ULOQ-Probe wurde in zwei der drei folgenden Blank-Proben Analyt nachgewiesen. Die Verschleppung des Analyten kann entweder auf das ULOQ oder das LLOQ bezogen werden. Betrachtet man die Verschleppung in Bezug auf das ULOQ, so werden im ersten Blank lediglich 0,3 % und im zweiten nur noch 0,1 % beobachtet. Die Leitlinie der EMA gibt jedoch vor, dass die Verschleppung auf das LLOQ bezogen werden muss und gibt dafür einen Grenzwert von maximal 20 % im ersten Blank vor. Im vorliegenden Experiment wurden jedoch 47,5 % Analyt-Verschleppung im ersten und 9,9 % im zweiten Blank beobachtet. Damit werden die Kriterien der EMA nicht eingehalten. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Arbeiten festgelegt, dass nach jeder Probe mit einer unbekanntem oder hohen Konzentration des Analyten ein DBL zu injizieren ist. Dadurch wird gewährleistet, dass sich die durch eine Probe mit einer hohen Analyt-Konzentration verursachte Verschleppung auf das Analyseergebnis der nächsten Probe mit maximal 9,9 % der LLOQ-Konzentration

³⁶ Mittelwert von fünf Messungen.

auswirkt. Als hohe Konzentration wurde durch Abschätzung $\geq 2,5$ ng/ μ l festgelegt. Nach allen Proben mit einer bekannten Analyt-Konzentration von $\geq 2,5$ ng/ μ l wurde zur Sicherheit ein DBL injiziert.

Der Ablauf des Experiments zur Bestimmung der Verschleppung des internen Standards sowie die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 46 dargestellt. Zuerst wurde eine Blank-Probe (mit 1,25 ng/ μ l internem Standard) und unmittelbar im Anschluss zwei DBL-Proben injiziert. Für jede Probe wurde auf Basis des „Quantifier“ MRM-Übergangs die Signalfläche des internen Standards ermittelt.

Tabelle 46 – Verschleppung interner Standard

Probentyp	[c] _{IS, nominell} (ng/ μ l)	Signalfläche IS („Counts“)	Verschleppung IS in % ³⁷
BL	1,25	46700	-
DBL	0	63	0,1
DBL	0	43	0,1

Laut Leitlinie der EMA darf die Verschleppung des internen Standards in auf einem Blank folgenden DBL nicht mehr als 5 % (bestimmt anhand der Signalfläche) betragen. Dieser Wert wurde mit 0,1 % Verschleppung für den internen Standard in den beiden DBL-Proben deutlich unterboten. Demnach können Proben mit internem Standard ohne jede Gefahr für nachfolgende Analysen eingesetzt werden.

5.2.4.6 Extraktionseffizienz und Matrixeffekt

Beide Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit in einem gemeinsamen Experiment bestimmt, wozu insgesamt vier Telexperimente notwendig waren:

1. Kalibrierung im Eluat einer Festphasenextraktion einer H₂O-Probe,
2. Kalibrierung im Eluat einer Festphasenextraktion einer Rattenplasmaprobe,
3. Qualitätskontrollen in H₂O,
4. Qualitätskontrollen in Rattenplasma.

In den Telexperimenten 1 und 2 wurden Mischungen aus Analyt (verschiedene Konzentrationen) und internem Standard (eine Konzentration) in die Eluate von jeweils einer Festphasenextraktion einer H₂O- und einer Rattenplasmaprobe gegeben. Im Unterschied dazu wurde der Analyt (verschiedene Konzentrationen) in den Telexperimenten 3 und 4 vor der Festphasenextraktion zur Probenmatrix (H₂O und Rattenplasma) gegeben und aus dieser extrahiert. Die Zugabe des internen Standards (eine Konzentration) erfolgte wiederum direkt in die entsprechenden Eluate. Der interne Standard wurde in allen Telexperimenten in

³⁷ Bezogen auf die Signalfläche des internen Standards im Blank.

Ergebnisse

gleicher Konzentration sowie zum gleichen Zeitpunkt zugegeben (nach der Extraktion in das Eluat). Eine Zusammenfassung des grundsätzlichen Vorgehens zur Bestimmung von Extraktionseffizienz und Matrixeffekt ist in Abbildung 43 dargestellt.

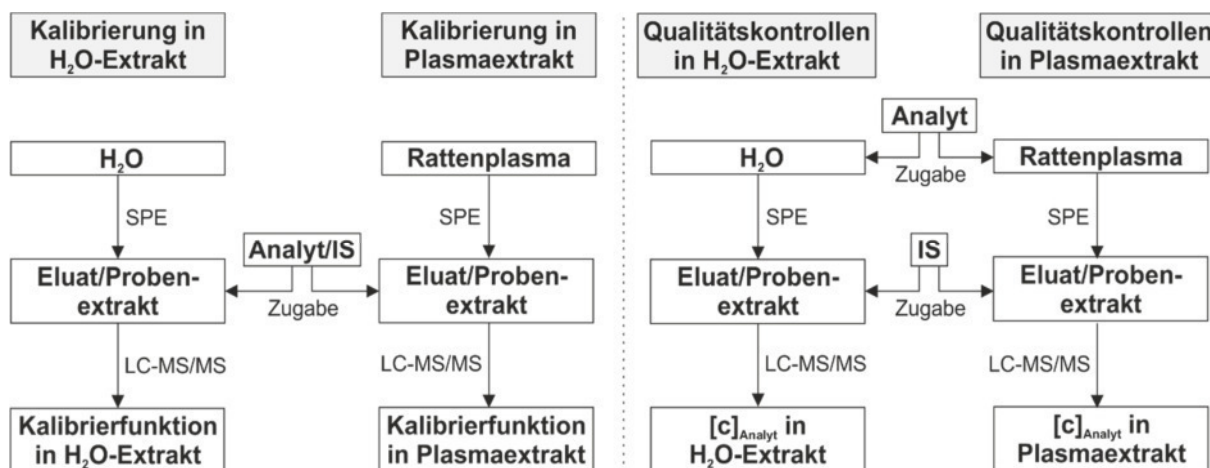


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Vorgehens zur Bestimmung von Matrixeffekt und Extraktionseffizienz.

Das in Abbildung 43 dargestellte Grundprinzip der durchgeführten Experimente verdeutlicht, dass sich in jeder untersuchten Probe Analyt und interner Standard befanden. Da letzterer immer zum gleichen Zeitpunkt und in der gleichen Konzentration zugegeben wurde, ermöglichte er die Quantifizierung des in verschiedenen Konzentrationen verwendeten und zu verschiedenen Zeitpunkten der Probenaufarbeitung zugegebenen Analyten in den einzelnen Proben. Die Bestimmung der Extraktionseffizienz sowie des Matrixeffektes beruhte also nicht unmittelbar auf den Signalflächen, sondern auf der „Area Ratio“ sowie der damit berechneten Analyt-Konzentration (im übertragenen Sinne die mittels internem Standard normalisierten Signalfläche des Analyten). Dass Extraktionseffizienz und Matrixeffekt nicht wie eigentlich üblich anhand der Signalflächen bestimmt wurden, ist auf die Schwankungen zurückzuführen, denen die Flächen für Analyt und internen Standard selbst innerhalb einer Probenserie unterlagen. Die Daten mussten also normalisiert werden, wofür sich die Verwendung des internen Standards anbot.

Das gewählte experimentelle Vorgehen ermöglichte allerdings nur die Bestimmung der Extraktionseffizienz und des Matrixeffekts für den Analyten, nicht aber für den internen Standard. Die für den Analyten bestimmten Werte sollten demnach näherungsweise auch für den internen Standard gelten. Darüber hinaus wurde der interne Standard im Unterschied zum Analyten ausschließlich in einer Konzentration eingesetzt. Die Möglichkeit, dass für unterschiedliche Konzentrationen des internen Standards die Extraktionseffizienz und/oder der Matrixeffekt variiert, entfiel daher.

Die Bestimmung des Matrixeffektes erfolgte nach den Prinzipien der „Post-extraction Addition“. Um möglichst verlässliche Werte für den Matrixeffekt über den gesamten

Konzentrationsbereich der Methode zu erhalten, wurden die Anstiege der beiden Kalibrierfunktionen miteinander verglichen. Da die zum Herstellen der Kalibrierungen genutzten Extrakte auf die gleiche Weise erzeugt wurden und sich allein in den Probenmatrices (H₂O und Rattenplasma) unterschieden, konnten die Ergebnisse für den Matrixeffekt nicht durch Parameter wie die Extraktionseffizienz verfälscht werden.

Das Experiment zur Bestimmung des Matrixeffektes wurde zweimal für leicht unterschiedliche Konzentrationsbereiche (Versuch 1: 0,02 ng/μl bis 7,5 ng/μl, Versuch 2: 0,05 ng/μl bis 20,0 ng/μl) durchgeführt. Die in den beiden Versuchen für jeden Kalibranten erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 47 dargestellt.

Tabelle 47 – Kalibrierungen und Matrixeffekt

[c] _{Analyt, nom.} (ng/μl)	[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)				Richtigkeit (%)			
	H ₂ O-Extrakt		Plasmaextrakt		H ₂ O-Extrakt		Plasmaextrakt	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0,02	0,02	-	0,02	-	107,0	-	110,0	-
0,05	0,04	-	0,04	-	85,4	-	71,2	-
0,10	0,09	0,11	0,10	0,11	92,9	112,0	103,0	109,0
0,21 ³⁸	-	0,16	-	0,19	-	75,0	-	92,3
0,25	0,24	-	0,27	-	95,5	-	110,0	-
1,25	1,32	1,11	1,37	1,31	105,0	88,8	109,0	105,0
2,50	2,65	3,28	2,57	2,44	106,0	131,0	103,0	97,5
7,50	8,05	6,79	7,07	9,96	107,0	90,5	94,3	133,0
15,0	-	15,70	-	13,50	-	105,0	-	89,9
20,00	-	19,60	-	17,80	-	98,2	-	89,2

Jede der vier erstellten Kalibrierungen erfüllte die von der FDA formulierten Annahmekriterien. Einige Kalibranten zeigten jedoch zu starke Abweichungen der Richtigkeit, weshalb sie nicht für die Erstellung der entsprechenden Kalibrierfunktion verwendet wurden. Letztere wurden berechnet, indem die „Area Ratio“ gegen die nominelle Analyt-Konzentration aufgetragen wurde. Der Vergleich der Anstiege zweier Kalibrierfunktionen in H₂O- und Plasmaextrakten ermöglichte die Berechnung des Matrixeffekts (siehe Formel 7).

$$\text{Matrixeffekt (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Anstieg}_{\text{Kalibrierfunktion, Plasmaextrakt}}}{\text{Anstieg}_{\text{Kalibrierfunktion, H}_2\text{O-Extrakt}}} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

³⁸ Statt 0,25 ng/μl aufgrund eines Fehlers während der Probenvorbereitung.

Ergebnisse

Ist der Anstieg einer in Plasmaextrakt erstellten Kalibrierfunktion kleiner als der einer in H₂O-Extrakt erstellten Funktion, dann weist dies auf eine Unterdrückung der Analyt-Ionen hin (Matrixeffekt >0 %). Im umgekehrten Fall liegt eine Ionenverstärkung vor (Matrixeffekt <0 %). Bei gleichen Anstiegen liegt kein Matrixeffekt vor. Demnach hätte die Matrix keinen Einfluss auf die Signalintensität der Analyt-Ionen. Die in den beiden Experimenten erstellten Kalibrierfunktionen für H₂O- und Plasmaextrakte sind gemeinsam mit dem daraus berechneten Matrixeffekt in Tabelle 48 aufgeführt.

Tabelle 48 – Kalibrierfunktionen und Matrixeffekt

	Kalibrierfunktion (H ₂ O-Extrakt)			Kalibrierfunktion (Plasma-Extrakt)			Matrixeffekt (%)
	Anstieg m	Schnittpunkt n	R ² (%)	Anstieg m	Schnittpunkt n	R ² (%)	
1	1,06	0,0027	99,0	1,00	0,0202	99,7	5,7
2	1,16	0,0183	99,5	0,90	0,0237	99,6	22,4

In beiden Versuchen wurde eine Unterdrückung der Analyt-Ionen beobachtet. Allerdings war der Matrixeffekt mit lediglich 5,7 % für den niedrigeren Kalibrierbereich geringer ausgeprägt als für den höheren, für welchen 22,4 % ermittelt wurden. Bei kleinen Konzentrationen ist der Analyt im Vergleich zu den co-eluierenden Matrixverbindungen, welche die Ionenunterdrückung verursachen, unterrepräsentiert. Der Einfluss der Matrixverbindungen auf die Ionisierung des Analyten sollte dann besonders einschneidend sein und der Matrixeffekt damit besonders groß. Bei höheren Konzentrationen des Analyten würde das Verhältnis zu dessen Gunsten verschoben. Der Matrixeffekt sollte kleiner ausfallen. Der in der vorliegenden Arbeit für den Matrixeffekt beobachtete Unterschied zwischen den beiden Konzentrationsbereichen des Analyten dürfte daher eher Ausdruck von Schwankungen der Messwerte sein, als auf eine grundsätzliche Verschiedenheit hinweisen.

Der in beiden Versuchen beobachtete Matrixeffekt war in Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei Blutplasma um eine der komplexesten biologischen Matrices handelt, gering. Dies kann vermutlich auf die Probenaufarbeitung und dabei insbesondere auf die Festphasenextraktion zurückgeführt werden, mit deren Hilfe die Anzahl an co-eluierenden Verbindungen deutlich verringert wird.

Die Bestimmung der Extraktionseffizienz beruhte auf der Quantifizierung des Analyten in den Eluaten der Qualitätskontrollen. Dazu wurde vor der Extraktion eine definierte Menge des Analyten zur entsprechenden Matrix (H₂O, Rattenplasma) gegeben und aus dieser extrahiert. Im Anschluss wurden die Eluate mit internem Standard gemischt, um die Konzentration des extrahierten Analyten mit Hilfe der für die Bestimmung des Matrixeffektes erstellten Kalibrierungen ermitteln zu können. Letztendlich erfolgte ein Vergleich der nominellen (vor der Extraktion vorhandenen) mit der nach der Probenaufarbeitung in den

Eluaten noch (experimentell) nachweisbaren Konzentration. Die zur Berechnung der Extraktionseffizienz genutzte Formel ist nachfolgend aufgeführt.

$$\text{Extraktionseffizienz (\%)} = \frac{[c]_{\text{Analyt, exp.}}}{[c]_{\text{Analyt, nom.}}} \cdot 100 \quad (8)$$

Die in den beiden Matrixextrakten bestimmten Analyt-Konzentrationen sowie die daraus berechneten Extraktionseffizienzen sind in Tabelle 49 zusammengefasst.

Tabelle 49 – Qualitätskontrollen und Extraktionseffizienz

[c] _{Analyt, nom.} (ng/μl)	[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)				Extraktionseffizienz (%)			
	H ₂ O-Extrakt		Plasmaextrakt		H ₂ O-Extrakt		Plasmaextrakt	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0,10	0,02	-	0,01	-	20,3	-	11,0	-
0,25	0,06	-	0,03	-	23,4	-	12,7	-
0,50	-	0,11	-	0,06	-	21,3	-	12,5
1,04 ³⁹	-	0,25	-	0,23	-	24,0	-	22,1
2,50	0,85	-	0,63	-	34,0	-	25,3	-
12,50	-	4,71	-	2,08	-	37,7	-	16,7
15,00	5,29	-	1,86	-	35,2	-	12,4	-
75,00	-	21,80	-	12,35	-	29,1	-	16,5

Insgesamt betrachtet wurden für die unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen teilweise verschiedene Extraktionseffizienzen ermittelt. Es handelt sich hierbei vermutlich nicht einfach um Schwankungen der Messergebnisse, sondern wahrscheinlich um konzentrationsabhängige Tendenzen der Extraktionseffizienz. Für die H₂O-Proben wurden in beiden Versuchen Extraktionseffizienzen von 20,3 % bis 37,7 % ermittelt (Mittelwert 28,1 %). Mit steigender Analyt-Konzentration ist auch ein Anstieg der Effizienz zu beobachten. Dies ist ein Hinweis auf unspezifische Adsorptionseffekte, die sich bei geringen Konzentrationen stärker auswirken als bei hohen und daher insbesondere für erstere zu einer Verschlechterung der Extraktionseffizienz führen. Bei den höchsten Konzentrationen deutet sich wiederum ein leichter Rückgang der Effizienz an, was auf eine Erschöpfung der Bindekapazität der stationären Phase hindeuten könnte.

Für die Plasmaproben wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, allerdings sank die Extraktionseffizienz auf 11,0 % bis 25,3 % (Mittelwert 16,1 %), was im Vergleich mit den H₂O-

³⁹ Statt 1,25 ng/μl aufgrund eines Fehlers während der Probenvorbereitung.

Proben ein Rückgang von mehr als 40 % ist. Die Gegenwart von Blutplasma führt also zu einer deutlichen Verringerung der Effizienz, mit der der Analyt aus der Matrix extrahiert wird. Auch die für die Plasmaproben bestimmte Extraktionseffizienz zeigt konzentrationsabhängige Änderungen. Die kleinen Konzentrationen weisen (wie bereits für die H₂O-Proben beobachtet) die geringste Effizienz auf. Auch hierfür sind vermutlich Adsorptionseffekte verantwortlich.

Mit einem Durchschnitt von 16,1 % ist die Effizienz, mit der CAAP48 aus Rattenplasma extrahiert wird, gering. Allerdings muss in diesem Zusammenhang die Größe von CAAP48 berücksichtigt werden, da die Extraktion einer Verbindung mit einer Molekularmasse von immerhin 4,8 kDa oftmals nicht so effizient möglich ist wie für viele kleinere Moleküle („*Small Molecules*“). Dies lässt sich zum Beispiel auf die zahlreichen funktionellen Gruppen von CAAP48 zurückführen, welche die Wahrscheinlichkeit für die Interaktion mit anderen Verbindungen massiv erhöhen. Dadurch wird wiederum die Fähigkeit, mit der stationären Phase zu interagieren, eingeschränkt oder vollständig aufgehoben. Darüber hinaus können trotz der am Anfang der Probenaufarbeitung durchgeführten Denaturierung Sekundärstrukturen überdauern, die eine Bindung an die stationäre Phase be- oder sogar verhindern. Der Matrixeffekt sollte hingegen die für die Extraktionseffizienz bestimmten Werte nicht beeinflusst haben, da die Kalibranten in Extrakten der gleichen Matrices wie die Qualitätskontrollen hergestellt wurden.

5.2.4.7 Stabilität

Zur Bestimmung der Stabilität im Probengeber wurden Qualitätsstandards (LLOQ, LQC, MQC, HQC) in Rattenplasma hergestellt, mittels Festphasenextraktion gereinigt und die Eluate im Probengeber bei 8 °C bis zur HPLC-ESI-MS/MS Analyse aufbewahrt. Die Injektion der Proben folgte einem bestimmten Zeitplan. Der Zielparameter der Untersuchung war die „*Area Ratio*“ über einen Zeitraum von 24 Stunden, was in etwa der maximalen Dauer der Aufbewahrung der Proben im Probengeber während der Quantifizierung von CAAP48_{endo} in humanen Plasmaproben entsprach. Für jeden Zeitpunkt wurden zwei Injektionen pro Qualitätsstandard durchgeführt. Die für die Stabilität erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 50 zusammengefasst.

Tabelle 50 – Veränderung der „Area Ratio“ über 24 h

Probentyp	LLOQ	LQC	MQC	HQC
[c] _{Analyte} (ng/μl)	0,1	0,25	1,25	15,0
0 h	0,13	0,28	2,99	16,35
6 h	0,14	0,30	3,27	19,15
12 h	0,13	0,30	3,26	18,60
24 h	0,13	0,29	3,22	17,20
N	4	4	4	4
\bar{x}	0,13	0,29	3,18	17,83
s	0,004	0,013	0,132	1,281
v (%)	2,9	4,6	4,2	7,2

Veränderungen der „Area Ratio“ wurden während des Untersuchungszeitraums von 24 h weder für die hohen noch für die geringen Analyt-Konzentrationen beobachtet. Für keine Qualitätskontrolle überschreitet die relative Standardabweichung 8 %, was deutlich unterhalb der von FDA und EMA festgelegten Grenzen (15 % bzw. 20 % für LLOQ) ist. Analyt und interner Standard sind demnach in den Eluaten während der Aufbewahrungszeit im Probengeber stabil.

5.3 Klinische Studie

Insgesamt wurden acht Patienten des Perioperativen Intensivtherapiezentrum (PIT) 1 in die klinische Studie eingeschlossen. Für jeden Patienten wurden an jedem Tag mit Blutentnahme (meist an den Tagen 1, 3 und 5) verschiedenste klinische Parameter ermittelt, von denen eine Auswahl in Tabelle 51 aufgeführt ist. Die Bestimmung des Genotyps für *SERPINA1* erfolgte auf Basis der durchgeführten MALDI-TOF-Analysen. Dazu wurde in den für jeden Patienten aufgenommenen Massenspektren nach dem Massensignal des intakten Molekül-Ions der kanonischen und der mutierten Form von CAAP48 gesucht. Erstere wird im Folgenden als Wildtyp (Wt) und letztere als E376D (verantwortlich für die Bildung von CAAP47) bezeichnet.

Tabelle 51 – Grundlegende klinische Parameter der Studienpatienten

Patient	Alter	Geschlecht	SERPINA1-Genotyp	Tag	Beatmung	Infektionsstatus
1	19	Männlich	Wt/E376D	1	+	Pneumonie (<i>Staphylococcus aureus</i> , Methicillin-sensitiver Stamm)
				3	-	
				5	-	
2	57	Männlich	Wt/Wt	1	+	Nosokomiale Pneumonie (Erreger unbekannt)
				3	+	
				5	+	
3	77	Männlich	Wt/Wt	1	+	Akute Peritonitis (Erreger unbekannt)
4	67	Männlich	Wt/Wt	1	+	Pneumonie (<i>Klebsiella oxytoca</i>), Verdacht auf Endokarditis (<i>Enterococcus faecalis</i>)
				3	+	
				5	+	
5	57	Weiblich	Wt/E376D	1	+	Keine Infektion
				3	+	
				4	+	
6	52	Männlich	Wt/E376D	1	+	Chronische Sinusitis (Erreger unbekannt)
				2	+	
				4	+	
7	50	Männlich	E376D/E376D	1	-	Keine Infektion
8	76	Männlich	Wt/E376D	1	-	Keine Infektion

Die Einteilung der Probanden in die einzelnen Patientengruppen erfolgte anhand der in Tabelle 9 (siehe Abschnitt 4.3.4) aufgeführten Diagnosekriterien und Grenzwerte. Die für die Patienten ermittelten klinischen Parameter sowie die mit deren Hilfe erstellten Diagnosen sind in Tabelle 52 zusammengefasst. In den sich an die Werte der klinischen Parameter unmittelbar rechts anschließenden Zellen ist vermerkt, ob der entsprechende Grenzwert eingehalten (-) oder überschritten (+) wurde.

Tabelle 52 – Klinische Parameter zur Einteilung der Studienpatienten

Diagnosekriterien		Patient 1			Patient 2								
		Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 1	Tag 3	Tag 5						
I	Infektionsnachweis	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+		
	Temperatur (°C)	38,8	+	38,7	+	37,8	-	36,4	-	36,0	+	36,1	-
	Herzfrequenz (1/min)	106	+	106	+	120	+	107	+	110	+	107	+
II	Atemfrequenz (1/min) oder	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-	/	+
	Partialdruck CO ₂ (kPa)	5,3		4,7		4,2		5,3		4,8		4,1	
	Leukozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	17,5	+	8,2	-	10,3	-	27,0	+	22,2	+	19,0	+
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	3	/	2	/	2	/	2	/	3	/	3
	„Glasgow Coma Scale“	6 ⁴⁰	-	15	-	15	-	4	+	9	-	9	-
	Thrombozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	230	-	280	-	457	-	95	+	118	-	66	+
	Partialdruck O ₂ (kPa) oder	/	-	12,3	-	13,8	-	/	-	/	-	/	-
	Oxygenierungsindex ⁴¹	352		/		/		480		592		532	
III	[C] _{Kreatinin, Serum} (µmol/l)	59	-	76	-	105	-	250	+	375	+	314	+
	pH-Wert oder	7,34		7,38		7,43		7,31		7,33		7,42	
	BE ⁴² (mmol/l) oder	0,5	-	-1,9	-	-2,6	-	-4,6	-	-6,1	+	-3,4	-
	[C] _{Laktat, Plasma} (mmol/l)	1,6		0,9		0,6		2,1		1,3		1,9	
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	0	/	0	/	0	/	3	/	2	/	2
IV	MAP ⁴³ (mmHg) und/oder	62		83		67		51		46		61	
	VP1 ⁴⁴ (µg/kg · min) oder	0	+	0	-	0	-	0	+	0	+	0	+
	VP2 ⁴⁵ (µg/kg · min)	0,20		0		0		0,03		0,08		0,06	
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	1	/	0	/	0	/	1	/	1	/	1
	Diagnosekriterien I + II	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	+
	Diagnosekriterien I + II + III	/	-	/	-	/	-	/	+	/	+	/	+
	Diagnosekriterien I + II + III + IV	/	-	/	-	/	-	/	+	/	+	/	+
Diagnose		Sepsis					Septischer Schock						

⁴⁰ Bewusstseinsbeeinträchtigung nicht auf Sepsis zurückzuführen.

⁴¹ Berechnet aus p_aO₂/F_iO₂ (nur für beatmete Patienten).

⁴² Basenüberschuss

⁴³ Mittlerer arterieller Blutdruck

⁴⁴ Umfasst die Vasopressoren Dopamin und Dobutamin.

⁴⁵ Umfasst die Vasopressoren Adrenalin und Noradrenalin.

Tabelle 52 – Klinische Parameter zu Einteilung der Studienpatienten (Fortsetzung 1)

Diagnosekriterien		Pat. 3		Patient 4				Patient 5							
		Tag 1		Tag 1		Tag 3		Tag 5		Tag 1		Tag 3		Tag 4	
I	Infektionsnachweis	/	+	/	+	/	+	/	+	/	-	/	-	/	-
	Temperatur (°C)	34,6	+	35,7	+	35,8	+	36,0	+	35,0	+	36,7	-	36,8	-
	Herzfrequenz (1/min)	150	+	107	+	88	-	116	+	119	+	100	+	103	+
II	Atemfrequenz (1/min) oder	/	-	/	-	/	-	/	-	/	+	/	-	/	-
	Partialdruck CO ₂ (kPa)	5,0	-	4,8	-	5,0	-	4,9	-	4,2	+	5,7	-	5,1	-
	Leukozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	2,1	+	17,1	+	18,0	+	16,5	+	10,2	-	8,7	-	9,1	-
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	3	/	3	/	2	/	3	/	3	/	1	/	1
	„Glasgow Coma Scale“	3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	11	-
	Thrombozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	268	-	29	+	26	+	24	+	177	-	98	+	122	-
	Partialdruck O ₂ (kPa) oder	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	+
	Oxygenierungsindex ⁴¹	458	-	525	-	300	-	360	-	510	-	322	-	232	+
III	[c]Kreatinin, Serum (µmol/l)	105	-	222	+	145	-	106	-	60	-	77	-	62	-
	pH-Wert oder	7,22	-	7,22	-	7,29	-	7,29	-	7,39	-	7,37	-	7,41	-
	BE ⁴² (mmol/l) oder	-10,9	+	-6,6	+	-4,1	+	-3,9	+	0,4	-	2,6	-	3,5	-
	[c]Laktat, Plasma (mmol/l)	5,8	-	6,4	-	1,1	-	0,7	-	1,2	-	0,7	-	0,8	-
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	2	/	4	/	3	/	3	/	1	/	2	/	1
IV	MAP ⁴³ (mmHg)	50	-	52	-	68	-	68	-	60	-	62	-	61	-
	VP1 ⁴⁴ (µg/kg · min)	0	+	6,00	+	6,00	+	1,49	+	0	+	0	+	0	+
	VP2 ⁴⁵ (µg/kg · min)	0,99	-	0,30	-	0,18	-	0,07	-	0,33	-	0,16	-	0,11	-
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	1	/	1	/	1	/	1	/	1	/	1	/	1
	Diagnosekriterien I + II	/	+	/	+	/	+	/	+	/	-	/	-	/	-
	Diagnosekriterien II	/	-	/	-	/	-	/	-	/	+	/	+	/	+
	Diagnosekriterien I + II + III	/	+	/	+	/	+	/	+	/	-	/	-	/	-
	Diagnosekriterien I + II + III + IV	/	+	/	+	/	+	/	+	/	-	/	-	/	-
Diagnose		Septischer Schock							SIRS						

Tabelle 52 – Klinische Parameter zur Einteilung der Studienpatienten (Fortsetzung 2)

Diagnosekriterien		Patient 6			Pat. 7	Pat. 8					
		Tag 1	Tag 2	Tag 4	Tag 1	Tag 1					
I	Infektionsnachweis	/	+	/	+	/	-	/	-		
II	Temperatur (°C)	38,0	+	36,2	-	38,0	+	34,6	+	36,1	-
	Herzfrequenz (1/min)	176	+	109	+	91	-	94	+	87	-
	Atemfrequenz (1/min) oder	/	-	/	-	/	-	20	+	23	+
	Partialdruck CO ₂ (kPa)	5,2	-	5,0	-	5,4	-	5,6	-	4,6	-
	Leukozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	8,5	-	12,9	+	7,1	-	6,5	-	9,9	-
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	2	/	2	/	1	/	3	/	1
III	„Glasgow Coma Scale“	3	+	3	+	3	+	15	-	14	-
	Thrombozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	160	-	114	-	135	-	152	-	217	-
	Partialdruck O ₂ (kPa) oder	/	+	/	+	/	+	11,1	-	18,1	-
	Oxygenierungsindex ⁴¹	158	-	225	-	195	-	/	-	/	-
	[c] _{Kreatinin, Serum} (µmol/l)	121	-	88	-	72	-	60	-	78	-
	pH-Wert oder	7,25	-	7,33	-	7,37	-	7,39	-	7,39	-
	BE ⁴² (mmol/l) oder	-5,1	+	-0,9	-	3,3	-	2,3	-	0,1	-
	[c] _{Laktat, Plasma} (mmol/l)	4,1	-	2,1	-	1,0	-	0,7	-	0,9	-
Anzahl zutreffende Kriterien	/	3	/	2	/	2	/	0	/	0	
IV	MAP ⁴³ (mmHg)	57	-	65	-	55	-	56	-	69	-
	VP1 ⁴⁴ (µg/kg · min)	0	+	0	+	0	+	0	+	0	-
	VP2 ⁴⁵ (µg/kg · min)	0,40	-	0,34	-	0,12	-	0,14	-	0,04	-
	Anzahl zutreffende Kriterien	/	1	/	1	/	1	/	1	/	0
Diagnosekriterien I + II		/	+	/	+	/	+	/	-	/	-
Diagnosekriterien I + II + III		/	+	/	+	/	+	/	-	/	-
Diagnosekriterien I + II + III + IV		/	+	/	+	/	+	/	-	/	-
Diagnose		Septischer Schock			ITS-Kontrolle						

Ergebnisse

Mit Hilfe der in Tabelle 52 aufgeführten klinischen Parameter konnten fünf Probanden der Gruppe der Sepsispatienten sowie zwei Probanden der ITS-Kontrolle zugeordnet werden. Von den fünf Sepsispatienten befanden sich vier an allen Entnahmetagen im Stadium des septischen Schocks und ein Patient im Stadium der Sepsis. Die einzige weibliche Patientin wurde entsprechend der Diagnosekriterien in die SIRS-Gruppe eingeordnet. Allerdings hat die Patientin am zweiten und dritten Entnahmetag die Kriterien für das Vorliegen eines SIRS nicht mehr erfüllt, da sich die gemessene Temperatur, die Atemfrequenz sowie der CO₂-Partialdruck wieder innerhalb des Normalbereichs befanden. Damit war jedoch keine allumfassende Verbesserung der Vitalfunktionen verbunden, wie die Werte für die Herzfrequenz, den mittleren arteriellen Blutdruck sowie allgemein des SOFA zeigen. Aus diesem Grund wurden auch die Blutproben des zweiten und dritten Entnahmetags der SIRS-Gruppe zugeordnet.

Alle für die Bestimmung des SOFA benötigten klinischen Parameter sind in Tabelle 53 aufgeführt. Die sich an die Werte der klinischen Parameter unmittelbar rechts anschließenden Zellen enthalten die entsprechende Punktzahl, mit deren Hilfe die Berechnung des Gesamtscores erfolgte. Anhand des Farbschlüssel können die einzelnen Probanden der entsprechenden Patientengruppe zugeordnet werden.

Tabelle 53 – Klinische Parameter zur Bestimmung des SOFA

Klinische Parameter	Patient 1						Patient 2						Pat. 3	
	Tag 1		Tag 3		Tag 5		Tag 1		Tag 3		Tag 5		Tag 1	
„Glasgow Coma Scale“	6	3	15	0	15	0	4	4	9	3	9	3	3	4
Oxygenierungsindex ⁴¹	352	1	N.b.	0	N.b.	0	480	0	592	0	532	0	458	0
MAP ⁴³ (mmHg)	62	1	83	0	67	1	51	3	46	3	61	3	50	4
Thrombozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	230	0	280	0	457	0	95	2	118	1	66	2	268	0
[c] _{Kreatinin} , Serum (μmol/l)	59	0	76	0	105	1	250	2	375	3	314	3	105	1
[c] _{Bilirubin} , Serum (μmol/l)	10	0	9	0	4	0	299	4	312	4	291	4	26	1
Gesamtscore		5		0		2		15		14		15		10

Farbschlüssel:

Sepsis

Septischer Schock

SIRS

ITS-Kontrolle

Tabelle 53 – Klinische Parameter zur Bestimmung des SOFA (Fortsetzung 1)

Klinische Parameter	Patient 4						Patient 5					
	Tag 1		Tag 3		Tag 5		Tag 1		Tag 3		Tag 4	
„Glasgow Coma Scale“	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	11	2
Oxygenierungsindex ⁴¹	525	0	300	1	360	1	510	0	322	1	232	2
MAP ⁴³ (mmHg)	52	4	68	4	68	3	60	4	62	4	61	4
Thrombozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	29	3	26	3	24	3	177	0	98	2	122	1
[c]Kreatinin, Serum (μmol/l)	222	2	145	1	106	1	60	0	77	0	62	0
[c]Bilirubin, Serum (μmol/l)	30	1	25	1	14	0	1	0	0	0	0	0
Gesamtscore	14		14		12		8		11		9	

Tabelle 53 – Klinische Parameter zur Bestimmung des SOFA (Fortsetzung 2)

Klinische Parameter	Patient 6						Pat. 7		Pat. 8	
	Tag 1		Tag 2		Tag 4		Tag 1		Tag 1	
„Glasgow Coma Scale“	3	4	3	4	3	4	15	0	14	1
Oxygenierungsindex ⁴¹	158	3	225	2	195	3	N.b.	0	N.b.	0
MAP ⁴³ (mmHg)	57	4	65	4	55	4	56	4	69	3
Thrombozytenzahl (in 10 ⁹ /l)	160	0	114	1	135	1	152	0	217	0
[c]Kreatinin, Serum (μmol/l)	121	1	88	0	72	0	60	0	78	0
[c]Bilirubin, Serum (μmol/l)	72	2	93	2	86	2	0	0	8	0
Gesamtscore	14		13		14		4		4	

Für jeden Patienten und jeden Entnahmetag konnten Werte für den SOFA bestimmt werden. Insbesondere die Patienten mit septischen Schock wiesen mit mindestens 10 Punkten deutlich erhöhte Scores auf, während für die ITS-Kontrollen sowie den Patienten mit Sepsis (ohne Organdysfunktion) maximal 5 Punkte erhalten wurden. Damit bestätigt der SOFA insbesondere die Einteilung der Sepsispatienten in die entsprechende Studiengruppe.

Der bisher einzige in der klinischen Routinediagnostik eingesetzten Biomarker für Sepsis ist Procalcitonin (PCT). Für eine erste Einschätzung der Eignung von CAAP47/CAAP48 als Biomarker für Sepsis war daher insbesondere der Vergleich mit der Konzentration von Procalcitonin im Serum der Studienpatienten von Bedeutung. Die hierfür erhobenen Konzentrationswerte des Procalcitonins sind in Tabelle 54 aufgeführt.

Tabelle 54 – Konzentration von Procalcitonin im Serum der Studienpatienten

Patient	[c] _{Procalcitonin, Serum} (ng/ml)		
	Tag 1	Tag 3	Tag 5
1	0,42	0,21	N. b.
2	6,29	5,50	5,09
3	59,50		
4	5,24	4,02	2,08
5	N. b.	0,30	0,20
6	10,50	8,91	4,82
7	0,44		
8	0,17		

Farbschlüssel:	Sepsis	Septischer Schock
	SIRS	ITS-Kontrolle

Für die Konzentrationswerte von Procalcitonin im Serum von Sepsispatienten existieren Schwellenwerte, anhand derer die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks eingeschätzt werden kann. Bei PCT-Konzentrationen <0,5 ng/ml gelten eine schwere Sepsis bzw. septischer Schock als ausgeschlossen, während sie bei >2,0 ng/ml hochwahrscheinlich sind [8]. Demnach sollten alle Patienten, bei denen in der vorliegenden Arbeit ein septischer Schock diagnostiziert wurde, PCT-Konzentration von >2,0 ng/ml aufweisen, was auch zutraf. Der einzige Patient mit Sepsis (ohne Organdysfunktion) wies PCT-Werte von <0,5 ng/ml auf, was ebenfalls mit den genannten Schwellenwerten übereinstimmt. Für die Patienten in den beiden Kontrollgruppen (SIRS und ITS-Kontrolle) wurden ebenfalls Werte <0,5 ng/ml erhalten. Anhand des PCT-Wertes war es daher möglich, Patienten mit septischem Schock von allen anderen Patienten zu unterscheiden. Nach umfangreichen chirurgischen Eingriffen, bei Polytraum oder kardiogenem Schock zeigen jedoch auch Patienten mit SIRS deutlich erhöhte PCT-Konzentration, weshalb aus den Ergebnissen der vorliegenden klinischen Studie nicht auf einen grundsätzlichen Unterschied zwischen SIRS und schwerer Sepsis/septischem Schock geschlossen werden sollte [8]. Auffällig ist der für Patient 3 bestimmte PCT-Wert, welcher 6-fach größer ist als die zweithöchste ermittelte Konzentration. Die enorme Schwankungsbreite ist charakteristisch für Procalcitonin, wobei sehr hohe Werte mit einer schlechten Prognose verbunden sind. Dies traf auch auf Patient 3 zu, der innerhalb von 24 h nach der ersten Probenentnahme verstarb.

5.4 Quantifizierung von CAAP48 in humanen Plasmaproben

Die Quantifizierung von CAAP48 in humanen Blutplasmaproben von Sepsispatienten und Probanden einer Kontrollgruppe erfolgte sowohl anhand von MALDI-TOF- als auch HPLC-ESI-MS/MS-Messungen. Mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden die Blutplasmaproben innerhalb von zwei Wochen zwei Mal analysiert. Die Quantifizierung unter Einsatz von HPLC-ESI-MS/MS erfolgte nur einmal, wobei der entsprechende Versuch 10 Monate nach den MALDI-TOF-Messungen durchgeführt wurde.

5.4.1 MALDI-TOF

Die Analyse der humanen Blutplasmaproben mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie umfasste sowohl die Quantifizierung von CAAP48 als auch von CAAP47, weshalb im Folgenden meist die Bezeichnung CAAP47/CAAP48 verwendet wird. Da die MALDI-TOF-Messungen an der Grenze der Empfindlichkeit für CAAP47/CAAP48 erfolgten, mussten für die Analyse jedes Probenspots 50000 Laserschüsse eingesetzt werden. Darüber hinaus wurde jede Probe auf acht verschiedene Spots des Probenträgers aufgetragen, dementsprechend erfolgte die Konzentrationsbestimmung achtfach. Als Zielparame-ter der Analysen fungierte die Intensität der Massensignale der intakten Molekül-Ionen von CAAP47 (m/z 4773,6) und CAAP48 (m/z 4787,6) in einem Spektrum. Um die Analyten in möglichst vielen Proben quantifizieren zu können, wurden bei der Auswertung der Massenspektren sehr niedrige Mindestanforderungen angewandt. So war es für die Bestimmung der Konzentration in einer Blutplasmaprobe bereits ausreichend, wenn in einem der acht aufgenommenen Massenspektren Massensignale mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ≥ 4 für einen der beiden Analyten sowie den internen Standard beobachtet wurden. Die Quantifizierung von CAAP47 und CAAP48 erfolgte schließlich mit Hilfe der gleichen Kalibrierfunktion, wobei die Grenzen des Quantifizierungsbereichs anhand der während der Methodenentwicklung ermittelten minimalen (0,25) und maximalen (3,5) Signalintensitätsverhältnisse gebildet wurden.

Die Ergebnisse der beiden Versuche der MALDI-TOF-gestützten Analyse zur Quantifizierung von CAAP47 und CAAP48 im Blutplasma von Sepsispatienten sind in Tabelle 55 zusammengefasst. Wobei zum Vergleich auch die Konzentrationen aufgeführt sind, die auf Basis von Signalintensitätsverhältnissen außerhalb des Quantifizierungsbereichs ermittelt wurden (grau dargestellt). Diagonal durchgestrichene Felder verweisen auf Patienten, die homozygot für den Wildtyp oder für das die Punktmutation E376D tragenden Allels des *SERPINA1*-Gens waren und in deren Blutproben daher entweder nur CAAP47 oder nur CAAP48 auftreten konnte.

Ergebnisse

Tabelle 55 – Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 mittels MALDI-TOF

Patient	Tag	[c] _{IS} (ng/μl)	I _{CAAP47} /I _{IS}		I _{CAAP48} /I _{IS}		[c] _{CAAP47} (ng/μl)		[c] _{CAAP48} (ng/μl)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
1	1	10,0	0,084	-	0,094	0,136	1,61	-	1,70	2,04
		2,5	1,056	-	1,052	0,556	2,42	-	2,41	1,38
	3	10,0	0,083	0,057	0,113	0,067	1,60	1,39	1,85	1,47
		2,5	0,844	0,307	0,908	0,423	1,98	0,86	2,11	1,11
	5	10,0	0,102	0,072	0,119	0,106	1,76	1,51	1,90	1,79
		2,5	0,897	0,575	1,107	0,647	2,09	1,42	2,52	1,57
2	1	10,0	/	/	0,247	0,164	/	/	2,96	2,27
		2,5	/	/	1,601	-	/	/	3,55	-
	3	10,0	/	/	0,335	0,358	/	/	3,69	3,88
		2,5	/	/	-	1,088	/	/	-	2,48
	5	10,0	/	/	0,264	-	/	/	3,10	-
		2,5	/	/	2,206	0,884	/	/	4,80	2,06
3	1	10,0	/	/	0,120	0,122	/	/	1,91	1,93
		2,5	/	/	1,128	-	/	/	2,57	-
4	1	10,0	/	/	-	-	/	/	-	-
		2,5	/	/	-	-	/	/	-	-
	3	10,0	/	/	0,137	-	/	/	2,05	-
		2,5	/	/	-	-	/	/	-	-
	5	10,0	/	/	0,105	-	/	/	1,78	-
		2,5	/	/	-	-	/	/	-	-
6	1	10,0	0,066	-	0,083	0,078	1,46	-	1,60	1,56
		2,5	0,355	-	0,390	-	0,96	-	1,04	-
	2	10,0	0,063	-	0,105	0,091	1,44	-	1,78	1,67
		2,5	-	-	0,444	-	-	-	1,15	-
	4	10,0	-	-	0,092	0,073	-	-	1,68	1,52
		2,5	0,312	-	0,386	0,396	0,88	-	1,03	1,05

Tabelle 55 – Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 mittels MALDI-TOF (Fortsetzung)

Patient	Tag	[c] _{IS} (ng/μl)	I _{CAAP47} /I _{IS}		I _{CAAP48} /I _{IS}		[c] _{CAAP47} (ng/μl)		[c] _{CAAP48} (ng/μl)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
7	1	10,0	0,087	-			1,64	-		
		2,5	0,429	0,345			1,13	0,94		
8	1	10,0	-	-	0,52	-	-	-	1,35	-
		2,5	-	-	-	-	-	-	-	-

Farbschlüssel:

Sepsis

Septischer Schock

ITS-Kontrolle

Insgesamt konnte die Konzentration von CAAP47/CAAP48 in den Blutplasmaproben von 11 der insgesamt 18 Entnahmezeitpunkte bzw. in fünf von acht Patienten bestimmt werden. Alle ermittelten Konzentrationen befinden sich am unteren Ende des Erwartungsbereiches, weshalb Proben, die mit 50 ng/μl internen Standard versehen waren, von der Datenauswertung ausgeschlossen wurden. Im zweiten Versuch erfolgte daher von vornherein keine Verwendung des internen Standards mit einer Konzentration von 50 ng/μl. Die Ergebnisse der Quantifizierung von CAAP48 in Proben mit 2,5 ng/μl und 10,0 ng/μl internem Standard waren vergleichbar. Eine Erweiterung des Quantifizierungsbereichs durch Ausweitung der untersuchten Konzentrationsverhältnisse von Analyt und internem Standard (z.B. 0,1 bis 10,0) wäre daher zumindest für Proben mit 10,0 ng/μl internem Standard sinnvoll. Auffällig ist jedoch, dass einige Konzentrationswerte beim zweiten Versuch deutlich geringer waren. Da dies nicht auf alle Proben zutraf, können die Unterschiede am besten mit der für Analysen nahe der Empfindlichkeitsgrenze typischen hohen Streuung erklärt werden. Diese Vermutung wird beispielsweise von den für Patient 1 an den Tagen 3 und 5 ermittelten Ergebnissen gestützt. Während die CAAP48-Konzentrationen, die mit Hilfe von 10,0 ng/μl internem Standard bestimmt wurden, in beiden Versuchen gut übereinstimmten, wichen die mit 2,5 ng/μl internem Standard ermittelten Werte durchgängig deutlich voneinander ab (teilweise um Faktor 2).

Ein Vergleich der für CAAP47 und CAAP48 erhaltenen Ergebnisse der Quantifizierung zeigt, dass beide Peptide in annähernd gleicher Konzentration (im Mittel waren die für CAAP47 bestimmten Konzentrationen um 11,0 % geringer als die für CAAP48) im Blutplasma von Patienten, die heterozygot für das die Punktmutation E376D tragende Allel des *SERPINA1*-Gens waren, auftraten. Konnte nun in der Blutprobe eines heterozygoten Trägers der Punktmutation die Konzentration nur von CAAP47 oder von CAAP48 ermittelt werden, so wurde die Gesamtkonzentration CAAP47/CAAP48 durch Verdopplung des vorhandenen Konzentrationswertes bestimmt. Wenn hingegen sowohl für CAAP47 als auch für CAAP48 die entsprechende Konzentration ermittelt werden konnte, wurden die beiden Werte zur Berechnung der Gesamtkonzentration von CAAP47/CAAP48 addiert.

Ergebnisse

Für eine weitergehende Auswertung der MALDI-TOF-basierten Quantifizierungsergebnisse wurde für jeden Entnahmezeitpunkt der Mittelwert der in zwei Experimenten bestimmten Konzentrationswerte berechnet (Tabelle 56).

Tabelle 56 – Quantifizierungsergebnisse für CAAP47/CAAP48

Patient	Tag	[c] _{IS} (ng/μl)	[c] _{CAAP47/CAAP48} (ng/μl)		
			1	2	\bar{x}
1	1	2,5	4,83	2,76 ⁴⁶	3,79
	3	2,5	4,09	1,97	3,03
	5	2,5	4,61	2,99	3,80
2	1	10,0	2,96	-	3,25
		2,5	3,55	-	
	3	10,0	3,69	3,88	3,35
		2,5	-	2,48	
	5	10,0	3,10	-	3,32
		2,5	4,80	2,06	
3	1	2,5	2,57	-	2,57
6	1	2,5	2,00	-	2,00
	2	2,5	2,30 ⁴⁶	-	2,30
	4	2,5	1,91	2,10 ⁴⁶	2,00
7	1	2,5	1,12	0,94	1,03

Farbschlüssel: Sepsis Septischer Schock ITS-Kontrolle

Insgesamt betrachtet bewegten sich die für CAAP47/CAAP48 im Blutplasma von Sepsispatienten bestimmten Konzentrationen in einem kleinen Bereich (Minimum: 0,94 ng/μl, Maximum: 4,83 ng/μl). Allerdings wichen die Werte der Doppel- bzw. Dreifachbestimmung deutlich voneinander ab. Dies kann, wie bereits erwähnt, am besten damit erklärt werden, dass die Analysen an der Grenze der Empfindlichkeit für CAAP48 durchgeführt wurden.

Während in den meisten (10 von 13) Blutplasmaproben der Sepsispatienten die Konzentration von CAAP48 ermittelt wurde, konnte nur für eine von fünf Proben der Probanden in den Kontrollgruppen ein Konzentrationswert bestimmt werden. Diese Beobachtung könnte zu der Annahme verleiten, dass die Konzentration von CAAP47/CAAP48

⁴⁶ Wert wurde durch Verdopplung der für CAAP48 bestimmten Konzentration ermittelt.

in den Kontrollgruppen generell geringer war. Allerdings erfolgten die Analysen an der Grenze der Empfindlichkeit für CAAP47 und CAAP48, weshalb aus fehlenden Werten nicht einfach auf eine geringere Konzentration geschlossen werden sollte. Um aufzuklären, ob die Konzentration von CAAP47/CAAP48 im Blutplasma von Sepsispatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ist, müssen auch für deren Proben Konzentrationswerte bestimmt werden. Dafür reichte die Empfindlichkeit des eingesetzten MALDI-TOF-Massenspektrometers jedoch nicht aus, weshalb zur Beantwortung dieser Frage der Einsatz eines HPLC-ESI-MS/MS-Systems notwendig war.

5.4.2 HPLC-ESI-MS/MS

Die nachfolgend vorgestellten Ergebnisse der HPLC-ESI-MS/MS-Analysen beruhen ausnahmslos auf den „Quantifier“ MRM-Übergängen von Analyt und internem Standard. Die Bestimmung der CAAP48-Konzentration erfolgte im Blutplasma sowohl von Sepsispatienten als auch von Probanden der Kontrollgruppen. Vor der Diskussion der Quantifizierungsergebnisse muss zuerst überprüft werden, ob die Kalibrierung sowie die Qualitätskontrollen die von der „European Medicines Agency“ definierten Akzeptanzkriterien eines analytischen Laufs erfüllten [57]. Letztere stimmen mit den bereits für die Validierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode verwendeten Kriterien überein. So sind die Akzeptanzkriterien zur Annahme der Kalibrierung erfüllt, wenn sich die ermittelte Richtigkeit für mindestens 75 % der Kalibranten im Bereich von 85 % bis 115 % (für LLOQ von 80 % bis 120 %) bewegt. In Tabelle 57 ist die Richtigkeit für jeden Kalibranten der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48 in Blutplasma verzeichnet.

Tabelle 57 – Richtigkeit der Kalibranten der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48

[c] _{Analyt, nom.} (ng/μl)	Signalfläche („Counts“)		„Area Ratio“	[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)	Richtigkeit (%)
	Analyt	IS			
0,10	2730	25500	0,11	0,10	101,0
0,25	5680	22700	0,25	0,24	96,6
1,25	45800	34500	1,33	1,30	104,0
2,50	32200	12500	2,57	2,52	101,0
7,50	533000	89100	5,99	(6,13)	(81,8)
15,00	69000	4680	14,80	14,50	96,5
20,00	446000	21700	20,60	20,20	101,0

Ergebnisse

Lediglich ein Kalibrant (nominelle Analyt-Konzentration von 7,5 ng/μl) erfüllte die Akzeptanzkriterien mit einer Richtigkeit von 81,8 % nicht. Da alle anderen Kalibranten die Kriterien jedoch erfüllten, konnte die Kalibrierung verwendet werden. Der Richtlinie entsprechend wurde der Kalibrant mit der unzureichenden Richtigkeit bei der Berechnung der Kalibrierfunktion nicht berücksichtigt. Letztendlich wurde die Funktion $y = 1,02 \cdot x + 0,0042$ erhalten, deren Bestimmtheitsmaß (R^2) 99,9 % betrug.

Die Entscheidung, ob ein analytischer Lauf angenommen werden kann oder nicht, wird auf Basis der Qualitätskontrollen getroffen. Die Akzeptanzkriterien zur Annahme der Kalibrierung sind erfüllt, wenn sich die ermittelte Richtigkeit für mindestens 67 % der Qualitätskontrollen im Bereich von 85 % bis 115 % (für LLOQ von 80 % bis 120 %) bewegt. Die für die Qualitätskontrollen der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48 in Blutplasma ermittelten Werte der Richtigkeit sind in Tabelle 58 verzeichnet.

Tabelle 58 – Richtigkeit der Qualitätskontrollen der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48

[c] _{Analyt, nom.} (ng/μl)	Signalfläche („Counts“)		„Area Ratio“	[c] _{Analyt, exp.} (ng/μl)	Richtigkeit (%)
	Analyt	IS			
0,10	3170	39600	0,08	0,07	74,4
0,25	10100	57100	0,18	0,17	67,7
2,50	48800	25900	1,89	1,85	73,9
15,00	239000	20400	11,70	11,50	76,7

Die für jede Qualitätskontrolle bestimmte Richtigkeit wies ausnahmslos zu geringe Werte auf. Somit wurden die Akzeptanzkriterien zur Annahme des Analysen-Laufes nicht erfüllt. In diesem Fall müsste eine Re-Analyse der Proben durchgeführt werden. Aufgrund der pro Patient nur begrenzt verfügbaren Plasmamenge war eine Re-Analyse jedoch nicht möglich. Betrachtet man die Werte der Richtigkeit, so fällt auf, dass diese durchgängig deutlich zu gering waren. Diese Beobachtung deutet auf das Vorhandensein eines systematischen Fehlers hin, der am einfachsten mit Abweichungen während der Herstellung der Verdünnungsreihe von Analyt und internem Standard für die Qualitätskontrollen erklärt werden kann. Andererseits waren bereits während der Methodvalidierung Abweichungen der anhand von Qualitätskontrollen bestimmten Werte für Präzision und Richtigkeit von den Akzeptanzkriterien aufgefallen. Diese Abweichungen wiesen jedoch nicht auf einen systematischen Fehler hin, sondern zeigten vielmehr eine ausgeprägte Streuung. Es bleibt daher unklar, worauf die Abweichungen der Richtigkeit in den Qualitätskontrollen zurückgeführt werden können. Weitergehende Aussagen sind vermutlich nur durch Ausweitung der Datengrundlage anhand weiterer Versuche und idealerweise die wiederholte Quantifizierung von CAAP48 in humanen Plasmaproben möglich.

Um herauszufinden, ob das HPLC-ESI-MS/MS-basierte Quantifizierungsverfahren grundsätzlich in der Lage ist die Konzentration von CAAP48 in humanem Blutplasma zu bestimmen, erfolgte trotz der für die Qualitätskontrollen beobachteten Abweichungen der Richtigkeit die Auswertung des Quantifizierungsversuchs. Dessen Ergebnisse sind in Tabelle 59 zusammengefasst, wobei die verschiedenen Sepsis-Stadien sowie die Kontrollgruppen anhand eines Farbschlüssels hervorgehoben werden.

Tabelle 59 – Quantifizierung von CAAP48 mittels HPLC-ESI-MS/MS

Patient	Tag	Signalfläche („Counts“)		„Area Ratio“	[c] _{CAAP48} (ng/μl)	[c] _{CAAP47/CAAP48} (ng/μl)
		Analyt	IS			
1	1	20600	44600	0,46	0,45	0,90
	3	7680	9320	0,82	0,81	1,62
	5	98300	109000	0,91	0,89	1,78
2	1	36900	28900	1,28	1,25	1,25
	3	37700	15200	2,49	2,44	2,44
	5	34100	17600	1,93	1,89	1,89
3	1	27300	29700	0,92	0,90	0,90
4	1	4530	5780	0,79	0,77	0,77
	3	20800	25700	0,81	0,79	0,79
	5	38000	62700	0,61	0,59	0,59
5	1	2480	20400	0,12	0,12	0,24
	3	6760	36300	0,19	0,18	0,36
	4	7270	31900	0,23	0,22	0,44
6	1	14900	23200	0,64	0,63	1,26
	2	35500	45100	0,79	0,77	1,54
	4	31500	46100	0,69	0,67	1,34
7	1	-	45200	-	-	-
8	1	13900	46800	0,30	0,29	0,58

Farbschlüssel:

Sepsis

Septischer Schock

SIRS

ITS-Kontrolle

Ergebnisse

Mit Hilfe des HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsverfahrens konnte CAAP48 in allen Blutplasmaproben quantifiziert werden. Davon ausgenommen ist jedoch Patient 7, da dieser als homozygoter Träger der Punktmutation E376D nur CAAP47 exprimierte. CAAP47 konnte mit der eingesetzten MS/MS-Methode nicht quantifiziert werden, weil diese die dafür notwendigen Massenübergänge nicht enthielt. Bei den heterozygoten Trägern der Punktmutation erfolgte daher die Bestimmung der Gesamtkonzentration von CAAP47/CAAP48 durch Verdoppelung des für CAAP48 ermittelten Konzentrationswertes.

Die für CAAP48 im Blutplasma der Patienten ermittelten Konzentrationen (Minimum: 0,12 ng/μl, Maximum: 2,44 ng/μl, Mittelwert: 0,80 ng/μl) decken die gesamte untere Hälfte des Quantifizierungsbereichs der HPLC-ESI-MS/MS-Methode ab. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit des HPLC-ESI-MS/MS-Systems umfassen die Konzentrationen einen erheblich größeren Bereich als die mittels MALDI-TOF bestimmten Werte. Die grundsätzliche Eignung der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode wird dadurch bestätigt, dass für jede Probe Konzentrationswerte für CAAP48 ermittelt werden konnten.

6 Diskussion

6.1 Probenaufarbeitungsmethode – Potentiale und Schwächen

Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Probenaufarbeitungsmethode umfasst zunächst die Denaturierung der Blutplasmaprobe mit Hilfe von Guanidinhydrochlorid sowie die anschließende Festphasenextraktion. Für deren Durchführung werden SPE-Platten eingesetzt, die innerhalb von etwa 30 Minuten die parallele Aufarbeitung von bis zu 96 Blutplasmaproben erlauben, was jedoch entsprechende Übung und Erfahrung voraussetzt. Selbst bei manueller Durchführung können mit dem verwendeten SPE-System pro Tag problemlos mehr als 1000 Proben aufgereinigt werden. Durch Kombination mit einem Pipettierroboter bieten die SPE-Platten prinzipiell die Möglichkeit für eine Probenaufarbeitung mit Hochdurchsatz. Durch Einsatz der Festphasenextraktion kann die Probenkomplexität deutlich verringert werden, was die Empfindlichkeit verbessert und die Analysengeräte schont. Eine Festphasenextraktion besitzt demnach einen grundsätzlichen Vorteil gegenüber Verfahren, bei denen die Probe lediglich verdünnt oder nur eine Proteinfällung durchgeführt wird.

Ein genereller Nachteil der etablierten Probenaufarbeitungsmethode sind die insbesondere mit der Nutzung von SPE-Platten verbundenen hohen Kosten, die pro Probe circa 5 Euro betragen⁴⁷. In der vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus auch die Schwächen der Festphasenextraktion bei der Aufreinigung von großen Peptiden aus einer komplexen biologischen Matrix deutlich. Die im Zuge der Validierung des HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsverfahrens bestimmte Extraktionseffizienz der SPE-Phase für CAAP48 in Blutplasma lag im Mittel bei lediglich 16,1 %. Dies lässt sich zumindest teilweise mit der komplexen Matrix erklären. So dürfte die hohe Konzentration von Lipiden/Phospholipiden im Blutplasma zu einer unzureichenden Bindung von CAAP48 an die stationäre Phase und damit dessen Verlust während der Aufreinigung führen. Allerdings beträgt die Extraktionseffizienz auch in Gegenwart von Wasser (und damit in Abwesenheit von interferierenden Verbindungen) im Durchschnitt nur 28,1 %. Dies deutet auf eine unvollständige bzw. schwache Bindung von CAAP48 an die stationäre Phase hin. Ursache könnten z. B. Sekundärstrukturen sein, die die initiale Denaturierung überdauern. Letztendlich sollte die geringere Probenkomplexität und die damit im Allgemeinen bessere Empfindlichkeit den Verlust an Analyt infolge der Festphasenextraktion jedoch ausgleichen.

⁴⁷ Die Kosten ergeben sich unter Berücksichtigung der zur Durchführung der Quantifizierung notwendigen Kalibrierproben, Qualitätskontrollen, Blanks sowie Doubleblanks. Demnach können mit einer 96-Well-SPE-Platte (Nettopreis etwa 350 Euro) ungefähr 66 Proben aufgereinigt werden.

6.2 Vergleich der massenspektrometrischen Quantifizierungsmethoden

Für den Vergleich der MALDI-TOF- und der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethode wurden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Tabelle 60 zusammengefasst.

Tabelle 60 – Vergleich der MALDI-TOF- und HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethoden

Parameter	MALDI-TOF	HPLC-ESI-MS/MS
Grundprinzip	Absolute Quantifizierung	
Zielparameter	Signalintensität [M+H] ⁺	Signalfläche MRM-Übergänge
Quantifizierungsbereich	1,0 ng/μl bis 125 ng/μl	0,1 ng/μl bis 20 ng/μl
[C] _{Interner Standard}	3	1
Kalibrierfunktion	Linear ($y = m \cdot x + n$)	
	$y = 1,21 \cdot x - 0,11$	$y = 1,22 \cdot x + 0,02^{48}$
Verschleppungen	Nicht möglich	Für [c] _{Analyt} ≥ 2,5 ng/μl
Validierung nach FDA/EMA	Nein	Ja
Analysenzeit/Probe	7 min	45 min

Beide Methoden sind für die absolute Quantifizierung von CAAP48 in humanen Blutplasmaproben konzipiert. Die hierfür genutzten Zielparameter sind jedoch verschieden. Während die MALDI-TOF-basierte Methode die Signalintensität der einfach geladenen intakten Molekül-Ionen ([M+H]⁺) von Analyt und internem Standard für die Quantifizierung verwendet, werden von der HPLC-ESI-MS/MS-Methode die Signalflächen von MRM-Übergängen genutzt. Letztere umfassen mehrere Paare, jeweils bestehend aus dem dreifach geladenen intakten Molekül/Vorläufer-Ion ([M+3H]³⁺) von Analyt oder internem Standard und einem daraus mittels CID erzeugten Fragment-Ion. Während demnach für die MALDI-TOF-basierte Quantifizierung nur intakte Molekül-Ionen genutzt werden, basiert die HPLC-ESI-MS/MS-Methode auf Paaren aus Vorläufer- und Fragment-Ionen. Damit ist letztere wesentlich selektiver und vor allem auch empfindlicher als die MALDI-TOF-Methode, da die genutzten MRM-Übergänge hochspezifisch für CAAP48 sind. Die Gegenwart einer anderen Verbindung mit den gleichen MRM-Übergängen in der untersuchten biologischen Matrix ist auch in Anbetracht der Größe von CAAP48 unwahrscheinlich. Durch die Fokussierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode auf einzelne Fragment-Ionen können mit ihrer Hilfe allerdings keine Informationen über möglicherweise vorhandene weitere Proteoformen des endogenen

⁴⁸ Bei Anstieg m und Schnittpunkt n der aufgeführten Kalibrierfunktion handelt es sich um Mittelwerte der während der Methodvalidierung zur Bestimmung der Linearität bestimmten Kalibrierfunktionen (Tabelle 43).

Analyten erhalten werden. Mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist es möglich, ohne Ausweitung der Analysenzeit für jede Probe ein vollständiges Massenspektrum aufzunehmen. Aus diesem lassen sich unter anderem Informationen über artifizielle oder biologische Modifikationen des Analyten ableiten. So konnte in der vorliegenden Arbeit ohne Zusatzaufwand neben CAAP48 auch die mutierte Form CAAP47 quantifiziert werden.

Mit 1,0 ng/μl bis 125 ng/μl ist der Quantifizierungsbereich der MALDI-TOF-basierten Methode zwar wesentlich größer als der für die HPLC-ESI-MS/MS-Methode bestimmte Bereich mit 0,1 ng/μl bis 20 ng/μl, allerdings verweist er auch auf die für CAAP48 deutlich geringere Empfindlichkeit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Des Weiteren deckt die HPLC-ESI-MS/MS-Methode den Bereich der in humanen Blutplasmaproben ermittelten CAAP48-Konzentrationen wesentlich besser ab. Für den großen Quantifizierungsbereich der MALDI-TOF-Methode muss der interne Standard außerdem in drei Konzentrationen eingesetzt werden, was zu einer entsprechenden Erhöhung des Verbrauchs an Blutplasma führt. Die größte Bedeutung besitzt darüber hinaus der untere Abschnitt des Quantifizierungsbereichs mit dem LLOQ, da Proben mit einer Konzentration des Analyten oberhalb des ULOQ verdünnt werden können. Der große Quantifizierungsbereich der MALDI-TOF-basierten Methode besitzt also letztendlich keine Vorteile.

Für die Anpassung der mit beiden Methoden aufgenommenen Kalibrierdaten genügte jeweils eine lineare Funktion ($y = m \cdot x + n$). Interessanterweise sind die trotz der Unterschiede im Ionisierungsprozess und der grundsätzlich verschiedenen Zielparameter mittels MALDI-TOF und HPLC-ESI-MS/MS ermittelten Kalibrierfunktionen sehr ähnlich. Dies könnte zumindest im Ansatz darauf hindeuten, dass innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs der Zusammenhang zwischen Signalintensität/-fläche von Analyt und internem Standard vor allem von den physikochemischen Eigenschaften und nicht vom gewählten Analysenverfahren bestimmt wird.

In Anbetracht des überwiegend hydrophilen Charakters von CAAP48 und seiner internen Standards konnten in den HPLC-ESI-MS/MS-Analysen Verschleppungen vorrangig für Proben mit höheren Analyt-Konzentrationen beobachtet werden. Innerhalb der Validierung wurde daher eruiert, ab welcher Konzentration mit einer Beeinträchtigung der Analysenergebnisse für die nachfolgende Probe zu erwarten ist. Demnach muss bei Blutplasmaproben ab einer Analyt-Konzentration von 2,5 ng/μl mit Verschleppungen gerechnet werden. Durch die Analyse eines Doubleblanks nach Proben mit einer hohen Analyt-Konzentration können die Auswirkung auf die Quantifizierungsergebnisse allerdings minimiert werden, da die zusätzliche Analyse einer Probe ohne Analyt dessen Rückstände im LC-MS/MS-System beseitigt.

Im Unterschied zur HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung ist bei den durchgeführten MALDI-TOF-Messungen keine Verschleppung des Analyten aufgetreten. Dies kann zum einen mit der intensiven Reinigung der Probenplatten nach jeder Probenserie und zum anderen mit deren koordinierter Verwendung begründet werden. Letztere bestand in der

bereits vor der ersten Nutzung erfolgten Zuordnung jedes Probenträgers entweder für Experimente mit (hohen Konzentrationen) synthetischer Standardpeptide oder für die Untersuchung biologischer Proben. Diese Zuordnung beruht auf der Beobachtung, dass bei der Analyse von Proben, die hochkonzentrierte synthetische Peptide enthalten, sog. „Memory“-Effekte auftreten können. Dabei werden über einen bestimmten Zeitraum Massensignale von Verbindungen beobachtet, die in einem vorherigen Versuch auf dem gleichen Probenspot aufgetragen waren. In biologischen Proben ist die Konzentration der Analyten hingegen (meist) zu gering, um „Memory“-Effekte auszulösen. Durch die koordinierte Verwendung von Probenträgern entweder für die eine oder die andere Anwendung wurden daher Verschleppungen vermieden.

Innerhalb der Validierung nach den von der FDA und der EMA definierten Leitlinien wurde nachgewiesen, dass das HPLC-ESI-MS/MS-basierte Quantifizierungsverfahren zuverlässig die Bestimmung der Konzentration von CAAP48 in Blutplasma ermöglicht. Die vorgegebenen Akzeptanzkriterien wurden von nahezu allen Methodenparametern eingehalten. Geringfügige Abweichungen ergaben sich lediglich für Richtigkeit und Präzision. Innerhalb des gewählten Konzentrationsbereichs ist der Zusammenhang zwischen Analyt-Konzentration und Messsignal linear. Darüber hinaus konnten die Verschleppung von Analyt und internem Standard sowie die Extraktionseffizienz und der Matrixeffekt quantitativ bestimmt werden.

Die Berechnung der in der vorliegenden Arbeit für die Quantifizierung von CAAP48 in einer Blutplasmaprobe mittels MALDI-TOF benötigten Zeit beruhte auf der Analyse von 8 Probenspots mit jeweils 50000 Laserschüssen. Bei einer Taktfrequenz des Lasers von 1 kHz ergab sich ein Zeitaufwand pro Probe von fast 7 min. Die hohe Anzahl an Laserschüssen war notwendig, weil die Quantifizierungsmethode an der Grenze der Empfindlichkeit für CAAP48 arbeitet und somit erst die Addition vieler Einzelspektren zu Signalen mit ausreichend hoher Intensität führt. Hieraus resultiert ein für MALDI-TOF-gestützte Analysen besonders großer Zeitbedarf. Dieser ist allerdings mit 7 min immer noch um den Faktor 6 bis 7 geringer als der Zeitbedarf einer HPLC-ESI-MS/MS-Analyse mit etwa 45 min. Letztere setzt sich aus 30 min Analysenzeit für die eigentliche Probe sowie die anteilige Berechnung des Zeitbedarfs zur Analyse der zur Quantifizierung notwendigen Kalibrierproben, Qualitätskontrollen, Blanks und Doubleblanks zusammen.

Für beide Methoden könnte die Analysenzeit teilweise deutlich verkürzt werden. Durch den Einsatz eines MALDI-TOF-Systems mit einer Taktfrequenz des Lasers von 10 kHz sowie durch Reduktion der Anzahl der Probenspots auf 5 wäre eine Verringerung der Analysenzeit pro Probe auf weniger als eine halbe Minute möglich. Bei der HPLC-ESI-MS/MS-Methode könnte der Zeitbedarf eines Analysenlaufs infolge der Verwendung einer kürzeren HPLC-Säule (150 mm statt 250 mm) sowie der Anpassung des Gradienten auf etwa 15 min verringert werden. Durch Einsatz eines UPLC-Systems wäre es darüber hinaus möglich, die Analysenzeit weiter zu senken.

6.3 Vergleich der ermittelten Konzentrationen

Um den Vergleich der mittels MALDI-TOF- und HPLC-ESI-MS/MS-Analysen ermittelten CAAP48-Konzentrationen zu ermöglichen, wurden die Werte in Tabelle 61 zusammengefasst.

Tabelle 61 – Vergleich der Quantifizierungsergebnisse für CAAP47/CAAP48

Patient	Tag	[c] _{CAAP47/CAAP48} (ng/μl)		[c] _{HPLC-ESI-MS/MS} / [c] _{MALDI-TOF} (%)
		MALDI-TOF	HPLC-ESI-MS/MS	
1	1	3,79±1,46	0,90	23,8
	3	3,03±1,49	1,62	53,5
	5	3,80±1,14	1,78	46,8
2	1	3,25±0,42	1,25	38,5
	3	3,35±0,76	2,44	72,8
	5	3,32±1,38	1,89	56,9
3	1	2,57	0,90	35,0
4	1	-	0,77	-
	3	-	0,79	-
	5	-	0,59	-
5	1	-	0,24	-
	3	-	0,36	-
	4	-	0,44	-
6	1	2,00	1,26	63,0
	2	2,30	1,54	67,0
	4	2,00±0,14	1,34	67,0
7	1	1,03±0,13	-	-
8	1	-	0,58	-

Farbschlüssel: Sepsis Septischer Schock SIRS ITS-Kontrolle

Mit einem LLOQ von 0,1 ng/μl ermöglichte das HPLC-ESI-MS/MS-basierte Quantifizierungsverfahren die Bestimmung der CAAP47/CAAP48-Konzentration in jeder der innerhalb der vorliegenden Arbeit gesammelten Blutplasmaproben (einzige Ausnahme ist der homozygote Träger der Mutation E376D). Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten CAAP47 und CAAP48 jeweils nur bis zu einer Konzentration von 1,0 ng/μl quantifiziert werden, was insbesondere für die Analyse der Plasmaproben der Kontrollgruppen (SIRS und ITS-Kontrolle) unzureichend war. Folglich wurden CAAP47 und CAAP48 mit Hilfe von MALDI-TOF

Diskussion

vor allem im Blutplasma von Sepsispatienten quantifiziert. Der Vergleich der mit beiden Verfahren ermittelten CAAP47/CAAP48-Konzentrationen muss daher auf die Sepsispatienten beschränkt bleiben. Besonders auffällig ist, dass die anhand von HPLC-ESI-MS/MS-Analysen bestimmten CAAP47/CAAP48-Konzentrationen im Mittel um die Hälfte geringer waren als die mit MALDI-TOF bestimmten. Die bei der Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 mittels HPLC-ESI-MS/MS für die Qualitätskontrollen beobachtete Abweichung der Richtigkeit könnte die Unterschiede erklären. Demnach müssten die mit HPLC-ESI-MS/MS bestimmten CAAP48-Konzentrationen im Mittel um 30 % höher sein. Allerdings wurden die HPLC-ESI-MS/MS-Analysen erst 10 Monate nach den MALDI-TOF-Messungen durchgeführt. Da eine Instabilität von CAAP47/CAAP48 in den Plasmaproben während der Langzeitlagerung bei -20 °C nicht ausgeschlossen werden kann, könnten die Konzentrationsunterschiede auch darauf zurückzuführen sein. Für den Vergleich der mit beiden Verfahren erzielten Quantifizierungsergebnisse wurden die für jede Patientengruppe ermittelten Konzentrationswerte in einem Einzelwertdiagramm aufgetragen (Abbildung 44). Auf eine statistische Analyse wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße verzichtet.

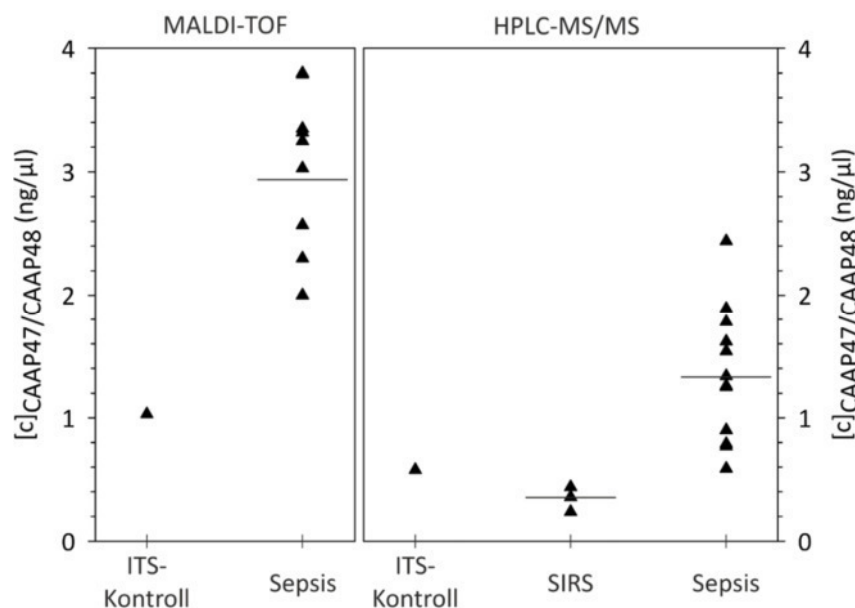


Abbildung 44: Einzelwertdiagramm der für CAAP47/CAAP48 in humanen Blutplasma-proben ermittelten Konzentrationen geordnet nach Patientengruppen und Quantifizierungsmethode (horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte).

Die auf Basis der des Einzelwertdiagramms entwickelten Schlussfolgerungen über mögliche Unterschiede der für die verschiedenen Patientengruppen bestimmten Konzentrationswerte für CAAP47/CAAP48 stehen unter dem Vorbehalt, dass die Anzahl der Patienten und Blutplasmaproben in allen Gruppen gering war. Anhand der beobachteten Unterschiede können demnach allenfalls Tendenzen über die Entwicklung der CAAP47/CAAP48-Konzentration im Blut von Sepsis- und Kontrollpatienten abgeleitet werden.

Die mittels MALDI-TOF-Analysen ermittelten CAAP47/CAAP48-Konzentrationen weisen auf einen deutlichen Unterschied zwischen Sepsispatienten und ITS-Kontrolle hin. So war das für die Sepsispatienten bestimmte Minimum (2,00 ng/μl) um den Faktor 2 größer als der in der ITS-Kontrolle beobachtete Wert (1,03 ng/μl). Auch für die mit Hilfe von HPLC-ESI-MS/MS-Messungen bestimmten CAAP47/CAAP48-Konzentrationen wurde ein Unterschied zwischen Sepsispatienten und ITS-Kontrolle beobachtet. Die für die ITS-Kontrolle erhaltene CAAP47/CAAP48-Konzentration (0,58 ng/μl) stimmte mit dem für die Sepsispatienten ermittelten Minimum (0,59 ng/μl) nahezu überein. Der Wert der ITS-Kontrolle befand sich demnach am unteren Ende des für die Sepsispatienten bestimmten Konzentrationsbereiches. Auch zwischen SIRS- und Sepsispatienten konnte ein Unterschied festgestellt werden. Während der für die SIRS-Patientin bestimmte Maximalwert (0,44 ng/μl) und das für die Sepsispatienten ermittelte Minimum (0,59 ng/μl) in einem ähnlichen Konzentrationsbereich lagen, unterschieden sich die Median- und Mittelwerte der beiden Gruppen um den Faktor 3. Insgesamt deutet der Vergleich der Konzentrationen auf Unterschiede insbesondere zwischen Sepsispatienten und den Probanden in den beiden Kontrollgruppen hin.

Trotz der Unterschiede zwischen den mittels MALDI-TOF und HPLC-ESI-MS/MS bestimmten absoluten Konzentrationen war das relative Verhältnis der Werte für die verschiedenen Patientengruppen ähnlich. Dies weist darauf hin, dass mit beiden Quantifizierungsmethoden grundsätzlich vergleichbare Aussagen erzielt werden.

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Stadien der Sepsis anhand der CAAP47/CAAP48-Konzentration unterschieden werden können, wurden die Konzentrationswerte nach Stadien geordnet in einem Einzelwertdiagramm aufgetragen (Abbildung 45).

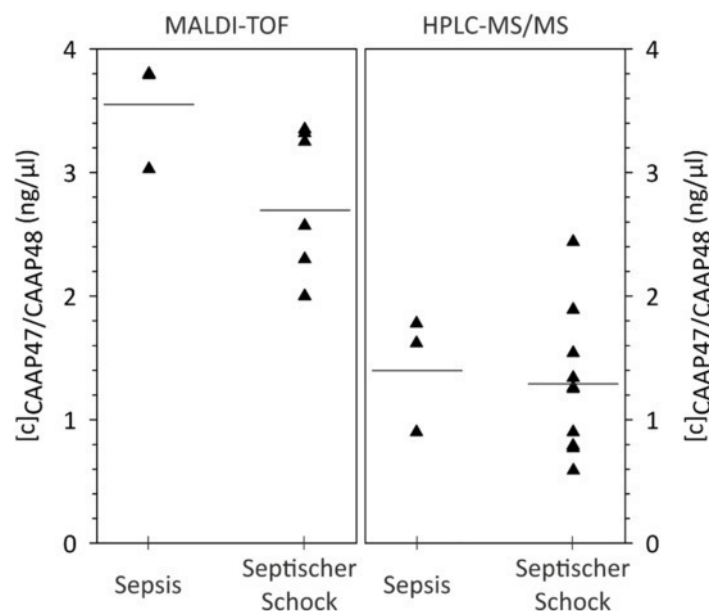


Abbildung 45: Einzelwertdiagramm der für CAAP47/CAAP48 in humanen Blutplasma-proben ermittelten Konzentrationen geordnet nach Sepsisstadium und Quantifizierungsmethode (horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte).

Diskussion

Für die mittels MALDI-TOF bestimmten CAAP47/CAAP48-Konzentrationen der Patienten mit Sepsis und septischem Schock wurden zwar Unterschiede bei den Mittelwerten (3,54 ng/µl bzw. 2,68 ng/µl) beobachtet, allerdings überlagerten die Konzentrationsbereiche der beiden Gruppen. Darüber hinaus waren die Mittelwerte der anhand von HPLC-ESI-MS/MS-Analysen für beide Stadien bestimmten Konzentrationen sehr ähnlich (1,43 ng/µl und 1,28 ng/µl). Auch überlagerten die Konzentrationsbereiche der beiden Gruppen. Demnach erlauben die vorliegenden Daten keine Rückschlüsse darüber, ob die Stadien einer Sepsis anhand der CAAP47/CAAP48-Konzentration unterschieden werden können.

6.4 Gegenüberstellung der Quantifizierungsergebnisse mit klinischen Parametern und dem SOFA

Für den Vergleich der Quantifizierungsergebnisse mit klinischen Parametern sowie dem SOFA wurden nur die mittels HPLC-ESI-MS/MS-Analysen ermittelten Konzentrationen von CAAP47/CAAP48 berücksichtigt. Dies kann damit begründet werden, dass nur mit Hilfe von HPLC-ESI-MS/MS für alle Patientengruppen Konzentrationswerte erhalten wurden. Darüber hinaus waren die anhand von MALDI-TOF- und HPLC-ESI-MS/MS-Messungen erzielten Ergebnisse vergleichbar, wenngleich die MALDI-TOF-Analysen an der Grenze der Empfindlichkeit für CAAP47/CAAP48 durchgeführt wurden und daher mit einer großen Unsicherheit behaftet sind. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der in den Patientenproben ermittelten Konzentrationen für CAAP47/CAAP48 sowie der klinischen Parameter und des SOFA sind in Tabelle 62 zusammengefasst.

Tabelle 62 – Klinische Parameter und SOFA-Werte der Studienpatienten

Klinische Parameter/Scores	Kontrollgruppen		Sepsis (gesamt)	Sepsis nach Stadium	
	ITS-Kontrolle	SIRS		Sepsis	Sept. Schock
Alter	63,0±18,4	57,0	54,4±22,0	19,0	63,3±11,1
Geschlecht (m/w)	2/0	0/1	5/0	1/0	4/0
Beatmung ⁴⁹	0 %	100 %	84,6 %	33,3 %	100,0 %
SOFA	4,0±0	9,3±1,5	10,9±5,2	2,3±2,5	13,5±1,5
PCT	0,3±0,1	0,2±0,1	9,4±16,1	0,3±0,1	11,2±17,1
CAAP47/CAAP48	0,58	0,35±0,10	1,31±0,53	1,43±0,47	1,28±1,26
N _{Patienten}	2	1	5	1	3
N _{Blutproben}	2	3	13	3	10

⁴⁹ Berechnet nach Entnahmetag.

Die Studienpatienten umfassten vor allem Menschen mit einem Alter >50 Jahre, einzige Ausnahme bildete Patient 1 mit 19 Jahren. Bei der Betrachtung des Geschlechts fällt auf, dass vorrangig männliche Probanden in die Studie eingeschlossen wurden. Dies verweist auf die allgemeine Tendenz, dass es sich bei Intensivpatienten mehrheitlich um Männer handelt [80]. Patienten mit septischen Schock und SIRS wurden durchgehend beatmet. Bei den Probanden der Gruppe ITS-Kontrolle erfolgte hingegen keine Beatmung und bei Patient 1 nur am ersten Entnahmetag. Die für den SOFA bestimmten Werte zeigen deutlich, dass eine Organdysfunktion vor allem bei Patienten mit SIRS und septischem Schock bestanden hat. Dies bestätigt die grundsätzliche Einteilung der Patienten in die einzelnen Gruppen. Eine Unterscheidung von Patienten mit SIRS und Sepsis anhand der SOFA-Werte war nicht möglich.

In Abbildung 46 sind die für den SOFA sowie für Procalcitonin und CAAP47/CAAP48 bestimmten Werte grafisch dargestellt.

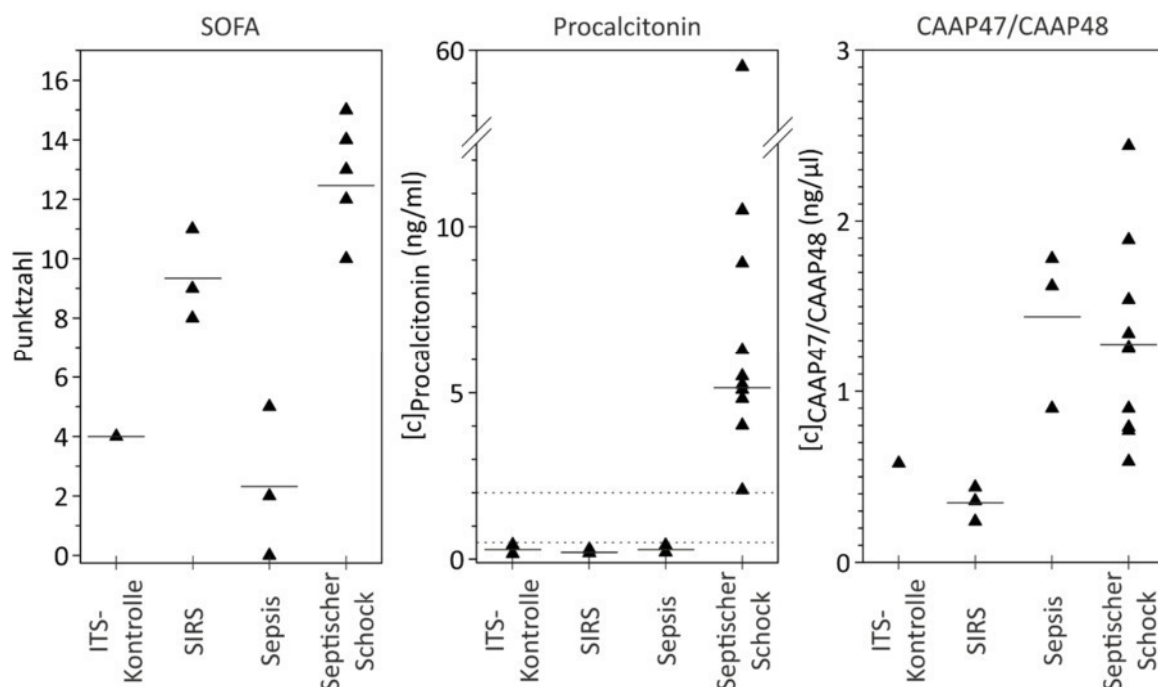


Abbildung 46: Einzelwertdiagramm der SOFA-Werte sowie der für CAAP47/CAAP48 und Procalcitonin ermittelten Konzentrationen geordnet nach Patientengruppen (horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte bzw. für PCT-Konzentrationen von Patienten mit septischen Schock den Median, gepunktete Linien verweisen auf PCT-Schwellenwerte).

Vergleicht man die drei Einzelwertdiagramme miteinander, so zeigen sich insbesondere zwischen Procalcitonin und CAAP47/CAAP48 Übereinstimmungen. Für beide wurden in Patienten mit septischem Schock deutlich höhere Werte als in den Probanden der Kontrollgruppen (ITS-Kontrolle, SIRS) beobachtet. Der einzige grundsätzliche Unterschied betraf die Patienten mit Sepsis und septischem Schock, für welche ähnliche CAAP47/CAAP48-Konzentrationen erhalten wurden, während sie bei Procalcitonin deutlich verschieden waren.

Die Auswertung der in den Einzelwertdiagrammen dargestellten Daten im Hinblick auf die (Früh-)Diagnose der Sepsis ermöglicht folgende Schlussfolgerungen: Die PCT-Werte waren nur bei Patienten mit septischem Schock erhöht, nicht aber im ersten Stadium der Sepsis. Eine Frühdiagnose der Sepsis anhand der Procalcitonin-Konzentration erscheint daher zumindest auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden klinischen Studie unwahrscheinlich. Im Unterschied dazu waren die CAAP47/CAAP48-Konzentrationen sowohl für Patienten mit Sepsis als auch mit septischem Schock im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöht. Dies deutet darauf hin, dass mit Hilfe der CAAP47/CAAP48-Werte auch die Diagnose des ersten Stadiums einer Sepsis möglich ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Übereinstimmungen der aus den PCT- und CAAP47/CAAP48-Werten abgeleiteten Aussagen auf eine mögliche Eignung von letzterem als Biomarker für Sepsis hinweisen. Insbesondere die für die Diagnostik der Sepsis wichtige Unterscheidung von der nicht-infektiösen SIRS erscheint anhand der CAAP47/CAAP48-Konzentration möglich.

6.5 Vergleich der Quantifizierungsergebnisse mit publizierten Daten

Die bisher einzigen Quantifizierungsergebnisse für CAAP47/CAAP48 in humanem Blutplasma wurden durch Blaurock *et al.* veröffentlicht [33]. Der entsprechende Artikel enthält darüber hinaus die Beschreibung eines HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsverfahrens für CAAP47/CAAP48, das sich allerdings in einigen grundsätzlichen Aspekten von dem in der vorliegenden Arbeit etablierten Verfahren unterscheidet. So umfasste die durch Blaurock *et al.* im Vorfeld der Quantifizierung durchgeführte Vorbereitung der Blutplasmaproben lediglich deren Verdünnung in einem Volumenverhältnis von 1:10 mit 20 mM Tris + 1 % Ameisensäure sowie die anschließende Inkubation für fünf Stunden bei Raumtemperatur. Damit beschränkten sich Blaurock *et al.* auf den kostengünstigsten und mit dem geringsten experimentellen Aufwand verbundenen Ansatz zur Probenvorbereitung, welcher allerdings keine Verringerung der Probenkomplexität oder Abtrennung von Störsubstanzen ermöglicht. Die eingesetzte HPLC-ESI-MS/MS-Methode erlaubte die Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 im Konzentrationsbereich von 2,0 ng/μl bis 200,0 ng/μl, wobei kein interner Standard verwendet wurde. Als Referenzmatrix diente eine Lösung aus bovinem Serumalbumin.

Blaurock *et al.* quantifizierten CAAP47/CAAP48 in Blutplasmaproben von Patienten mit SIRS sowie schwerer Sepsis und septischem Schock (definiert nach „Sepsis-2“), wobei die SIRS-Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt wurden (Polytrauma und herzchirurgischer Eingriff). Die für die Sepsispatienten bestimmten CAAP47/CAAP48-Konzentrationen weisen Werte im Bereich zwischen 20 ng/μl und 55 ng/μl auf und sind damit 10- bis 20-fach höher als die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Konzentrationen. Für die Patienten mit SIRS ermittelten Blaurock *et al.* Konzentrationswerte zwischen 3 ng/μl und 30 ng/μl, welche damit ebenfalls um ein Vielfaches höher sind als die in der vorliegenden Arbeit bestimmten. Die Ursache für

die großen Abweichungen der ermittelten Konzentrationswerte ist nicht bekannt. Allerdings zeigen auch die Quantifizierungsergebnisse von Blaurock *et al.* Unterschiede in Patienten mit Sepsis und SIRS. So wurde für Patienten mit einem SIRS nach Polytrauma oder herzchirurgischem Eingriff eine im Mittel 4- bzw. 2-fach geringere CAAP47/CAAP48-Konzentrationen bestimmt als für die Sepsispatienten. In der vorliegenden Arbeit war CAAP47/CAAP48 im Blutplasma der Patientin mit SIRS im Mittel 3-fach geringer konzentriert als im Plasma der Patienten mit Sepsis. Demnach ist zumindest das Verhältnis der für die einzelnen Patientengruppen bestimmten Konzentrationen vergleichbar. Somit weisen sowohl die in der vorliegenden Arbeit als auch die von Blaurock *et al.* erhobenen klinischen Daten auf eine im Vergleich mit Kontrollgruppen (SIRS-Patienten, ITS-Patienten ohne SIRS und Sepsis) höhere CAAP47/CAAP48-Konzentration im Blut von Sepsispatienten hin.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung und Validierung eines Massenspektrometrie-basierten Quantifizierungsverfahrens für den neuen Blutplasma-basierten Sepsisbiomarker CAAP48 sowie dessen Proteoform CAAP47. Die Verfügbarkeit eines entsprechenden Quantifizierungsverfahrens kann als Grundvoraussetzung für die klinische Validierung von CAAP47/CAAP48 angesehen werden.

Das entwickelte Verfahren setzt sich aus einer auf Festphasenextraktion beruhenden Probenvorbereitungsstrategie sowie zwei verschiedenen massenspektrometrischen Quantifizierungsmethoden zusammen, welche zum einen auf MALDI-TOF und zum anderen auf HPLC-ESI-MS/MS beruhen. Der auf HPLC-ESI-MS/MS-basierende Abschnitt des Quantifizierungsverfahrens wurde darüber hinaus in Anlehnung an FDA-Kriterien validiert. Die einzelnen Elemente des Verfahrens und ihre zeitliche Anordnung zur Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 in Blutplasmaproben sind in Abbildung 47 übersichtswise grafisch dargestellt.

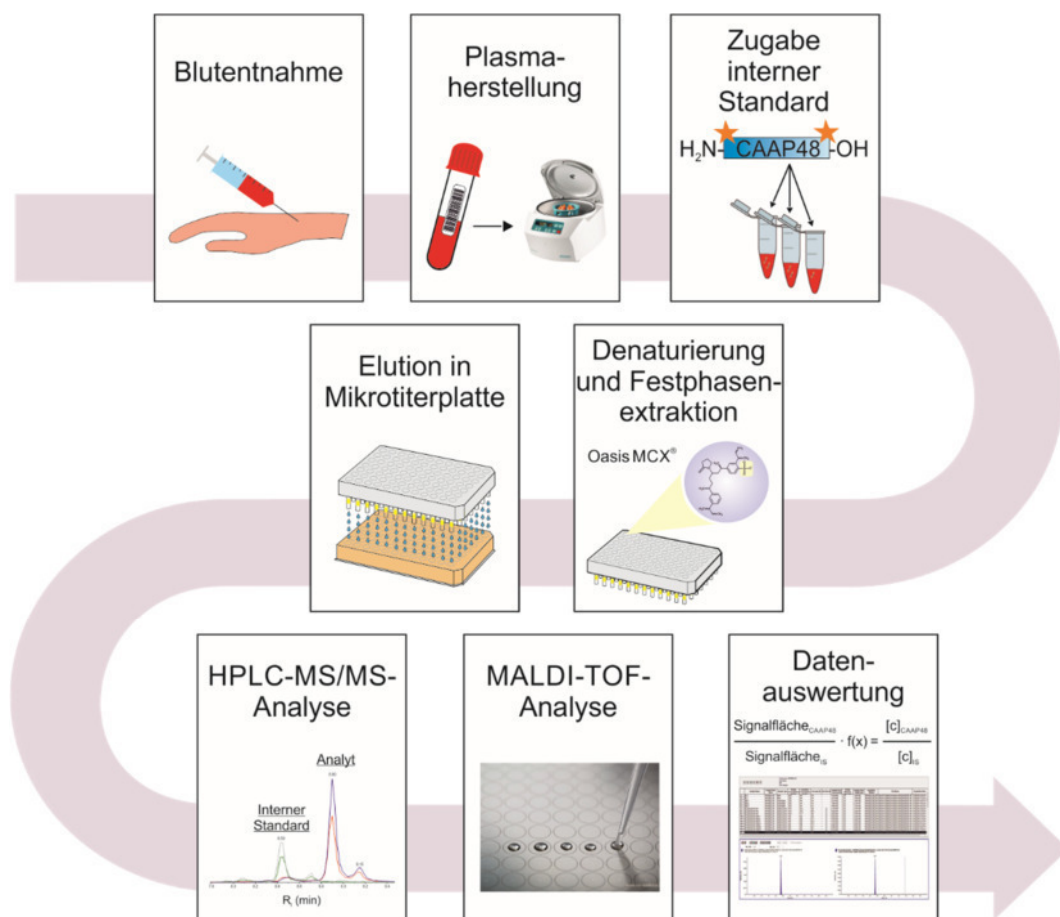


Abbildung 47: Arbeitsschritte der Quantifizierung von CAP47/CAAP48 in humanen Blutplasmaproben mittels MALDI-TOF- und HPLC-ESI-MS/MS-Analysen.

Anhand der in Anlehnung an FDA- und EMA-Kriterien durchgeführten Validierung des Quantifizierungsverfahrens konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration von CAAP48 in humanen Blutplasmaprobe im Bereich von 0,1 ng/µl bis 20,0 ng/µl zuverlässig mit Hilfe von HPLC-ESI-MS/MS-Analysen bestimmt werden kann.

Zum Nachweis der Eignung des Quantifizierungsverfahrens zur Analyse von CAAP47/CAAP48 im Blutplasma von Sepsis- und SIRS-Patienten waren entsprechende Proben notwendig, für deren Erhebung eine klinische Studie durchgeführt wurde. In dieser konnten insgesamt fünf Patienten mit Sepsis, eine Patientin mit SIRS und zwei Kontroll-Patienten (weder Sepsis noch SIRS) eingeschlossen werden. Die Patientenproben wurden schließlich sowohl mittels MALDI-TOF als auch HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Allerdings zeigte sich deutlich, dass die Empfindlichkeit des MALDI-TOF-Systems nicht ausreichend war. Daher konnte CAAP47/CAAP48 mit MALDI-TOF vorrangig in den Proben der Sepsispatienten quantifiziert werden, während für die meisten Proben der Kontrollgruppen keine Konzentrationswerte erhalten wurden. Mit Hilfe der HPLC-ESI-MS/MS-Analysen war die Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 hingegen in allen Patientenproben möglich.

Die mit beiden Quantifizierungsmethoden erhaltenen Ergebnisse weisen im Vergleich mit den Kontrollgruppen auf eine Erhöhung der CAAP47/CAAP48-Konzentration im Blutplasma von Sepsispatienten hin. Darüber hinaus wurden Unterschiede zwischen SIRS- und Sepsispatienten beobachtet. Damit hat die Analyse der klinischen Proben gezeigt, dass mit Hilfe des Quantifizierungsverfahrens Unterschiede in der CAAP47/CAAP48-Konzentration zwischen den Patientengruppen nachgewiesen werden können, womit dessen Eignung für die Analyse von humanen Blutplasmaprobe bestätigt ist. Allerdings muss das Verfahren zumindest teilweise noch um die Möglichkeit der Analyse der im Menschen häufig auftretenden Proteoform CAAP47 – die auf die Punktmutation E376D zurückgeführt werden kann – erweitert werden. Ansonsten besteht die Gefahr, dass für die Träger dieser Punktmutation verfälschte Daten erhalten werden. In der MALDI-TOF-Methode wurde CAAP47 bereits berücksichtigt, in die HPLC-ESI-MS/MS-Methode müssen die entsprechende Massenübergänge hingegen noch eingefügt werden.

Der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Quantifizierungsergebnisse für CAAP47/CAAP48 mit den für Procalcitonin (dem bisher einzigen in der klinischen Routine zur Diagnose der Sepsis eingesetzten Biomarker) bestimmten Werten, deutet im Hinblick auf die Unterscheidung von Sepsis- und Kontrollpatienten auf eine weitgehende Übereinstimmung hin. Damit ist die Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 ein vielversprechender Ansatz zur Frühdiagnose der Sepsis.

Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen, ist die klinische Validierung von CAAP47/CAAP48 als Sepsisbiomarker notwendig. Dazu muss eine möglichst große Anzahl an Blutplasmaprobe von Patienten mit Sepsis sowie von Probanden einer oder mehrerer Vergleichsgruppen analysiert werden. Eine entsprechende klinische Studie wird derzeit in Zusammenarbeit mit der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Die Studie umfasst

Zusammenfassung und Ausblick

insgesamt 40 Patienten (jeweils 20 weibliche und männliche), die sich einem herzchirurgischen Eingriff mit extrakorporaler Zirkulation unterziehen müssen. Da herzchirurgische Patienten häufig eine Sepsis oder ein SIRS entwickeln, ermöglicht die Studie den Vergleich von insgesamt drei Patientengruppen: Sepsis, SIRS und ITS-Kontrolle. Darüber hinaus werden von jedem eingeschlossenen Patienten an sechs verschiedenen Zeitpunkten (präoperativ sowie postoperativ nach 0 h, 6 h, 24 h, 72 h und 168 h) Blutproben entnommen, was den Vergleich des Krankheitsverlaufs mit der Entwicklung der CAAP47/CAAP48-Konzentration ermöglichen sollte.

Vermutlich ist jedoch die alleinige Bestimmung der Konzentration von CAAP47/CAAP48 zur Diagnose der Sepsis nicht ausreichend. Vielmehr sollte simultan auch die Konzentration von Alpha-1-Antitrypsin, aus dem CAAP47/CAAP48 durch eine proteolytische Spaltung gebildet wird, ermittelt werden. Da es sich bei Alpha-1-Antitrypsin um ein Akute-Phase-Protein handelt, unterliegt dessen Konzentration im Blut in Abhängigkeit vom Vorliegen von Entzündungsprozessen großen Schwankungen. Dies lässt vermuten, dass der Quotient der Konzentration von CAAP47/CAAP48 und Alpha-1-Antitrypsin besser geeignet ist, Aussagen über das Vorliegen oder den Verlauf einer Sepsis zu treffen. Ohne Kenntnis der Beziehung der beiden Konzentrationswerte erscheint eine Verwendung von CAAP48 als klinischer Biomarker zumindest weniger wahrscheinlich, weshalb innerhalb der derzeit durchgeführten klinischen Studie auch eine Bestimmung der Alpha-1-Antitrypsin-Konzentration geplant ist.

Die gleiche Notwendigkeit, mit der eine klinische Validierung erforderlich ist, besteht jedoch auch für die umfassende Aufklärung der für die Bildung von CAAP47/CAAP48 verantwortlichen biologischen Prozesse, über die bisher lediglich rudimentäre Erkenntnisse vorliegen. Auch über mögliche Funktionen des letztendlich in hohen Konzentrationen im Blut freigesetzten CAAP47/CAAP48 ist bisher nur wenig bekannt. Erste Arbeiten deuten aber auf verschiedene immunomodulatorische Eigenschaften hin.

Bis zum Einsatz von CAAP47/CAAP48 in der klinischen Routine zur Diagnose der Sepsis ist es somit vermutlich noch ein langer Weg, der in Anbetracht der hohen Fallzahlen und der damit verbundenen dramatischen Krankheitsverläufe jedoch mit Nachdruck verfolgt werden sollte.

8 Materialien und Methoden

8.1 Materialien

8.1.1 Laborkleingeräte

Für die Durchführung der in den nachfolgenden Abschnitten beschriebenen Arbeiten wurden verschiedene Laborkleingeräte verwendet, welche in Tabelle 63 aufgeführt sind.

Tabelle 63 – Übersicht der Laborkleingeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller	Typ
Kleinschüttler	IKA	MS 3 Basic
Magnetrührer	Heidolph	MR3001
Manuelle Einkanalpipetten	Mettler-Toledo	Pipet-Lite XLS+
	Gilson	Microman
Mikrozentrifuge	Corning	LSE Mini
pH-Meter	SI Analytics	Handylab pH11
Reinstwasseranlage	Merck-Millipore	Milli-Q Gradient
Semimikrowaage	Sartorius	Genius ME 215 P
Tischkühlzentrifuge	Beckman Coulter	Allegra 25R
	Hettich	MIKRO 220
Vakuumpumpe	KNF Neuberger	LABOPORT N 86 KTP

8.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind, geordnet nach Einsatzgebiet, in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 64 – Lösungsmittel für die HPLC-UV-Analysen

Bezeichnung	Abkürzung	Lieferant	Reinheitsgrad
Acetonitril	ACN	Merck	LC
Isopropanol	IPA	Merck	LC
Trifluoressigsäure	TFA	Merck-Millipore	Spektroskopie (98 %)
Wasser	H ₂ O	-	Milli-Q ⁵⁰

⁵⁰ Entnommen an einer Reinstwasseranlage „Milli-Q Gradient“ (Merck-Millipore).

Tabelle 65 – Chemikalien und Lösungsmittel für die Festphasenextraktion

Bezeichnung	Abkürzung	Lieferant	Reinheitsgrad
Acetonitril	ACN	Fluka	LC-MS
Ammoniumhydroxid	NH ₄ OH	Sigma-Aldrich	LC-MS (≥25 %)
Guanidinhydrochlorid	GdmCl	Nigu-Chemie	AA-grade
Methanol	MeOH	Fluka	LC-MS
Phosphorsäure	H ₃ PO ₄	Fluka	HPLC (≥85 %)
Trifluoressigsäure	TFA	Merck-Millipore	Spektroskopie (98 %)
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin	TCEP	Carl Roth	≥98% für die Biochemie
Wasser	H ₂ O	Honeywell	LC-MS

Tabelle 66 – Chemikalien und Lösungsmittel für die MALDI-TOF-Analysen

Bezeichnung	Abkürzung	Lieferant	Reinheitsgrad
Acetonitril	ACN	Fluka	LC-MS
Ameisensäure	FA	Sigma-Aldrich	LC-MS
2,5-Dihydroxybenzoesäure	DHB	Bruker Daltonik	Spektroskopie
Isopropanol	IPA	Merck	LC-MS
Methanol	MeOH	Fluka	LC-MS
Trifluoressigsäure	TFA	Merck-Millipore	Spektroskopie (98 %)
Wasser	H ₂ O	Honeywell	LC-MS

Tabelle 67 – Lösungsmittel für die HPLC-ESI-MS/MS-Analysen

Bezeichnung	Abkürzung	Lieferant	Reinheitsgrad
Acetonitril	ACN	Fluka	LC-MS
Ammoniumhydroxid	NH ₄ OH	Sigma-Aldrich	LC-MS (≥25 %)
Isopropanol	IPA	Merck	LC-MS
Wasser	H ₂ O	Honeywell	LC-MS

Tabelle 68 – Chemikalien für die Blutplasmaproben

Bezeichnung	Abkürzung	Lieferant	Reinheitsgrad
Guanidinhydrochlorid	GdmCl	Nigu-Chemie	AA-grade
cOmplete Protease Inhibitor	-	Roche	-

8.2 Methoden

8.2.1 Peptidstandards

Die in der Arbeit verwendeten Standardpeptide wurden ausnahmslos durch Peptid-Festphasensynthese („*Solid-phase Peptide Synthesis*“, SPPS) anhand der Fmoc-/tBu-Schutzgruppenstrategie dargestellt, im Anschluss mittels präparativer RP-HPLC gereinigt, danach gefriergetrocknet und schließlich bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Arbeiten wurden von Christina Schnittka und Marvin Hempel vom Labor für Medizinal- und Peptidchemie der Fraunhofer Projektgruppe für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung in Halle (Saale) durchgeführt.

8.2.2 Elementaranalyse

Zur Ermittlung der Gewichtsprozentanteile von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff sowie Schwefel in den synthetischen Peptidstandards wurden diese zunächst mit Sauerstoff katalytisch verbrannt. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Verbrennungsgase (N₂, CO₂, H₂O und SO₂) mittels Gaschromatographie sowie abschließend deren quantitativer Nachweis mit Hilfe eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors [81; 82]. Der Fluorgehalt der Probe wurde hingegen über eine Kombination von Pyrolyse und Ionenchromatographie („*Combustion Ion Chromatography*“) bestimmt.

Die Elementaranalysen wurden von Herrn Dr. rer. nat. Hendrik Wetzel vom Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (IAP) in Potsdam durchgeführt.

8.2.3 RP-HPLC-UV-Analyse

Für die chromatographische Charakterisierung der Peptidstandards wurde ein HPLC-System der Geräteserie „*Infinity 1260*“ (Agilent Technologies) verwendet. Dieses bestand aus einem Entgaser, einer binären Pumpe mit zentralem Bedienmodul, einem klimatisierten Probengeber, einem Säulenthmostat sowie einem Diodenarraydetektor (DAD). Die Steuerung des HPLC-Systems erfolgte mit Hilfe der Software „*OpenLab CDS ChemStation*“ (Version C.01.05, Agilent Technologies).

8.2.3.1 Probenvorbereitung und Datenaufnahme

Der erste Schritt der Vorbereitung der Peptidstandards für die RP-HPLC-UV-Analyse umfasste entweder das Lösen der gefriergetrockneten Peptide oder das Auftauen gefrorener Stocklösungen auf Eis. In beiden Fällen wurde die entsprechende Stocklösung im Anschluss

Materialien und Methoden

soweit verdünnt, dass sich die Konzentration der Probe innerhalb des für das verwendete HPLC-System analysierbaren Konzentrationsbereichs befand. Von den auf diese Weise vorbereiteten Probenlösungen wurden jeweils 25 µl in HPLC-Probenfläschen „KH-Vial G 03-PP“ (CS - Chromatographie Service) überführt und im Anschluss bis zum Start der Analyse im Probengeber (8 °C) gelagert. Die Analyse wurde durch Injektion von 5 µl Probenlösung gestartet und die Elution der Standardpeptide bei 220 nm aufgezeichnet.

Für die Analysenläufe wurde eine C₁₈-Chromatographiesäule „AdvanceBio Peptide Mapping“ (Agilent Technologies) genutzt. Diese hatte eine Länge von 150 mm und einen Innendurchmesser von 3 mm. Die darin enthaltenen Silika-Partikel besaßen eine Größe von 2,7 µm und die Poren einen Durchmesser von 120 Å. Die Verbindung der Chromatographiesäule mit dem HPLC-System erfolgte über Edelstahlkapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,12 mm.

Die Auftrennung der Standardpeptide erfolgte bei 25 °C mit einem linearen Gradienten (siehe Tabelle 69) und einer Flussrate von 0,5 ml/min in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch, dem als Ionenpaarbildner TFA zugegeben wurde. Während des Analysenlaufs wurde der Anteil von Acetonitril (mobile Phase B, Kanal B1, ACN/TFA (1000/1; v/v)) innerhalb von 10 min von 15 % auf 65 % erhöht. Gleichzeitig sank der Wasseranteil (mobile Phase A, Kanal A1, H₂O/TFA (1000/1; v/v)) von 85 % auf 35 %.

Tabelle 69 – Gradient der analytischen HPLC-Läufe

Zeit (min)	0,0	10,0	11,0	11,5	12,5	16,5
A1 (%)	85	35	5	5	85	85
B1 (%)	15	65	95	95	15	15

Das Waschen der Injektionsnadel vor jeder Injektion erfolgte mit einem Isopropanol/Wasser-Gemisch (Kanal B2 mit IPA/H₂O (700/300; v/v)). Nach Abschluss der Analysen wurde das HPLC-System mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (Kanal A2 ACN/H₂O (650/350; v/v)) säurefrei gespült. Die Leistung des HPLC-Systems und der Chromatographiesäule wurde regelmäßig mit Hilfe eines HPLC-Standards („Ten-peptide Standard“, Agilent Technologies) überprüft.

Die für die RP-HPLC-UV-Analysen verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind in Tabelle 64 übersichtsweise aufgeführt.

8.2.3.2 Datenauswertung

Die Auswertung der bei 220 nm aufgenommenen Chromatogramme bestand in der Integration der Signalfächen. Die hierfür verwendeten Integrationsparameter sind in Tabelle 70 zusammengefasst.

Tabelle 70 – Integrationsparameter

Zeit	Integrationsparameter	Wert
Gesamt	„Tangent Skim Mode“	Standard
Gesamt	„Tail Peak Slim Height Ratio“	0
Gesamt	„Front Peak Skim Height Ratio“	0
Gesamt	„Skim Valley Ratio“	20,0
Gesamt	„Baseline Correction“	Classical
Gesamt	„Peak to Valley Ratio“	500,0
Initial	„Slope Sensitivity“	10,0
Initial	„Peak Width“	0,1
Initial	„Area Reject“	0,1
Initial	„Height Reject“	0,1
Initial	„Shoulders“	Drop
0,0 min	Integration	Off
6,0 min	Integration	On
8,0 min	Integration	Off

8.2.4 Festphasenextraktion (SPE)

Die Vorbereitung von Proben für massenspektrometrische Analysen erfolgte mit Hilfe zwei verschiedener Typen („Oasis® WCX μ Elution Plate“ und „Oasis® MCX μ Elution Plate“) von SPE-Platten im 96-Well-Format (Waters). In jeder der 96 Kavitäten einer SPE-Platte befanden sich zwei Milligramm stationäre Phase, deren Partikel einen Durchmesser von 30 μ m und eine Porengröße von 80 Å aufwiesen.

Für die Durchführung der Festphasenextraktion wurden neben der entsprechenden SPE-Platte eine Vakuum-Absaugstation „Extraction Plate Manifold for Oasis 96-Well Plates“ (Waters) sowie 96-Well-Auffangplatten (Agilent Technologies) verwendet. Jede Festphasenextraktion umfasste folgende Arbeitsschritte:

1. Einsetzen der SPE-Platte in eine Vakuum-Absaugstation mit Auffangwanne.
2. Auftragen des Lösungsmittelgemischs zum Konditionieren der stationären Phase.
3. Erzeugen eines Unterdrucks (0,6 bis 0,8 bar) innerhalb der Absaugstation und damit unterhalb der SPE-Platte durch Anschließen einer Vakuumpumpe. In der Folge wird die im Reservoir befindliche Flüssigkeit durch die stationäre Phase hindurchgesaugt und über den Ablaufstutzen in die Auffangwanne befördert.

Materialien und Methoden

4. Belüften der Vakuumstation.
5. Wiederholen der Arbeitsschritte 2 bis 4 zum Äquilibrieren und Waschen der stationären Phase sowie zum Auftragen der Probe.
6. Entnahme der SPE-Platte aus der Absaugstation und Befestigen auf Auffangplatte.
7. Zentrifugieren von SPE- und Auffangplatte mit 250 xg (Ausschwingrotor) für 2 min, um letzte Reste der Waschlösung zu entfernen.
8. Austauschen der Auffangplatte und Zugabe des Elutionsmittels in das Probenreservoir der SPE-Platte.
9. Zentrifugieren von SPE- und Auffangplatte mit 500 xg (Ausschwingrotor) für 2 min.
10. Entfernen der SPE-Platte und Verdünnen der Eluate (in der Auffangplatte) mit H₂O.
11. Versiegeln der Auffangplatte mit einer Klebefolie als Verdunstungsschutz.
12. Schütteln der Eluate auf einem Mikrotiterplattenschüttler für 1 min.
13. Überführen der Auffangplatte in den Probengeber des HPLC-ESI-MS/MS-Systems.

Für das Schütteln der Auffangplatte wurde ein Mikrotiterplattenschüttler „*VARIOMAG Monoshake*“ (H+P Labortechnik) verwendet. Das Pipettieren der Probe und der Lösungsmittel(-gemische) erfolgt mit Hilfe von elektronischen 8-Kanal-Pipetten „*E1-ClipTip™ Equalizer*“ (Thermo Fisher Scientific). Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die für die einzelnen SPE-Platten spezifischen Arbeitsschritte werden nachfolgend übersichtsweise beschrieben:

„*Oasis® WCX μ Elution Plate*“ – In Vorbereitung der SPE-Aufreinigung wurden zunächst 50 μ l des internen Standards (gelöst in H₂O_{LC-MS}/ACN_{LC-MS} (900/100; v/v)) mit 100 μ l 5,0 M GdmCl gemischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 50 μ l Probe (z.B. Blutplasma) sowie die Inkubation bei 8 °C für 45 min. Danach wurden 100 μ l H₂O/H₃PO₄ (950/50; v/v) zugegeben und das Gemisch bei 8 °C für 15 min inkubiert (siehe Tabelle 71).

Tabelle 71 – Festphasenextraktion mit WCX-Material

Arbeitsschritt	Volumen	Lösungsmittel (-gemisch)
Konditionieren	200 μ l	MeOH
Äquilibrieren	200 μ l	H ₂ O _{LC-MS}
Auftragen	300 μ l	Probenlösung
Waschen 1	400 μ l	H ₂ O/NH ₄ OH (950/50; v/v)
Waschen 2	400 μ l	H ₂ O/ACN (900/100; v/v)
Eluieren	40 μ l	DHB-Matrix gelöst in ACN/H ₂ O/TFA (700/290/10; v/v/v)
Verdünnen ⁵¹	10 μ l	H ₂ O

⁵¹ Erfolgte durch Vorlegen von H₂O in die für die Elution verwendete Auffangplatte.

„Oasis® MCX μ Elution Plate“ – In Vorbereitung der SPE-Aufreinigung wurden zunächst 50 μ l des internen Standards (gelöst in ACN_{LC-MS}/H₂O_{LC-MS}/konzentrierte NH₄OH_{LC-MS} (750/150/100; v/v/v)) mit 100 μ l 5,0 M GdmCl gemischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 50 μ l Probenlösung (z.B. Blutplasma) sowie die Inkubation bei 8 °C für 45 min. Zum Abschluss wurden 100 μ l H₂O/H₃PO₄ (950/50; v/v) zugegeben und das Gemisch bei 8 °C für 15 min inkubiert (siehe Tabelle 72).

Tabelle 72 – Festphasenextraktion mit MCX-Material

Arbeitsschritt	Volumen	Lösungsmittel (-gemisch)
Konditionieren	200 μ l	MeOH
Äquilibrieren	200 μ l	H ₂ O/H ₃ PO ₄ (950/50; v/v)
Auftragen	300 μ l	Probenlösung
Waschen 1	400 μ l	H ₂ O/H ₃ PO ₄ (950/50; v/v)
Waschen 2	400 μ l	H ₂ O/ACN (900/100; v/v)
Eluieren	40 μ l	ACN/H ₂ O/NH ₄ OH (750/150/100; v/v/v)
Verdünnen ⁵¹	10 μ l	H ₂ O

Die für die Festphasenextraktion verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind in Tabelle 65 übersichtsweise aufgeführt.

8.2.5 MALDI-TOF-Analyse

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MALDI-TOF-Messungen wurden an einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer des Typs „Autoflex Speed“ (Bruker Daltonik) mit positiver Polarität und im Reflektormodus durchgeführt. Das Massenspektrometer war mit einem Nd:YAG-Feststoff-Laser des Typs „Smart Beam-II“ (Bruker Daltonik) ausgestattet, welcher eine Emissionswellenlänge von 355 nm und eine Pulsrate von 1 kHz aufwies. Als Probenträger diente eine Stahlplatte mit 384 kreisförmigen Probenspots im Format einer 384-Well-Mikrotiterplatte („MTP 384 Ground Steel Target“, Bruker Daltonik).

8.2.5.1 Probenvorbereitung und Datenaufnahme

Die Probenvorbereitung erfolgte mit der Matrixsubstanz 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Dazu wurden die Proben entsprechend der „Dried-droplet“-Methode in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit der Matrixlösung (bestehend aus 2 mg DHB-Matrix gelöst in 100 μ l ACN/H₂O/TFA (700/290/10; v/v/v)) gemischt und schließlich 1 μ l der Mischung auf einen Probenträger aufgetragen. Das Eintrocknen der Mischung unter Raumbedingungen führte zur Bildung von Matrix-Analyt-Kristallen. Bei Proben, die ein (stark) basisches Lösungsmittelgemisch enthielten, wurden zunächst 0,5 μ l der Probenlösung je Probenspot

aufgetragen. Nachdem das Lösungsmittel verdampft war, wurden 0,5 µl Matrixlösung auf jede eingetrocknete Probe aufgebracht.

Die Massenspektren wurden mit Hilfe von „*flexControl*“ (Version 3.4, Bruker Daltonik) durch Akkumulation von mindestens 10000 Einzelspektren je Probe aufgenommen. Dazu wurden Laserenergien geringfügig oberhalb des Schwellenwerts genutzt. Um eine Übersättigung des Detektors durch die zahlreichen Matrixmolekül-Ionen sowie bei den Plasmaextrakten durch die niedermolekularen Probenkomponenten zu verhindern, wurden alle Ionen bis m/z 1000 mit Hilfe der „*Deflection*“ ausgeblendet.

Die automatische Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe der in „*flexControl*“ integrierten Funktion „*AutoXecute*“. Innerhalb von „*AutoXecute*“ wurde jeder Probe unter Angabe der Position die Messmethode, der Name der Messdatei, der Speicherort sowie eine Laserenergie zugeordnet. Letztere wurde vor der automatischen Messung mit Hilfe eines Vorversuchs ermittelt und dann für alle Proben verwendet. Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte vor der Durchführung der automatischen Messung (siehe Abschnitt 8.2.5.2).

Die für die Vorbereitung der Proben zur MALDI-TOF-Analyse verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind in Tabelle 66 übersichtsweise aufgeführt.

8.2.5.2 Datenauswertung und Kalibrierung

Die Aufbereitung und Auswertung der MALDI-TOF-Massenspektren erfolgte mit Hilfe von „*flexAnalysis*“ (Version 3.4, Bruker Daltonik). Zur Bestimmung der Massensignale wurde der Algorithmus „*SNAP*“ verwendet. „*SNAP*“ sucht eigenständig nach bekannten Mustern in einem Spektrum und berechnet dann für die entsprechenden Massensignale ein theoretisches Isotopenmuster. Dies erfolgt unter Berücksichtigung des Ladungszustandes sowie der vermutlichen molekularen Zusammensetzung des entsprechenden Molekül-Ions. Um die Zusammensetzung abschätzen zu können, nutzt der Algorithmus für die Peptidanalytik ein Verhältnis, das von Bruker Daltonik als „*Average*“ bezeichnet wird. „*Average*“ gibt das Verhältnis der am Aufbau von Peptiden beteiligten Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und Schwefel wieder ($C = 4,9384$, $N = 1,3577$, $O = 1,4773$, $S = 0,0417$, $H = 7,7583$). Mit seiner Hilfe kann für eine beliebige Masse die durchschnittliche Zusammensetzung des entsprechenden Peptidmoleküls berechnet werden. Dies ist wiederum die Voraussetzung, um ein „*ideales*“ (theoretisches) Isotopenmuster erzeugen zu können, welches für eine nichtlineare Anpassung der Messdaten genutzt wird. Dabei wird das theoretische Isotopenmuster an das Isotopenmuster des beobachteten Massensignals hinsichtlich Signalhöhe und Auflösung angepasst, sodass es dessen Form möglichst exakt widerspiegelt. Die im Anschluss ermittelten Parameter wie monoisotopische Masse, Massenauflösung, Signalintensität, Signal-zu-Rausch-Verhältnis, usw. beziehen sich daher immer auf das theoretische Isotopenmuster und nicht auf die eigentlichen Messdaten. Damit ein Massensignal bzw. das entsprechende Isotopenmuster überhaupt als solches erkannt wurde, musste das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mindestens 4 betragen. Im Anschluss an die

Bestimmung der Massensignale wurde die Basislinie mit Hilfe des Algorithmus „TopHat“ subtrahiert sowie unter Nutzung eines Savitzky-Golay-Filters eine Glättung der Messdaten durchgeführt [83].

Jedes manuell aufgenommene Massenspektrum wurde mit Hilfe eines auf einem unmittelbar benachbarten ProbenSpot aufgetragenen Massenstandards kalibriert. Bei den dazu verwendeten Standards handelte es sich um den „*Peptide Calibration Standard II*“ (Bruker Daltonik), „*Bovine Insulin Oxidized B Chain*“ sowie „*Bovine Insulin*“ (beide Sigma-Aldrich). Die in den Standards enthaltenen Peptide ermöglichten die Kalibrierung im Bereich zwischen m/z 757,4 und m/z 5731,6 (bei insgesamt 10 Kalibranten).

8.2.6 HPLC-ESI-MS/MS-Analyse

Für die Analyse von CAAP48 wurde ein HPLC-ESI-Tripelquadrupol-System genutzt, welches aus einer HPLC-Anlage „*HP 1200*“ (Agilent Technologies) und einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer „*4000 QTRAP*“ (Sciex) bestand.

Die „*HP 1200*“-Anlage bestand aus einem Entgaser, einer binären Pumpe sowie einem klimatisierten Probengeber. Da die HPLC über keinen Säulenthmostaten verfügte, erfolgte die Auftrennung der Proben bei Raumtemperatur (im Mittel 22 °C bis 25 °C).

Das „*4000 QTRAP*“-System umfasste neben dem eigentlichen Massenspektrometer eine Vorvakuumpumpe (Agilent), eine „*Turbo V*“-Ionenquelle (Sciex), ein externes 10-Wege-Schaltventil (VIGI VALCO Instruments) sowie eine externe Spritzenpumpe „*11 Plus*“ (Harvard Apparatus). Letztere wurde mit Hilfe einer Mikroliterspritze „*Model 1001 Gastight*“ (Hamilton) mit einem Innendurchmesser von 4,61 mm betrieben. Bei der „*4000 QTRAP*“ handelt es sich um ein hybrides Tripelquadrupol/LIT-System, da der dritte Quadrupol (Q3) auch als lineare Ionenfalle („*Linear Ion Trap*“, LIT) genutzt werden konnte. Zur Steuerung des Massenspektrometers sowie zur Aufnahme und Auswertung von Daten wurde die Software „*Analyst*“ (Version 1.6.3, Sciex) genutzt. Die „*Turbo V*“-Ionenquelle erlaubt die Ionisierung von Analyten sowohl mittels ESI als auch mittels „*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*“ (APCI), wobei sich Letzteres vor allem für niedermolekulare unpolare Analyten eignet und daher für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Biomolekül nicht genutzt wurde. Zur Nutzung der Elektrospray-Ionisation musste in die „*Turbo V*“-Ionenquelle die „*TurbolonSpray*®“-Sonde (TIS-Sonde, enthält Sprühkapillare/Elektrode) eingebaut werden. Diese ermöglichte Flussraten von 5 µl/min bis 3000 µl/min und Temperaturen bis zu 750 °C.

8.2.6.1 Probenvorbereitung

Die Verdünnung der Standardpeptide erfolgte in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus ACN/H₂O/NH₄OH (750/150/100; v/v/v), welches entweder direkt injiziert (v. a. für Methodenentwicklung) oder mit Blutplasma gemischt wurde (v. a. für Methodenvalidierung und Quantifizierung von CAAP48_{endo}). Letzteres wurde im Anschluss mittels Festphasenextraktion (siehe Abschnitt 8.2.4) gereinigt und konzentriert.

Die in der vorliegenden Arbeit angeführten Konzentrationen von Analyt und internem Standard beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, ausschließlich auf den finalen Wert nach dem Verdünnen und/oder Mischen der Standardpeptide mit Lösungsmittel oder Plasma.

8.2.6.2 Datenaufnahme

Die für die Methodenentwicklung sowie die Analyse der Plasmaproben an dem eingesetzten HPLC-Tripel-Quadrupol-System durchgeführten Messungen können zwei verschiedenen Verfahren zugeordnet werden: Infusion und HPLC-ESI-MS/MS. In den folgenden Abschnitten werden die für die einzelnen Verfahren verwendeten Geräteeinstellungen übersichtsweise beschrieben.

Die Infusion wurde vorrangig zur Entwicklung von MS- und MS/MS-Methoden für die Standardpeptide verwendet. Dazu wurden Lösungen mit einer Peptidkonzentration von 10 ng/µl und einem Volumen von 2 ml genutzt. Diese Lösungen wurden unter Einsatz einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 10 µl/min in die Ionenquelle infundiert. Die für den Betrieb der „Turbo V“-Ionenquelle genutzten Parameter sind in Tabelle 73 dargestellt. Darüber hinaus wurde der Wert für das CAD-Gas⁵² auf „Medium“ eingestellt.

Tabelle 73 – Quelleneinstellungen für Infusion

CUR ⁵³	IS ⁵⁴ (V)	T ⁵⁵ (° C)	G1 ⁵⁶	G2 ⁵⁷	Position TIS-Sonde	
					Vertikal	Horizontal
10	5500	0	20	0	3	7

HPLC-ESI-MS/MS – Für die Durchführung von HPLC-ESI-MS/MS-Analysen wurden entweder 5 µl einer verdünnten Lösung der Standardpeptide aus HPLC-Probenfläschchen oder 96-Well-Auffangplatten injiziert. Bei Plasmaextrakten (gelöst in ACN/H₂O/NH₄OH (750/150/100; v/v/v)) erfolgte die Injektion hingegen ausnahmslos aus 96-Well-Auffangplatten, wobei jede Kavität 50 µl Probenlösung enthielt.

Für die Auftrennung der Proben wurden im Zuge der Methodenentwicklung und -validierung zwei Chromatographiesäulen des Typs „XBridge Peptide BEH C₁₈“ (Waters) genutzt. Beide Säulen hatten einen Innendurchmesser von 2,1 mm und unterschieden sich lediglich in ihrer Länge: 100 mm und 150 mm. Die enthaltenen Polymer-Partikel besaßen eine Größe von 3,5 µm und die Poren einen Durchmesser von 130 Å. Die Verbindung der Chromatographiesäule mit dem HPLC-System erfolgte über Edelstahlkapillaren mit einem

⁵² Kontrolliert den Gasdruck in der Kollisionszelle.

⁵³ Kontrolliert den Stickstoffstrom des Vorhangsgases („Curtain“, CUR) zwischen „Curtain Plate“ und „Orifice“.

⁵⁴ Kontrolliert die Ionisationsspannung („IonSpray Voltage“, IS) an der Sprühkapillare.

⁵⁵ Kontrolliert die Temperatur des Trockengases.

⁵⁶ Kontrolliert den Stickstoffstrom des Zerstäuber- oder Trägergases („IonSource“-Gas 1, G1).

⁵⁷ Kontrolliert den Stickstoffstrom des Trockengases („IonSource“-Gas 2, G2).

Innendurchmesser von 0,12 mm, während für die Kopplung des HPLC-Systems mit der Ionenquelle PEEK-Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,13 mm eingesetzt wurden.

Unter Nutzung verschiedener Gradienten erfolgte die Auftrennung der Proben in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch, dem als Ionenpaarbildner NH_4OH zugegeben wurde. Während des Analysenlaufs wurde der Anteil von Acetonitril (mobile Phase B, Kanal B1, ACN/ NH_4OH (1000/5; v/v)) kontinuierlich erhöht, während der Wasseranteil (mobile Phase A, Kanal A1, $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$ (1000/5; v/v)) sank. Das Waschen der Injektionsnadel vor jeder Injektion erfolgte mit einem Isopropanol/Wasser-Gemisch (Kanal B2 mit IPA/ H_2O (700/300; v/v)). Nach Abschluss der Analysen wurde das HPLC-System mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (Kanal A2 ACN/ H_2O (650/350; v/v)) mit neutralem pH-Wert gespült.

Die für den Betrieb der „Turbo V“-Ionenquelle genutzten Parameter sind in Tabelle 74 zusammengefasst. Darüber hinaus wurde der Wert für das CAD-Gas auf „Medium“ eingestellt.

Tabelle 74 – Quelleneinstellungen für LC-MS/MS

CUR	IS (V)	T (° C)	G1	G2	Position TIS-Sonde	
					Vertikal	Horizontal
25	5500	650	50	70	2	7

In Tabelle 67 sind die für die HPLC-ESI-MS/MS-Analysen verwendeten Lösungsmittel übersichtsweise aufgeführt.

8.2.6.3 Datenauswertung

Die Datenauswertung diente der Bestimmung der CAAP48-Konzentration in den analysierten humanen Blutplasmaproben. Dazu wurde mit Hilfe von Kalibranten eine Kalibrier- bzw. Regressionsfunktion erstellt. Durch den Einsatz von Qualitätskontrollen konnte die Güte der Analysen überprüft werden. Als Referenzmatrix wurde Blutplasma von Ratten (CD®-Stamm, Sprague Dawley, Charles River) verwendet. Voraussetzung für die Datenauswertung war die Einteilung der Proben entsprechend ihrer Herkunft und Analyt-Konzentration in eine von insgesamt fünf Kategorien (Doubleblank, Blank, Kalibrant, Qualitätskontrolle, Unbekannt).

Der erste Schritt der Datenauswertung bestand in der Erstellung einer Quantifizierungsmethode. In dieser wurden zunächst die MRM-Übergänge von Analyt und internem Standard eingetragen, bevor mit Hilfe eines Beispiel-Datensatzes die Retentionszeiten bestimmt und das Retentionszeitfenster eingestellt wurden. Darüber hinaus erfolgte anhand des Beispiel-Datensatzes die Festlegung weiterer Parameter, die für die Integration der Signalfächen der MRM-Übergänge mit Hilfe des Algorithmus „IntelliQuan“ (Sciex) notwendig waren (siehe Tabelle 75).

Tabelle 75 – Integrationsparameter der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48

Parameter	Wert
„Retention Time Window“	30 s
„Smoothing Width“	0-3 Punkte
„Baseline Subtraction Window“	2 min
„Noise Percentage“	50 %
„Peak-Splitting Factor“	0

Die auf diese Weise erstellte Quantifizierungsmethode konnte nun für die Auswertung von Messdaten genutzt werden. Zunächst erfolgte für jede Probe die Identifizierung der MRM-Signale von Analyt und internem Standard (bei jeweils beiden sowohl für den „Quantifier“ als auch den „Qualifier“ MRM-Übergang) sowie im Anschluss die Integration der Signalflächen. Für die Berechnung der „Area Ratio“ wurde dann der Wert für die Signalfläche des MRM-Übergangs des Analyten durch die Signalfläche des MRM-Übergangs des internen Standards dividiert. Für alle Kalibranten wurde dementsprechend jeweils ein Wert der „Area Ratio“ ermittelt. Das Auftragen der nominellen Konzentrationen des synthetischen Analyten in den einzelnen Kalibrierproben gegen die experimentell ermittelten Werte der „Area Ratio“ ermöglichte die Anpassung einer Kalibrierfunktion. Bei der Anpassung erfolgte eine Wichtung der Messdaten mit Hilfe des Faktors $1/x^2$. Der im Weiteren erfolgte Abgleich der für jede Probe bestimmten „Area Ratio“ mit der Kalibrierfunktion ermöglichte die Quantifizierung des jeweils enthaltenen synthetischen (z.B. Blank, Qualitätskontrolle) oder endogenen (Plasmaprobe) CAAP48. Für die Kalibranten und Qualitätskontrollen erfolgte darüber hinaus die Bestimmung der Abweichung der experimentell ermittelten von der nominellen (theoretisch zu Beginn der Probenvorbereitung eingesetzten) Konzentration des synthetischen Analyten in Prozent. Anhand der experimentell ermittelten Analyt-Konzentration sowie der entsprechenden Abweichung konnte die Güte jedes einzelnen Kalibranten und jeder einzelnen Qualitätskontrolle eingeschätzt werden.

8.2.7 Klinische Studie

8.2.7.1 Entnahme von Blutproben

Die Blutproben wurden vom ärztlichen Personal der PIT1 mit Hilfe einer 2,7 ml K₂-EDTA-Monovette (Sarstedt) über eine Venenverweilkanüle oder einen arteriellen bzw. zentralvenösen Zugang entnommen und dann entweder unmittelbar oder nach maximal 60 min Lagerung im Kühlschrank bei 8 °C für die Herstellung von Blutplasma genutzt.

Als Probennahmezeitpunkte wurden die Tage 1, 3 und 5 nach Studieneinschluss ausgewählt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass für jeden Patienten Informationen

über den Krankheitsverlauf und dessen Auswirkungen auf die Plasmakonzentration von CAAP48 verfügbar sind. Die Entnahme der Blutproben erfolgte während routinemäßiger Untersuchungen. Eine gesonderte Blutentnahme lediglich für die Probensammlung der vorliegenden Studie erfolgte nicht.

8.2.7.2 Herstellung und Lagerung von Plasmaproben

Die Herstellung des Blutplasmas erfolgte durch Zentrifugation der Monovette mit 2890 xg für 10 min bei 4 °C. Das Plasma wurde in Abhängigkeit vom Volumen, das je Probennahmezeitpunkt zur Verfügung stand, in Aliquots mit 50 µl, 100 µl und teilweise 250 µl aufgeteilt. Jedes Aliquot enthielt 5 µl einer Proteaseinhibitor-Lösung. Einige Aliquots wurden im Vorhinein mit 50 µl 5,0 M Guanidin-Hydrochlorid sowie 25 µl internem Standard (CAAP48-2xF(D₅)) versehen. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -20 °C. Die Einhaltung der Temperatur wurde während der Lagerung mit Hilfe von Temperaturloggern regelmäßig überprüft.

8.2.8 Statistische Berechnungen

Für die Ermittlung von statistischen Kennwerten wurden die in Tabelle 76 aufgeführten Formeln verwendet.

Tabelle 76 – Berechnung statistischer Kennwerte

Bezeichnung	Formel	Variablen
Mittelwert \bar{x}	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$	x _i ...ermittelte Messwerte n...Anzahl der Messwerte
Standardabweichung s	$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	x _i ...ermittelte Messwerte n...Anzahl der Messwerte \bar{x} ...Arithmetisches Mittel
Relative Standardabweichung v	$v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$	s...Standardabweichung \bar{x} ...Arithmetisches Mittel
Median \tilde{x}	$\tilde{x} = \begin{cases} x_{\frac{n+1}{2}} & \text{n ungerade} \\ \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right) & \text{n gerade} \end{cases}$	n...Anzahl der Messwerte

9 Verzeichnisse

9.1 Literaturverzeichnis

- 1 Singer et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In: *JAMA* 315 (8), S. 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- 2 Bone (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. In: *CHEST* 101 (6), S. 1644. DOI: 10.1378/chest.101.6.1644.
- 3 Levy et al. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: *Critical care medicine* 31 (4), S. 1250–1256. DOI: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.
- 4 Marx et al. (2017): Sepsis-3: Zweifel an der Überlegenheit der neuen Definition. Hg. v. Deutsches Ärzteblatt. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/archiv/192612/Sepsis-3-Zweifel-an-der-Ueberlegenheit-der-neuen-Definition>, zuletzt geprüft am 03.08.2018.
- 5 Schmoch et al. (2017): Neue SEPSIS-3-Definition. Müssen wir Sepsis in Zukunft behandeln, bevor wir sie diagnostizieren dürfen? In: *Der Anaesthesist* 66 (8), S. 614–621. DOI: 10.1007/s00101-017-0316-2.
- 6 Mayr et al. (2014): Epidemiology of severe sepsis. In: *Virulence* 5 (1), S. 4–11. DOI: 10.4161/viru.27372.
- 7 Martin (2012): Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. In: *Expert review of anti-infective therapy* 10 (6), S. 701–706. DOI: 10.1586/eri.12.50.
- 8 Brunkhorst et al. (2009): Diagnose und kausale Therapie der Sepsis. In: *Der Internist* 50 (7), S. 810–816. DOI: 10.1007/s00108-008-2287-5.
- 9 Kumar et al. (2006): Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. In: *Critical care medicine* 34 (6), S. 1589–1596. DOI: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.
- 10 Boomer et al. (2014): The changing immune system in sepsis. Is individualized immunomodulatory therapy the answer? In: *Virulence* 5 (1), S. 45–56. DOI: 10.4161/viru.26516.
- 11 Biron et al. (2015): Biomarkers for Sepsis. What Is and What Might Be? In: *Biomarker insights* 10 (Suppl 4), S. 7–17. DOI: 10.4137/BMI.S29519.
- 12 Hagel et al. (2011): Sepsis. In: Michael Buerke (Hg.): *Intensivmedizin und Notfallmedizin. German Interdisciplinary Journal of Intensive Care Medicine*, Bd. 48: Springer (Intensivmedizin und Notfallmedizin, 48), S. 57–73.
- 13 Iwashyna et al. (2010): Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. In: *JAMA* 304 (16), S. 1787–1794. DOI: 10.1001/jama.2010.1553.

- 14 Callahan et al. (2009): Sepsis-induced myopathy. In: *Critical care medicine* 37 (10 Suppl), S354-67. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181b6e439.
- 15 Fleischmann et al. (2016): Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. In: *Deutsches Aerzteblatt international* 113 (10), S. 159–166. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159.
- 16 Food and Drug Administration (US) (2018): BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD), Bethesda (MD).
- 17 Marshall et al. (2009): Biomarkers of sepsis. In: *Critical care medicine* 37 (7), S. 2290–2298. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181a02afc.
- 18 Pierrakos et al. (2010): Sepsis biomarkers: a review. In: *Critical care (London, England)* 14 (1), R15. DOI: 10.1186/cc8872.
- 19 Henriquez-Camacho et al. (2014): Biomarkers for sepsis. In: *BioMed research international* 2014, S. 547818. DOI: 10.1155/2014/547818.
- 20 Harbarth et al. (2001): Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 164 (3), S. 396–402. DOI: 10.1164/ajrccm.164.3.2009052.
- 21 Geven et al. (2018): Adrenomedullin and Adrenomedullin-Targeted Therapy As Treatment Strategies Relevant for Sepsis. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 292. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00292.
- 22 Kiehntopf et al. (2011): Mass spectrometry-based protein patterns in the diagnosis of sepsis/systemic inflammatory response syndrome. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 36 (6), S. 560–569. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318237ea7c.
- 23 Bergin et al. (2012): Alpha-1 antitrypsin. A potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 60 (2), S. 81–97. DOI: 10.1007/s00005-012-0162-5.
- 24 Lussier et al. (2016): Alpha-1 Antitrypsin. The Protein. In: Adam Wanner und Robert A. Sandhaus (Hg.): *Alpha-1 Antitrypsin*. Cham: Springer International Publishing (Respiratory Medicine), S. 17–30.
- 25 Brode et al. (2012): Alpha-1 antitrypsin deficiency. A commonly overlooked cause of lung disease. In: *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 184 (12), S. 1365–1371. DOI: 10.1503/cmaj.111749.
- 26 Law et al. (2006): An overview of the serpin superfamily. In: *Genome biology* 7 (5), S. 216. DOI: 10.1186/gb-2006-7-5-216.
- 27 Bottomley (2010): The folding pathway of alpha1-antitrypsin. Avoiding the unavoidable. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 7 (6), S. 404–407. DOI: 10.1513/pats.201004-031AW.
- 28 Krishnan et al. (2011): Dynamic local unfolding in the serpin α -1 antitrypsin provides a mechanism for loop insertion and polymerization. In: *Nature structural & molecular biology* 18 (2), S. 222–226. DOI: 10.1038/nsmb.1976.

- 29 Vissers et al. (1988): Cleavage and inactivation of alpha 1-antitrypsin by metalloproteinases released from neutrophils. In: *The Journal of clinical investigation* 82 (2), S. 706–711. DOI: 10.1172/JCI113651.
- 30 Rapala-Kozik et al. (1999): Comparative cleavage sites within the reactive-site loop of native and oxidized alpha1-proteinase inhibitor by selected bacterial proteinases. In: *Biological chemistry* 380 (10), S. 1211–1216. DOI: 10.1515/BC.1999.153.
- 31 Winyard et al. (1991): Proteolytic inactivation of human α 1 antitrypsin by human stromelysin. In: *FEBS Letters* 279 (1), S. 91–94. DOI: 10.1016/0014-5793(91)80258-5.
- 32 Blaurock-Möller et al. (2019): CAAP48, a New Sepsis Biomarker, Induces Hepatic Dysfunction in an in vitro Liver-on-Chip Model. In: *Front. Immunol.* 10, S. 801. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00273.
- 33 Blaurock et al. (2016): C-Terminal Alpha-1 Antitrypsin Peptide: A New Sepsis Biomarker with Immunomodulatory Function. In: *Mediators of Inflammation* 2016, S. 6129437. DOI: 10.1155/2016/6129437.
- 34 Auton et al. (2015): A global reference for human genetic variation. In: *Nature* 526 (7571), S. 68–74. DOI: 10.1038/nature15393.
- 35 Fujimoto et al. (2010): Polymorphism of SERPINE2 gene is associated with pulmonary emphysema in consecutive autopsy cases. In: *BMC medical genetics* 11, S. 159. DOI: 10.1186/1471-2350-11-159.
- 36 Bian et al. (2014): An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. In: *Journal of proteomics* 96, S. 253–262. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.11.014.
- 37 Bruker Daltonik GmbH (Hg.) (2004): MALDI Theory. Mass Spectrometry.
- 38 Senko et al. (1994): Mass spectrometry of macromolecules. Has its time now come? In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 23, S. 763–785. DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.003555.
- 39 Gross, Jürgen H. (2010): Mass spectrometry. A textbook. 2nd ed. Berlin, London: Springer.
- 40 Cotter (1992): Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. In: *Anal. Chem.* 64 (21), 1027A–1039A. DOI: 10.1021/ac00045a002.
- 41 Fitzgerald et al. (1995): Mass spectrometry of nucleic acids. The promise of matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry. In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 24, S. 117–140. DOI: 10.1146/annurev.bb.24.060195.001001.
- 42 Bruker Daltonik GmbH (Hg.) (2006): Ultraflex III. User Manual.
- 43 Suckau et al. (2003): A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* (376), S. 952–965. Online verfügbar unter 10.1007/s00216-003-2057-0.

- 44 Schlosser et al. (2005): MALDI-TOF mass spectrometry of a combinatorial peptide library. Effect of matrix composition on signal suppression. In: *Journal of mass spectrometry : JMS* 40 (12), S. 1590–1594. DOI: 10.1002/jms.937.
- 45 Krause et al. (1999): The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins. In: *Anal. Chem.* 71 (19), S. 4160–4165. DOI: 10.1021/ac990298f.
- 46 Baker et al. (2013): Guanidination of tryptic peptides without desalting for matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry analysis. In: *Anal. Chem.* 85 (18), S. 8873–8880. DOI: 10.1021/ac402246r.
- 47 Duncan et al. (2008): Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. In: *Brief Funct Genomic Proteomic* 7 (5), S. 355–370. DOI: 10.1093/bfgp/eln041.
- 48 Szajli et al. (2008): Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS. In: *Mol Cell Proteomics* 7 (12), S. 2410–2418. DOI: 10.1074/mcp.M800108-MCP200.
- 49 Bradshaw, Timothy P. (2006): Introduction to Peptide and Protein HPLC. A User's Guide. 1. Aufl. Torrance.
- 50 Panuwet et al. (2016): Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods. Advancing Biomonitoring. In: *Critical reviews in analytical chemistry* 46 (2), S. 93–105. DOI: 10.1080/10408347.2014.980775.
- 51 Kebarle et al. (2008): From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. In: *Anal. Chem.* 65 (22), 972A–986A. DOI: 10.1021/ac00070a001.
- 52 Budzikiewicz, Herbert (1992): Massenspektrometrie. Eine Einführung. Weinheim (Germany): VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- 53 AB SCIEX (Hg.) (2010): 4000 QTRAP® System. Hardware Guide. Ontario (Canada).
- 54 Kromidas, Stavros (2017): Das HPLC-MS-Buch für Anwender. 1. Aufl. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- 55 Cutillas, Pedro R.; Timms, John F. (2010): LC-MS/MS in Proteomics. Totowa, NJ: Humana Press (658).
- 56 Food and Drug Administration (US) (2013): Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry. Rockville (MD).
- 57 European Medicines Agency (EU) (2011): Guideline on bioanalytical method validation. London (GB).
- 58 Kyte et al. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. In: *Journal of molecular biology* 157 (1), S. 105–132. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- 59 Gasteiger et al. (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M. Walker (Hg.): The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press Inc (Methods in molecular biology), S. 571–607.

- 60 Nair, Hari; Clarke, William (Hg.) (2017): Mass spectrometry for the clinical laboratory. Amsterdam, Boston: Elsevier Ltd. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128008713>.
- 61 England et al. (2011): Role of solvation effects in protein denaturation. From thermodynamics to single molecules and back. In: *Annual review of physical chemistry* 62, S. 257–277. DOI: 10.1146/annurev-physchem-032210-103531.
- 62 Waters (Hg.) (2014): Sample Preparation. Milford (U.S.A.).
- 63 Lame et al. (2010): A Flexible SPE/LC/MS/MS Platform for the Simultaneous Quantitation of Multiple Amyloid Peptides in Cerebrospinal Fluid. Application Note, zuletzt geprüft am 08.10.2015.
- 64 Lame et al. (2011): Quantitation of amyloid beta peptides A β (1-38), A β (1-40), and A β (1-42) in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Analytical Biochemistry* 419 (2), S. 133–139. DOI: 10.1016/j.ab.2011.08.010.
- 65 Waters (Hg.) (2015): Peptide and Protein Bioanalysis. Milford (U.S.A.) (Application Notebook), zuletzt geprüft am 08.10.2015.
- 66 Nič, Miloslav; Jirát, Jiří; Košata, Bedřich; Jenkins, Aubrey; McNaught, Alan (Hg.) (2009): IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. Research Triangle Park, NC: IUPAC.
- 67 den Boef et al. (1983): Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry. In: *Pure and Applied Chemistry* 55 (3), S. 553–556. DOI: 10.1351/pac198855030553.
- 68 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- 69 Tang et al. (1993): Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. In: *Anal. Chem.* 65 (24), S. 3654–3668. DOI: 10.1021/ac00072a020.
- 70 Matuszewski et al. (2003): Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. In: *Anal. Chem.* 75 (13), S. 3019–3030. DOI: 10.1021/ac020361s.
- 71 Zhou et al. (2017): Matrix effects and application of matrix effect factor. In: *Bioanalysis* 9 (23), S. 1839–1844. DOI: 10.4155/bio-2017-0214.
- 72 Huang et al. (2012): Matrix effect and recovery terminology issues in regulated drug bioanalysis. In: *Bioanalysis* 4 (3), S. 271–279. DOI: 10.4155/bio.11.315.
- 73 Reinhart, Konrad; Brunkhorst, Frank Martin (2010): Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. 1. Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin. Stuttgart: Thieme.

-
- 74 Teasdale et al. (1974): Assessment of Coma and Impaired Consciousness. A Practical Scale. In: *The Lancet* 304 (7872), S. 81–84. DOI: 10.1016/S0140-6736(74)91639-0.
- 75 Fani-Salek et al. (1999): Trauma scoring systems explained. In: *Emerg Med Australas* 11 (3), S. 155–166. DOI: 10.1046/j.1442-2026.1999.00039.x.
- 76 Vincent et al. (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. In: *Intensive care medicine* 22 (7), S. 707–710.
- 77 Bicking (2006): Integration Errors in Chromatographic Analysis, Part I: Peaks of Approximately Equal Size. Hg. v. LCGC North America. Online verfügbar unter <http://www.chromatographyonline.com/integration-errors-chromatographic-analysis-part-i-peaks-approximately-equal-size>, zuletzt geprüft am 19.02.2019.
- 78 Anderson et al. (2012): Precision of heavy-light peptide ratios measured by MALDI-TOF mass spectrometry. In: *Journal of proteome research* 11 (3), S. 1868–1878. DOI: 10.1021/pr201092v.
- 79 Roepstorff et al. (1984): Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. In: *Biomedical mass spectrometry* 11 (11), S. 601. DOI: 10.1002/bms.1200111109.
- 80 Garland et al. (2013): Epidemiology of critically ill patients in intensive care units. A population-based observational study. In: *Critical care (London, England)* 17 (5), R212. DOI: 10.1186/cc13026.
- 81 Wetzel (2011): CHNS-Analyse / O-Analyse. Potsdam.
- 82 Fujine (2008): FlashEA 1112 Elemental Analyzer (CHNS): User Guide. Hg. v. International Ocean Discovery Program.
- 83 Bruker Daltonik GmbH (Hg.) (2011): flexAnalysis 3.4 User Manual. Bremen.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>Arbitrary Units</i>
AU	<i>Absorption Units</i>
ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
ACN	Acetonitril
AMG	Arzneimittelgesetz
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
AAT	Alpha-1-Antitrypsin
BE	Basenüberschuss
BL	Blank
BMC	Bundesverband Managed Care e.V.
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CAD	<i>Collisionally Activated Dissociation</i>
CAL	Kalibrant
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CE	<i>Collision Energy</i>
CPS	<i>Counts Per Second</i>
CRP	C-reaktives Protein
CUR	<i>Curtain-Gas</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
DAMP	<i>Damage-associated Molecular Pattern</i>
DBL	Doubleblank
dbSNP	<i>„Single Nucleotide Polymorphism Database“</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DP	<i>Declustering Potential</i>
EIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
F(D ₅)	Phenyl-D ₅
FA	Ameisensäure
FDA	<i>Federal Drug and Food Administration</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
G1	<i>IonSource-Gas 1</i>
G2	<i>IonSource-Gas 2</i>

GC	Gaschromatographie
GdmCl	Guanidinhydrochlorid
GRAVY	<i>Grand Average of Hydropathy</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HQC	<i>High-concentrated QC</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IPA	Isopropanol
IQ	<i>Interquad Lenses</i>
IS	<i>IonSpray Voltage</i>
ISD	<i>In-source Decay</i>
ITS	Intensivstation
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LIT	<i>Linear Ion Trap</i>
LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification</i>
LM	Lösungsmittel
LOD	<i>Lower Limit of Detection</i>
LQC	<i>Low-concentrated QC</i>
M	Molar
M _{Avg}	<i>Average Mass</i>
M _{Mono}	<i>Monoisotopic Mass</i>
[M+H] ⁺	Einfach protoniertes Molekül-Ion
[M+nH] ⁿ⁺	n-fach protoniertes Molekül-Ion
MAF	<i>Minor Allel Frequency</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MeOH	Methanol
MPG	Medizinproduktegesetz
MQC	<i>Medium-concentrated QC</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
N	Anzahl
N. b.	Nicht bestimmt
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PCT	Procalcitonin
PEEK	Polyetheretherketon

Verzeichnisse

pI	Isoelektrischer Punkt
PI	<i>Product Ion</i>
PSD	<i>Post-source Decay</i>
Q0-3	Quadrupol 0-3 im Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer
QC	Qualitätskontrolle
R ²	Bestimmtheitsmaß
RP	<i>Reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SNAP	<i>Sophisticated Numerical Annotation Procedure</i>
SOFA	<i>Sepsis-related Organ Failure Assessment Score</i>
SPE	<i>Solid-phase Extraction</i>
SPPS	<i>Solid-phase Peptide Synthesis</i>
ST	<i>Stubbies</i>
T	Temperatur
tBu	<i>tert</i> -Butylether
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>Time-of-flight</i>
TOPMed	<i>Trans-Omics for Precision Medicine</i>
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
ULOQ	<i>Upper Limit of Quantification</i>
Wt	Wildtyp
z	Ladungszustand

Zahlen mit Dezimalstellen sind durch ein Komma getrennt. Die für die Aminosäuresequenzen verwendeten Abkürzungen entsprechen den Empfehlungen der „*International Union of Pure and Applied Chemistry*“ (IUPAC) und der „*International Union of Biochemistry*“ (IUB).

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modellhafte Darstellung des Krankheitsverlaufs der Sepsis sowie der beteiligten immunologischen Prozesse (verändert nach [10]).	4
Abbildung 2: Struktur von Alpha-1-Antitrypsin und CAAP48 (blau) vor und nach proteolytischer Spaltung im aktiven Zentrum (Met358).	10
Abbildung 3: Modellhafte Darstellung der positiven Rückkopplung zwischen der Spaltung von Alpha-1-Antitrypsin und der Bildung von CAAP48.	12
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (verändert nach [37]).	16
Abbildung 5: Modellhafte Darstellung der Elektrospray-Ionisation im positiven Ionenmodus (verändert nach [50]).	25
Abbildung 6: Grundsätzlicher Aufbau eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers (verändert nach [53]).	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung der MRM-Analyse eines Vorläufer-Ions.	29
Abbildung 8: Physikochemische Eigenschaften der Aminosäurereste von CAAP48. Die Bezeichnung der Aminosäuren orientiert sich an ihrer Position innerhalb der Sequenz von Alpha-1-Antitrypsin.	36
Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer SPE-Kartusche und allgemeiner Ablauf einer Festphasenextraktion.	40
Abbildung 10: Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen von humanem Alpha-1-Antitrypsin und des homologen Proteins der Ratte.	45
Abbildung 11: MALDI-TOF-Massenspektrum von CAAP48 _{syn} („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).	62
Abbildung 12: MALDI-TOF-Massenspektrum von CAAP48-2xF(D ₅) („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).	63
Abbildung 13: MALDI-TOF-Massenspektrum von CAAP48-3xV („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).	64
Abbildung 14: MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung mit jeweils 333 ng/μl der Standardpeptide CAAP48 _{syn} , CAAP48-2xF(D ₅) und CAAP48-3xV („Dried-droplet“-Präparation mit DHB-Matrix, Reflektormodus, positive Polarität).	66
Abbildung 15: RP-HPLC-UV-Chromatogramme (aufgenommen bei 220 nm) von CAAP48, CAAP48-2xF(D ₅) und CAAP48-3xV (jeweils 400 ng/μl). Die Grenzen der Integrationsbereiche sind rot dargestellt.	69
Abbildung 16: HPLC-UV-Chromatogramme von CAAP48-3xV (400 ng/μl) aufgenommen bei 220 nm an drei verschiedenen Analysentagen. Die Grenzen der Integrationsbereiche sind rot dargestellt.	71
Abbildung 17: Nachweis der Verdünnungslinearität mit Hilfe einer linearen Regressionsfunktion.	73

Verzeichnisse

Abbildung 18: Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen in den Stocklösungen anhand des Anstiegs der Regressionsfunktionen.	75
Abbildung 19: MALDI-TOF-Massenspektren der mit Hilfe von „Oasis® WCX“ aufgearbeiteten Proben.	77
Abbildung 20: MALDI-TOF-Massenspektren der mit Hilfe von „Oasis® MCX“ aufgearbeiteten Proben.	78
Abbildung 21: Regressionsanalyse der in einem Lösungsmittelgemisch bestimmten Signalintensitätsverhältnisse für Analyt und internen Standard.	83
Abbildung 22: Regressionsanalyse der in einem Lösungsmittelgemisch nach Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion bestimmten Signalintensitätsverhältnisse für Analyt und internen Standard.	86
Abbildung 23: Regressionsanalyse der in Blutplasma nach Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion bestimmten Signalintensitätsverhältnisse für Analyt und internen Standard.....	89
Abbildung 24: Q1-Scan von CAAP48 _{syn} im Massenbereich von m/z 500-2000.	92
Abbildung 25: Q1-Scan von CAAP48-3xV im Massenbereich von m/z 500-2000.....	93
Abbildung 26: Produkt-Ionen-Scan des vierfach geladenen Molekül-Ions von CAAP48 _{syn} (m/z 1198,9) im Massenbereich von m/z 50-2000.	94
Abbildung 27: Produkt-Ionen-Scan des vierfach geladenen Molekül-Ions von CAAP48-3xV (m/z 1188,4) im Massenbereich von m/z 50-2000.	95
Abbildung 28: MS ³ -Spektrum des Fragment-Ions m/z 1456,1 ($z = 3$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48 _{syn}	97
Abbildung 29: Massenbereich m/z 400-1400 des MS ³ -Spektrum des Fragment-Ions m/z 1313,2 ($z = 3$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48 _{syn}	97
Abbildung 30: Massenbereich m/z 1400-2000 des MS ³ -Spektrum des Fragment-Ions m/z 1313,2 ($z = 3$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48 _{syn}	98
Abbildung 31: MS ³ -Spektrum des Fragment-Ions m/z 1092,7 ($z = 4$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48 _{syn}	98
Abbildung 32: MS ³ -Spektrum des Fragment-Ions m/z 314,5 ($z = 1$), erzeugt aus dem Vorläufer-Ion m/z 1198,9 ($z = 4$) von CAAP48 _{syn}	99
Abbildung 33: „Extracted Ion Chromatogram“ für CAAP48 _{syn} (5,0 ng/μl).....	102
Abbildung 34: „Extracted Ion Chromatogram“ für CAAP48-3xV (5,0 ng/μl).	103
Abbildung 35: „Extracted Ion Chromatogram“ für eine mit Hilfe von Gradient 2 aufgetrennte Mischung von CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl).	105
Abbildung 36: „Extracted Ion Chromatogram“ für eine mit Hilfe von Gradient 3 aufgetrennte Mischung von CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl).	106

Abbildung 37: „ <i>Extracted Ion Chromatogram</i> “ für eine mit Hilfe von Gradient 4 aufgetrennte Mischung von CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl).	106
Abbildung 38: „ <i>Extracted Ion Chromatogram</i> “ für eine mit Hilfe von Gradient 5 aufgetrennte Mischung von CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl).	106
Abbildung 39: „ <i>Extracted Ion Chromatogram</i> “ für eine mit Hilfe von Gradient 6 aufgetrennte Mischung von CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl).	107
Abbildung 40: „ <i>Extracted Ion Chromatogram</i> “ aufgenommen nach Injektion von 5 μl einer Mischung bestehend aus CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl) gelöst in einem Lösungsmittelgemischen mit 25 % Acetonitril.	108
Abbildung 41: „ <i>Extracted Ion Chromatogram</i> “ aufgenommen nach Injektion von 5 μl einer Mischung bestehend aus CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl) gelöst in einem Lösungsmittelgemischen mit 50 % Acetonitril.	109
Abbildung 42: „ <i>Extracted Ion Chromatogram</i> “ aufgenommen nach Injektion von 5 μl einer Mischung bestehend aus CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV (jeweils 10 ng/μl) gelöst in einem Lösungsmittelgemischen mit 75 % Acetonitril.	109
Abbildung 43: Schematische Darstellung des Vorgehens zur Bestimmung von Matrixeffekt und Extraktionseffizienz.	120
Abbildung 44: Einzelwertdiagramm der für CAAP47/CAAP48 in humanen Blutplasma-proben ermittelten Konzentrationen geordnet nach Patientengruppen und Quantifizierungsmethode (horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte). .	146
Abbildung 45: Einzelwertdiagramm der für CAAP47/CAAP48 in humanen Blutplasma-proben ermittelten Konzentrationen geordnet nach Sepsisstadium und Quantifizierungsmethode (horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte). .	147
Abbildung 46: Einzelwertdiagramm der SOFA-Werte sowie der für CAAP47/CAAP48 und Procalcitonin ermittelten Konzentrationen geordnet nach Patienten-gruppen (horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte bzw. für PCT-Konzentrationen von Patienten mit septischen Schock den Median, gepunktete Linien verweisen auf PCT-Schwellenwerte).....	149
Abbildung 47: Arbeitsschritte der Quantifizierung von CAP47/CAAP48 in humanen Blutplasmaproben mittels MALDI-TOF- und HPLC-ESI-MS/MS-Analysen.....	152

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Biomarker für Sepsis	7
Tabelle 2 – Einfluss von Punktmutationen auf die Aminosäuresequenz von CAAP48	13
Tabelle 3 – Aminosäuresequenzen von CAAP47 und CAAP48	14
Tabelle 4 – Übersicht über die verwendeten synthetischen Peptide	34
Tabelle 5 – Auswahl einer stationären Phase	42
Tabelle 6 – Probentypen	48
Tabelle 7 – Relevanz der Stabilitätsarten für die verschiedenen Probenarten	54
Tabelle 8 – Einschluss- und Ausschlusskriterien	56
Tabelle 9 – Diagnosekriterien für SIRS- und Sepsispatienten	57
Tabelle 10 – Elementaranalyse von CAAP48 _{syn}	60
Tabelle 11 – Elementaranalyse von CAAP48-2xF(D ₅)	61
Tabelle 12 – Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Standardpeptide	65
Tabelle 13 – Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen	67
Tabelle 14 – Analyse der Reinheit der Standardpeptide	70
Tabelle 15 – Signalflächen zur Bestimmung der Verdünnungslinearität	72
Tabelle 16 – Signalintensitäten zur Kreuzvalidierung der Standard-Konzentrationen	74
Tabelle 17 – Massensignale für CAAP48-2xF(D ₅)	79
Tabelle 18 – Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS	81
Tabelle 19 – Signalintensitätsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch	82
Tabelle 20 – Richtigkeit der experimentell bestimmten Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch	84
Tabelle 21 – Signalintensitätsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch nach Festphasenextraktion	85
Tabelle 22 – Richtigkeit der experimentell bestimmten Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS in Lösungsmittelgemisch nach Festphasenextraktion	87
Tabelle 23 – Signalintensitätsverhältnisse Analyt/IS in Blutplasma nach Festphasenextraktion	88
Tabelle 24 – Richtigkeit der experimentell bestimmten Konzentrationsverhältnisse Analyt/IS in Blutplasma nach Festphasenextraktion	90
Tabelle 25 – Massen und Ladungszustände von CAAP48 _{syn}	92
Tabelle 26 – Massen und Ladungszustände von CAAP48-3xV	93
Tabelle 27 – Optimierung von Geräteparametern der Vorläufer-Ionen	94
Tabelle 28 – Produkt-Ionen für CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV	95
Tabelle 29 – Optimierte MRM-Übergänge für CAAP48 _{syn} und CAAP48-3xV	100
Tabelle 30 – Vorläufige MRM-Methode	101
Tabelle 31 – HPLC-Gradient zur Analyse der analytischen Interferenz	101
Tabelle 32 – Analytische Interferenz für CAAP48	102
Tabelle 33 – Analytische Interferenz für CAAP48-3xV	103











Tabelle 34 – Optimierung des HPLC-Gradienten	105
Tabelle 35 – Retentionszeitdifferenzen für Analyt und internen Standard.....	107
Tabelle 36 – Signalfächen ³⁵ für Analyt und internen Standard.....	108
Tabelle 37 – Intensität der MRM-Übergänge für CAAP48 _{endo} in Blutplasmen	110
Tabelle 38 – Intensität der MRM-Übergänge für CAAP48-3xV in Blutplasmen.....	111
Tabelle 39 – Finale MRM-Methode	112
Tabelle 40 – Interferenzen für Analyt und internen Standard in Rattenplasma	113
Tabelle 41 – Bestimmung von Richtigkeit und Präzision	114
Tabelle 42 – Linearität der Kalibrierungen.....	115
Tabelle 43 – Kalibrierfunktionen und Linearität	116
Tabelle 44 – Bestimmung des „ <i>Lower Limit of Quantification</i> “ (LLOQ).....	117
Tabelle 45 – Verschleppung Analyt.....	118
Tabelle 46 – Verschleppung interner Standard	119
Tabelle 47 – Kalibrierungen und Matrixeffekt	121
Tabelle 48 – Kalibrierfunktionen und Matrixeffekt	122
Tabelle 49 – Qualitätskontrollen und Extraktionseffizienz	123
Tabelle 50 – Veränderung der „ <i>Area Ratio</i> “ über 24 h.....	125
Tabelle 51 – Grundlegende klinische Parameter der Studienpatienten.....	126
Tabelle 52 – Klinische Parameter zur Einteilung der Studienpatienten	127
Tabelle 53 – Klinische Parameter zur Bestimmung des SOFA	130
Tabelle 54 – Konzentration von Procalcitonin im Serum der Studienpatienten	132
Tabelle 55 – Quantifizierung von CAAP47/CAAP48 mittels MALDI-TOF	134
Tabelle 56 – Quantifizierungsergebnisse für CAAP47/CAAP48	136
Tabelle 57 – Richtigkeit der Kalibranten der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48	137
Tabelle 58 – Richtigkeit der Qualitätskontrollen der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48	138
Tabelle 59 – Quantifizierung von CAAP48 mittels HPLC-ESI-MS/MS.....	139
Tabelle 60 – Vergleich der MALDI-TOF- und HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierungsmethoden	142
Tabelle 61 – Vergleich der Quantifizierungsergebnisse für CAAP47/CAAP48.....	145
Tabelle 62 – Klinische Parameter und SOFA-Werte der Studienpatienten	148
Tabelle 63 – Übersicht der Laborkleingeräte	155
Tabelle 64 – Lösungsmittel für die HPLC-UV-Analysen.....	155
Tabelle 65 – Chemikalien und Lösungsmittel für die Festphasenextraktion.....	156
Tabelle 66 – Chemikalien und Lösungsmittel für die MALDI-TOF-Analysen.....	156
Tabelle 67 – Lösungsmittel für die HPLC-ESI-MS/MS-Analysen	156
Tabelle 68 – Chemikalien für die Blutplasmaproben.....	157
Tabelle 69 – Gradient der analytischen HPLC-Läufe	158

Verzeichnisse

Tabelle 70 – Integrationsparameter	159
Tabelle 71 – Festphasenextraktion mit WCX-Material	160
Tabelle 72 – Festphasenextraktion mit MCX-Material	161
Tabelle 73 – Quelleneinstellungen für Infusion	164
Tabelle 74 – Quelleneinstellungen für LC-MS/MS	165
Tabelle 75 – Integrationsparameter der HPLC-ESI-MS/MS-basierten Quantifizierung von CAAP48	166
Tabelle 76 – Berechnung statistischer Kennwerte.....	167

9.5 Verzeichnis der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS

Gefahrstoffe nach GHS

Bezeichnung	Gefahrensymbol	H- und P-Sätze
Acetonitril		H225, H302+H312+H332, P210, P280, P305+P351+P338
Ameisensäure		H226, H290, H314, P210, P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P310
Ammoniumhydroxid		H302, H314, H335, H400, P273, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338, P391
2,5-Dihydroxybenzoesäure		H302, H315; H319, H335
Guanidinhydrochlorid		H302+332, H315, H319, P261, P280, P301+312, P304+312+340, P305+338+351, P313+337, P330
Isopropanol		H225, H319, H336, P210, P261, P305+P351+P338
Methanol		H225, H301+H311+H331, H370, P210, P233, P280, P302+P352, P304+P340, P308+P310, P403+P235
Phosphorsäure		H290, H314, P280, P305+P351+P338, P310
Trifluoressigsäure		H314, H332, H412, P273, P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P310
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin		H314, P280, P305+351+338, P310

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Publikationsliste

Artikel in Peer-Review-Journalen

1. Antonyan, Alvard; Schlenzig, Dagmar; Schilling, Stephan; Naumann, Marcel; Sharoyan, Svetlana; Mardanyan, Sona; Demuth, Hans-Ulrich (2017): Concerted action of dipeptidyl peptidase IV and glutaminy cyclase results in formation of pyroglutamate-modified amyloid peptides in vitro. In: *Neurochemistry international* 113, S. 112–119. DOI: 10.1016/j.neuint.2017.12.001.
2. Schneider, Tobias; Hahn-Löbmann, Simone; Stephan, Anett; Schulz, Steve; Giritch, Anatoli; Naumann, Marcel; Kleinschmidt, Martin; Tusé, Daniel; Gleba, Yuri (2018): Plant-made Salmonella bacteriocins salmocins for control of Salmonella pathovars. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 4078. DOI: 10.1038/s41598-018-22465-9.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Ich danke Frau Prof. Dr. Zoya Ignatova von der Universität Hamburg für ihre Bereitschaft, die Betreuung der vorliegenden Arbeit zu übernehmen sowie für die jahrelange Unterstützung für wertvolle Hinweise und interessante Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth danke ich für die Möglichkeit, in seiner Projektgruppe das Dissertationsvorhaben bearbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Mirko Buchholz für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die kontinuierliche Betreuung und umfassende Unterstützung sowie die Korrektur des Manuskripts.

Herrn PD Dr. Martin Sauer von der Universitätsmedizin Rostock danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der klinischen Studie sowie für zahlreiche Ratschläge und interessante Diskussionen.

Mein Dank gilt insbesondere Dr. Martin Kleinschmidt, Dr. Fred Rosche, Diane Meitzner und Sarah Vogt für das gute Arbeitsklima sowie für zahlreiche Ratschläge und konstruktive Diskussionen. Diane Meitzner danke ich darüber hinaus für ihre uneingeschränkte Hilfe und Unterstützung im Labor sowie bei der Entwicklung der LC-MS/MS-Methode.

Dr. Daniel Ramsbeck, Christina Schnittka und Marvin Hempel danke ich für die Bereitstellung der Standardpeptide.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Projektgruppe für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung (MWT) des Fraunhofer-Instituts für Zelltherapie und Immunologie (IZI) für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Freundin Philine, für ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und kontinuierliche Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Halle (Saale), 02.04.2019