

**Isolierung und Charakterisierung von Transferrin-Glykoformen aus Blutproben  
von Seehunden mittels multidimensionaler chromatographischer Verfahren  
und molekül- und elementspezifischer massenspektrometrischer Detektion**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
des Fachbereichs Chemie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Dipl.-Biochemikerin  
**Mechthild Grebe**

Geesthacht, Juni 2011



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2007 bis März 2011 am Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Zentrum für Material- und Küstenforschung in der Abteilung Marine Bioanalytische Chemie angefertigt.

**Gutachter:**

Prof. Dr. Jose A. C. Broekaert

Universität Hamburg, Anorganische und Angewandte Chemie

Prof. Dr. Andreas Prange

Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Marine Bioanalytische Chemie



**Tag der Disputaion: 28.10.2011**

**Begutachter der Disputation:**

Prof. Dr. Jose A.C. Broekaert, Universität Hamburg

Prof. Dr. Bernd Meyer, Universität Hamburg

P.D. Dr. Michael Steiger, Universität Hamburg

Prof. Dr. Andreas Prange, Helmholtz-Zentrum Geesthacht



## Kurzzusammenfassung

Zur Bewertung des Ökosystems Wattenmeer wird der Seehund (*Phoca vitulina*) als biologischer Indikator eingesetzt. Unter anderem wird der Gesundheitszustand einzelner Tiere untersucht, wozu verschiedene diagnostische Parameter benötigt werden.

Das Plasmaprotein Transferrin (Tf) ist das wichtigste Transportprotein für das essentielle Spurenelement Eisen und zählt zur Gruppe der diagnostisch relevanten Akut-Phase-Proteine. Die Zwei-Domänen-Struktur von Tf ist zwischen den verschiedenen Säugetierspezies konserviert. Pro Tf-Molekül werden zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen gebunden, welche als natürliche Elementmarkierung zur Quantifizierung von Tf mittels elementspezifischer massenspektrometrischer Verfahren, wie z.B. induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS) herangezogen werden.

Für Seehund-Tf existieren bisher keine Quantifizierungsmöglichkeiten. Antikörper für eine Quantifizierung über antikörperbasierende ELISA-Methoden sind nur für einzelne ausgewählte Tierarten verfügbar. Die Konzentrationsbestimmung von Tf über das gebundene Eisen ist jedoch unabhängig von den einzelnen Tierspezies durchführbar.

Um das Seehund-Tf näher zu charakterisieren und seine Eignung als Indikatorprotein zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Isolierung von Tf aus Seehund-Blutproben entwickelt. Mit molekülspezifischen Methoden wie der 2D-Gelelektrophorese, MALDI-MS, ESI-MS und ESI-MS/MS wurde das Seehund-Tf charakterisiert und über Interspezies-Vergleiche eindeutig identifiziert. Abschließend wurde eine HPLC-basierte Methode zur Auftrennung der einzelnen Seehund-Tf-Glykoformen entwickelt, deren Konzentration erstmalig über ihren Eisengehalt mittels ICP-MS quantifiziert wurde.

Das Seehund-Tf ist homolog zu Transferrinen anderer Säugetierspezies. Es ist ein Glykoprotein mit bis zu neun verschiedenen Glykoformen, die sich durch ihren Anteil an Sialinsäuren unterscheiden, welche für das Retentionsverhalten auf der Anionenaustauschersäule verantwortlich sind. Die experimentell ermittelte Masse der dominanten Glykoform beträgt 81,136 kDa.

Die Quantifizierung von Seehund-Tf erfolgte mittels zweier unabhängiger präziser ICP-MS-basierter Methoden. Zum einen wurde durch den Einsatz einer zweiten HPLC-Pumpe eine Gradientenkompensation erzielt und die Kalibrierung mittels Flussinjektion vorgenommen. Der zweite Ansatz zur Quantifizierung von Seehund-Tf erfolgte über die Isotopenverdünnungs-ICP-MS.

Zum ersten Mal wurden Referenzbereiche (5 - 95 % Perzentil) für die Tf-Konzentrationen als Summe der einzelnen Tf-Glykoformen von wildlebenden Seehunden aus der deutschen Nordsee experimentell bestimmt. Der Referenzbereich für Tf weiblicher Seehunde liegt mit 1,93 - 2,74 g/L leicht höher als für die Männchen mit 1,42 - 2,35 g/L. Neben der Bestimmung der Tf-Konzentration können möglicherweise Unterschiede im Tf-Glykoformen-Muster als

potentieller Biomarker genutzt werden. Das chromatographische Muster der Tf-Glykoformen kann in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Das Muster mit der dominanten Glykoform unterscheidet sich von dem mit vermehrt gering-sialinierten Glykoformen dem *carbohydrate deficient transferrin*. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche ICP-MS-Methoden zur akkuraten und präzisen Quantifizierung von Tf-Glykoformen entwickelt, die Langzeit-Gesundheitsbeobachtungen von Seehunden ermöglichen.



## Abstract

Harbour seals (*Phoca vitulina*) were used as bio-indicators for the assessment of the North Sea ecosystem. Amongst others the individual health status of the seals is determined by different parameters.

The plasma protein Transferrin (Tf) is important for the transport of the essential trace element iron in the blood of all mammals and it belongs to the group of diagnostically relevant acute phase proteins. Tf consists of two similar domains, whose structure is conserved between the different mammalian species. Two Fe<sup>3+</sup> ions were bound per one Tf molecule. The iron was used as natural element tag for the quantification of Tf, via element specific mass spectrometry such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

Until now, the quantification of seal Tf is not possible, Antibodies using for antibody based methods are only available for selected animal species. However, the determination of the Tf concentration via the bound iron is independent of the animal species.

A HPLC-ICP-MS approach has been developed which allows the highly resolved separation and fractionation of up to nine different Tf glycoforms, as well as their sensitive and specific detection on the basis of their characteristic iron content. Molecule-specific detection techniques such as 2D gel electrophoresis, MALDI-MS, ESI-MS and ESI-MS/MS were used as complementary techniques to unambiguously identify the isolated proteins as Tf via cross species protein identification and to further characterise the protein.

The different Tf glycoforms vary in their sialic acid content, which is responsible for the elution behaviour of the glycoforms during their ion exchange separation. Seal Tf is homolog to Tf of other mammalian species, the determined molecular mass of the dominant seal Tf glycoform is 81.136 kDa.

Two independent HPLC-ICP-MS approaches were developed for the sensitive and specific absolute quantification on the basis of the characteristic iron content of Tf. One method is based on the application of a reversed gradient sheath flow to compensate gradient related effects during the iron specific detection and a flow injection calibration. The second developed method based on isotope dilution analysis, which has been applied for the quantification of the separated Tf glycoforms.

For the first time it was possible to quantify a baseline reference range (5 - 95 % percentile) of serum Tf for male (1,42 - 2,35 g L<sup>-1</sup>) and female German North Sea seals (1,93 - 2,74 g L<sup>-1</sup>). Beside the Tf concentration differences in the Tf glycoform pattern can be useful as potential biomarker. The chromatographic pattern can be separated in two groups, one with the dominant glycoform and several low abundant glycoforms and the other pattern with elevated levels of the low sialinated glycoforms, the carbohydrate deficient Tf (CDT).

In this study two accurate protein quantification methods were developed, which are urgently needed in particular when aiming on comparable long term investigations of the health status of marine mammals such as harbour seals.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>2. Stand der Wissenschaft</b>	<b>5</b>
2.1. Der Seehund ( <i>Phoca vitulina</i> )	5
2.2. Biomarker und Akut-Phase-Proteine	8
2.3. Das Eisentransportprotein Transferrin	9
2.4. Molekülspezifische Methoden in der Proteinanalytik	13
2.4.1. Zweidimensionale Gelelektrophorese	14
2.4.2. MALDI-TOF-MS	15
2.4.3. ESI-MS und ESI-MS/MS	17
2.5. Eisenspezifische Detektion mit ICP-MS	20
2.5.1. Eisen-Quantifizierung mit 1-Punkt-Kalibrierung über Flussinjektionen	23
2.5.2. Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalytik	24
2.5.2.1. Mathematische Grundlagen der <i>post-column</i> IDA	27
2.5.2.2. Berechnung für die <i>double-spiking</i> IDA und <i>Isotope pattern deconvolution</i>	27
2.5.2.3. Korrektur der Massendiskriminierung	29
<b>3. Experimenteller Teil</b>	<b>31</b>
3.1. Probenherkunft	34
3.2. Quantitative Immunoassays zur Konzentrationsbestimmung einzelner APPs	37
3.2.1. ELISA-Test für Hunde-Transferrin	37
3.2.2. Bestimmung von Haptoglobin und C-reaktivem Protein	38
3.3. Isolierung von Seehund-Transferrin	38
3.3.1. Probenvorbereitung für die Chromatographie	39
3.3.1.1. Sättigung von Transferrin mit Eisen	39
3.3.1.2. Lipoproteinfällung	39
3.3.2. Einsatz der SEC für die Ermittlung der zeitabhängigen Sättigungskurve	40
3.3.3. Anionenaustauschchromatographie mit anschließender eisenspezifischer Detektion und Fraktionierung	40
3.3.4. Zweidimensionale Gelelektrophorese	43
3.4. Identifizierung und Charakterisierung des Seehund-Transferrins	47
3.4.1. Enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Seehund-Transferrin	49
3.4.1.1. Tryptischer In-Gel-Verdau mit Abspaltung der N-Glykane durch PNGaseF	49
3.4.1.2. Abspaltung der N-Glykane mit PNGaseF	50
3.4.1.3. Sialinsäure-Abspaltung durch Neuraminidase	50

---

3.4.2. Einsatz von molekulspezifischer Massenspektrometrie zur Charakterisierung und Identifizierung von Seehund-Transferrin	51
3.4.2.1. MALDI-TOF-MS	51
3.4.2.2. ESI-qTrap-MS und ESI-qTrap-MS/MS	52
3.5. Entwicklung einer Methode zur absoluten Quantifizierung von Transferrin über eine 1-Punkt-Kalibrierung mittels Flussinjektion	54
3.5.1. Instrumenteller Aufbau für die absolute Quantifizierung von Transferrin mit FIA unter Verwendung einer Gradienten-Kompensation	54
3.5.2. Bestimmung des Probenschleifen-Volumens	56
3.5.3. FIA-Quantifizierung von Seehund-Transferrin und dessen Glykoformen	56
3.6. Absolute Tf-Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalytik	58
3.6.1. Instrumenteller Aufbau für die <i>post-column</i> IDA	58
3.6.2. Herstellung und Charakterisierung der isotopisch angereicherten Eisen-Spikes	59
3.6.3. Probenvorbereitung für die <i>double-spiking</i> IDA	61
3.6.4. Quantifizierung von Seehund-Transferrin mit <i>post-column</i> IDA	62
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1. Isolierung von Transferrin aus Seehund-Blutproben	63
4.1.1. Optimierung der Probenvorbereitung	63
4.1.2. HPLC-ICP-MS gestützte Fraktionierung der Transferrin-Glykoformen aus Serum- und Plasma-Proben von Seehunden	66
4.2. Identifizierung und Charakterisierung des Seehund-Transferrins	69
4.2.1. Charakterisierung des intakten Proteins mit MALDI-TOF-MS und ESI-MS	69
4.2.2. Massendifferenzen der Transferrin-Glykoformen und PNGaseF-Verdau	73
4.2.3. Neuraminidase katalysierte Abspaltung der endständigen Sialinsäure-Reste	74
4.2.4. Interspezies-Protein-Identifizierung über tryptische Peptide	77
4.3. Absolute Quantifizierung der Transferrin-Glykoformen mit HPLC-FIA-ICP-MS	81
4.3.1. Kompensation der gradientenbedingten Matrixeffekte für die ICP-MS-Detektion von Eisen	81
4.3.2. Bestimmung des Probenschleifen-Volumens	84
4.3.3. Untersuchung zur Eisensättigung von Transferrin aus Seehundblut	85
4.3.4. Validierung der analytischen Methode zur Quantifizierung von Transferrin	87
4.3.4.1. Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze	87
4.3.4.2. Präzision der absoluten Transferrin-Quantifizierung	89
4.3.4.3. Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung der Tf-Glykoformen	91
4.3.5. Absolute Quantifizierung von Seehund-Tf und dessen Glykoformen mit FIA	92

---

4.4. Isotopenverdünnungsanalytik	93
4.4.1. Charakterisierung der isotopisch angereicherten Eisen-Spikes	93
4.4.2. Quantifizierung von Seehund-Tf und Tf-Glykoformen mit <i>post-column</i> IDA	94
4.4.3. Vergleich der Tf-Quantifizierung mit FIA und <i>post-column</i> IDA	95
4.4.4. Absolute Quantifizierung von Tf mit <i>double-spiking</i> IDA	96
4.4.4.1. Evaluierung der Sättigung von Seehund-Transferrin mit isotopisch angereichertem Eisen	97
4.4.4.2. Präzision der absoluten Tf-Quantifizierung mit <i>double-spiking</i> IDA	99
4.4.5. Absolute Quantifizierung von Seehund-Tf mit <i>double-spiking</i> IDA	100
4.4.6. Vergleich der beiden Quantifizierungsmethoden für Seehund-Tf	102
4.5. Biologische Diskussion der Ergebnisse zur Tf-Quantifizierung	106
4.5.1. Absolute Quantifizierung von Seehund-Tf und dessen Glykoformen mit FIA	106
4.5.2. Bestimmung des Referenzbereichs für Tf- und CDT-Konzentrationen für Seehunde aus der Nordsee	107
4.5.3. Fallstudie: Tiere aus dem Elbe-Ästuar	113
4.5.4. Fallstudie: tödlich erkrankte Seehunde	115
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>127</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>I</b>



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Seehunde ( <i>Phoca vitulina vitulina</i> ) im Wattenmeer nahe der Insel Neuwerk (Quelle: P. Koerber, NPV Hamburgisches Wattenmeer).....	1
<b>Abbildung 2:</b> Europäischer Seehund ( <i>Phoca vitulina vitulina</i> ) während eines Wildfangs im Oktober 2008 auf einer Sandbank nahe der Insel Neuwerk (Quelle: P. Koerber, NPV Hamburgisches Wattenmeer) .....	5
<b>Abbildung 3:</b> Seehundkalender nach Adelung <i>et al.</i> (2007).....	7
<b>Abbildung 4:</b> Zusammenspiel von Zellen, Proteinen und Organen bei der unspezifischen Immunantwort, die zur Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen führt.....	8
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung von Säugetier-Transferrin mit zwei gebundenen Fe-Ionen .....	11
<b>Abbildung 6:</b> Komplexierung des Fe <sup>3+</sup> -Ions im Fe-Tf-Komplex durch vier Aminosäure-Reste (Asp, Tyr, His, Tyr) und das kooperativ gebundene CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -Ion .....	11
<b>Abbildung 7:</b> Reaktionsbedingungen für die Sättigung von Tf mit Eisenionen .....	12
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung der 2D-Gelelektrophorese .....	14
<b>Abbildung 9:</b> Strukturen der MALDI-Matrix Sinapinsäure und $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure (Rehm 2006, S. 240).....	16
<b>Abbildung 10:</b> Matrix-unterstützte Laser-Desorption/ Ionisierung (nach Lottspeich 2006, S.332).....	16
<b>Abbildung 11:</b> Flugrohr eines Flugzeitmassenspektrometers .....	17
<b>Abbildung 12:</b> Elektrospray-Ionenquelle (nach Lottspeich 2006; Rehm 2006) .....	17
<b>Abbildung 13:</b> Schematische Skizze eines Quadrupol-Analysators (nach Niessen 1999) .....	18
<b>Abbildung 14:</b> Fragmentierung eines Peptids, Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlman (1984).....	19
<b>Abbildung 15:</b> Schematische Darstellung einer ICP-MS mit Kollisions-/Reaktions-Zelle .....	20
<b>Abbildung 16:</b> Schematische Aufbau einer ICP-Plasmafackel mit Interface und Ionenoptik .....	21
<b>Abbildung 17:</b> Schematische Darstellung des Prinzips der Isotopenverdünnungsanalytik (IDA) .....	25
<b>Abbildung 18:</b> <b>a)</b> schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Verwendung des <i>post-column</i> Spikes zur Quantifizierung und <b>b)</b> Skizze des dazugehörigen Chromatogramms; <b>c)</b> schematische Darstellung für ein spezies-spezifischen Spike am Beispiel des vollständig mit <sup>57</sup> Fe gesättigten Transferrins und <b>d)</b> Skizze des dazugehörigen Chromatogramms .....	26
<b>Abbildung 19:</b> Fang- und Fundorte (mit Kreuz markiert) der in dieser Studie untersuchten Seehunde (Quelle der Karte: <sup>[1]</sup> <a href="http://www.stepmap.de/karte/nordsee-deutsche-bucht-3-141095">http://www.stepmap.de/karte/nordsee-deutsche-bucht-3-141095</a> ).....	35
<b>Abbildung 20:</b> Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus für die Auftrennung der Tf-Glykoformen mit Anionenaustauschchromatographie und paralleler ICP-MS sowie DAD-Detektion mit anschließender Fraktionierung .....	40
<b>Abbildung 21:</b> Schematische Darstellung der verwendeten Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Seehund-Tf.....	48
<b>Abbildung 22:</b> Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus für die absolute Quantifizierung mit FIA und Gradienten-Kompensation .....	54
<b>Abbildung 23:</b> Instrumenteller Aufbau der HPLC-ICP-MS Kopplung für die <i>post-column</i> IDA .....	59
<b>Abbildung 24:</b> Schematische Darstellung der Tf-Sättigung mit einem <sup>57</sup> Fe-Spike.....	61
<b>Abbildung 25:</b> Mittelwert der Dreifachbestimmung der Proteinkonzentrationen (Bradford-Test) nach den einzelnen Aufreinigungsschritten der Probenvorbereitung für Plasma-Proben (graue Säulen) und Serum-Proben (weiße Säulen) von P.v. 4191. <b>a)</b> pures Plasma/Serum	

<b>b)</b> Überstand nach dem ersten Zentrifugieren nach Tf-Sättigung und Lipoproteinfällung <b>c)</b> Probe nach der Zentrifugation und der abschließenden Verdünnung mit Laufpuffer.....	63
<b>Abbildung 26:</b> 2D-Gelelektrophorese der einzelnen Probenvorbereitungsschritte von einer Plasma-Probe des Tieres P.v. 4191 mit kolloidaler Coomassie-Färbung. Die Region, in der die Seehund-Tf-Glykoformen erwartet wurden, ist mit einer roten Ellipse markiert <b>a)</b> Plasma pur, vor der Probenvorbereitung (75 µg Protein) <b>b)</b> nach Tf-Sättigung und Lipoproteinfällung (51 µg Protein) <b>c)</b> nach abschließender Verdünnung (92 µg Protein) .....	65
<b>Abbildung 27:</b> SAX-Chromatogramm (PorosHQ) einer Plasma-Probe (P.v. 4190) während des Optimierungsprozesses (Gradient: 100 mM Ammoniumacetat in 20 min), schwarz: <sup>54</sup> Fe-Intensität, blau: Proteindetektion bei 280 nm, rot: Absorptionsmaximum des Fe-Tf-Komplexes bei 460 nm.....	66
<b>Abbildung 28:</b> Charakteristisches SAX-Chromatogramm einer Serum-Probe (P.v. 4190), die <sup>56</sup> Fe-Intensität aufgetragen gegen die Zeit (rote Linie – Ammoniumacetat-Gradient).....	67
<b>Abbildung 29:</b> 2D-Gel der gepoolten Fraktionen der Tf-Glykoformen nach SAX-HPLC einer Plasma-Probe, 24 cm IPG-Streifen, pH 3-10, 12%iges Tris-HCl Gel, Coomassie-Färbung, Ausschnitt mit den Tf-Glykoformen vergrößert dargestellt .....	68
<b>Abbildung 30:</b> MALDI-TOF-MS-Spektrum (Sinapinsäure, linearer Modus) der dominanten Glykoform (Peak S <sub>4</sub> ) von Tier P.v. 4191 (Plasma).....	70
<b>Abbildung 31:</b> ESI-QTrap-MS, statischer Nanospray der dominanten S <sub>4</sub> -Glykoform (P.v. 4190, Plasma) aus der HPLC-ICP-MS Fraktionierung <b>a)</b> Protein-Spektrum, Auftragung der Intensität als Zählrate ( <i>counts per second</i> , cps) des mehrfach geladenen Proteins gegen das m/z Verhältnis des Proteins <b>b)</b> Ergebnis der Daten-Entfaltung aus Spektrum a, Auftragung der Intensität in cps gegen die berechnete Proteinmasse .....	72
<b>Abbildung 32:</b> Mögliche Struktur für ein N-Glykan des Komplex-Typs der Masse 1965,77 Da, Galactose (Gal, gelber Kreis), N-Acetylglucosamin (GlcNAc, blaues Quadrat), Mannose (Man, grüner Kreis) <sup>[6]</sup> .....	73
<b>Abbildung 33:</b> MALDI-TOF-MS-Spektrum (Sinapinsäure, linearer Modus) der dominanten S <sub>4</sub> -Glykoform (P.v. 4190, Serum) nach einer Inkubation mit PNGaseF .....	74
<b>Abbildung 34:</b> Enzymatischer Verdau des Glykoproteins Tf mit α(2→3,6,8,9)Neuraminidase im Serum (P.v. 4190) mit anschließender SAX-Chromatographie und ICP-MS Detektion des <sup>56</sup> Fe-Isotops <b>a)</b> Inkubation bei 37 °C für 3 h ohne Zugabe von Neuraminidase <b>b)</b> Inkubation bei 37 °C für 3 h mit Neuraminidase <b>c)</b> Inkubation bei 37 °C für 24 h mit Neuraminidase.....	75
<b>Abbildung 35:</b> MALDI-TOF PMF-Spektrum von Spot 5 (vgl. Abbildung 29) des Tieres P.v. 4191 nach der Abspaltung der N-Glykane mit PNGaseF und anschließendem Trypsin-Verdau.....	78
<b>Abbildung 36:</b> Mascot Ergebnisse der Interspezies-Protein-Identifizierung über die PMF-Spektrum-Daten für die tryptischen Peptide von Spot 5 (vgl. Abbildung 29) des Tieres P.v. 4191 .....	79
<b>Abbildung 37:</b> Zwei Fragmentspektren [ <b>a)</b> 1756,98 m/z und <b>b)</b> 1994,17 m/z] aus nano-HPLC-ESI-MS/MS-Experimenten der tryptischen Peptide von Spot 1 (vgl. Abbildung 29) des Tieres P.v. 4191 .....	80
<b>Abbildung 38:</b> Einfluss des Ammoniumacetat-Gradienten auf die ICP-MS Eisen-Detektion, illustriert durch wiederholte Flussinjektionen mit einem Fe-Standard im Verlauf des Gradienten. Die roten Punkte sind die Mittelwerte der Peakflächen (n=3, RSD 8,94 %) der <sup>56</sup> Fe Intensität (Grebe <i>et al.</i> 2011). .....	82
<b>Abbildung 39:</b> Kompensation der Matrixeffekte auf die ICP-MS Eisen-Detektion durch Verwendung des gegenläufigen Gradienten, illustriert durch wiederholte Flussinjektionen mit einem Fe-Standard im Verlauf des Gradienten. Die roten Punkte sind die Mittelwerte der Peakflächen (n=10, RSD 4,00 %) der <sup>56</sup> Fe Intensität (Grebe <i>et al.</i> 2011). .....	83
<b>Abbildung 40:</b> Kalibrierkurve: <sup>59</sup> Co-Intensität (Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken) aufgetragen gegen die Co-Konzentration, mit der daraus resultierenden Geradengleichung $y = 7919086 x$ , 5 µL Injektionsvolumen, isokratisch 2% HNO <sub>3</sub> 0,5 mL/min. ....	84



- Abbildung 41:** Konzentrationsabhängige Sättigungskurve für die Bildung des Fe-Tf-Komplexes am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4190 nach der SAX-HPLC-ICP-MS Detektion ..... 86
- Abbildung 42:** Zeitabhängige Sättigungskurve für die Bildung des Fe-Tf-Komplexes am Beispiel eines teilweise gesättigten humanen Tf-Standards nach der SEC-HPLC-ICP-MS Detektion. .... 86
- Abbildung 43:** Kalibrierkurve:  $^{56}\text{Fe}$ -Intensität (Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken) aufgetragen gegen die jeweils injizierten Eisenmengen, mit der daraus resultierenden Geradengleichung  $y = 478080 x$ ,  $n=3$ ,  $8,722 \mu\text{L}$  Injektionsvolumen über die Probenschleife,  $0,75 \text{ mL/min}$  mit beiden Pumpen, Puffer A und B mit teilweise gegenläufigem Gradient. Vergrößerung des Konzentrationsbereichs von  $0 - 9 \text{ ng Fe}$  ..... 88
- Abbildung 44:** Ein typisches SAX-HPLC-ICP-MS Chromatogramm des zertifizierten humanen Referenzserums (ERM-DA470k/IFCC), mit drei Flussinjektionen (a, b, c) mit einem  $1 \text{ mg/L}$  Fe-Standard, detektiert wurde das  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotops. .... 90
- Abbildung 45:** Das SAX-HPLC-ICP-MS Chromatogramm einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4116, mit drei Flussinjektionen (a, b, c) von  $1 \text{ mg/L}$  Fe-Standard, detektiert wurde die Intensität des  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotops. .... 92
- Abbildung 46:** Ermittlung eines Korrekturfaktors für die Massendiskriminierung, der natürliche Logarithmus von  $R_{\text{exp}}/R_{\text{theor}}$  wurde gegen die Massendifferenz der Eisenisotope in Bezug auf das Hauptisotop mit der Masse 56 aufgetragen. .... 94
- Abbildung 47: a)** Chromatogramm einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4191 **b)** aus a) resultierendes Massenfluss-Chromatogramm für das Isotopenverhältnis von  $56/54$ ..... 94
- Abbildung 48:** Tf-Sättigung für Serum-Proben der Tiere P.v. 4190 und P.v. 4191 über einen Zeitraum von etwa zwei Tagen mit wiederholten IDA-Messungen..... 98
- Abbildung 49:** Chromatogramm für das zertifizierte humane Referenzserum ERM-DA470k/IFCC mit *double-spiking* IDA..... 99
- Abbildung 50:** Chromatogramm für eine Serum-Probe des Tieres P.v. 4191 mit *double-spiking* IDA ..... 100
- Abbildung 51:** Korrelation der **a)** Tf-, **b)** CDT- und **c)**  $\text{S}_4$ -Konzentrationen aus Serum-Proben von 15 Seehunden quantifiziert mit der FIA und IDA im Vergleich. Die gestrichelte Gerade stellt die Diagonale  $y = x$  dar. Die grauen Rauten sind die Tiere mit normalem Tf-Glykoformen-Muster und die roten Quadrate die Tiere mit erhöhtem CDT-Level. Die Regressionsgerade für die Tiere mit normalem Tf-Glykoformen-Muster wurde berechnet (durchgezogene Linie) und die Gleichung mit Bestimmtheitsmaß  $R^2$  in der Grafik dargestellt ... 104
- Abbildung 52:** SAX-HPLC-ICP-MS Chromatogramm **a)** mit normalem Glykoformen-Muster am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres W05/08Pv (männlich,  $119 \text{ cm}$ ,  $39 \text{ kg}$ , Neuwerk 10.10.08) **b)** mit abnormalem Glykoformen-Muster am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres W02/08Pv (männlich,  $130 \text{ cm}$ ,  $48 \text{ kg}$ , Neuwerk 10.10.08). Der hellblaue Kasten markiert den Bereich der CDT-Glykoformen ..... 107
- Abbildung 53:** Tf-Konzentrationen der 43 Seehunde (34 männliche Tiere und 9 weibliche Tiere). Der Referenzbereich ist als  $5 - 95 \%$  Perzentil, der Median als Strich bei  $50 \%$ , der Mittelwert als Quadrat, das Maximum und Minimum sind als Kreuz dargestellt. .... 110
- Abbildung A1:** MALDI-TOF-MS Spektrum (Sinapinsäure, linearer Modus) **a)** der Tf-Glykoform  $\text{S}_7$  und **b)** der Tf-Glykoform  $\text{S}_8$  des Tieres P.v. 4191 nach der SAX-HPLC-ICP-MS ..... VI
- Abbildung A2:** Ergebnis der Daten-Entfaltung des ESI-QTrap-MS-Protein-Spektrums der gepoolten Tf-Glykoform aus der HPLC-ICP-MS Fraktionierung vom Plasma des Tieres P.v. 4190 ..... VII
- Abbildung A3:** Sequenz-Alignment von Serotransferrin (Rind, Schwein, Pferd, Mensch) mit dem Algorithmus „clustalW“ auf SwissProt/UniProtKB<sup>[3]</sup> (<http://www.uniprot.org/>). Sternchen zeigen identische Aminosäuren an (397) und Punkte ähnliche Aminosäuren (178). In blau sind die Bindungsstellen für das Fe markiert und in grün die Bindungsstellen für das

Carbonat-Ion. Die lila markierte Anfangssequenz ist ein Signalpeptid, welches nach der Translation abgespalten wird. ....	VIII
<b>Abbildung A4: a)</b> Tf-Konzentration (Quadrat) und <b>b)</b> CDT-Level (Raute) für Serum-Proben der Tiere P.v. 4190 (schwarz) und P.v. 4191 (weiß) über einen Zeitraum von etwa zwei Tagen mit wiederholten IDA-Messungen .....	IX

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Biologische Kenngrößen des Seehunds <i>Phoca vitulina</i> (Burns 2002) .....	6
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angaben zum Hersteller .....	31
<b>Tabelle 3:</b> Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte mit zugehörigen Herstellerangaben .....	33
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Geräte und Laborausstattung mit Herstellerangaben .....	33
<b>Tabelle 5:</b> Zur Datenauswertung eingesetzte Software.....	34
<b>Tabelle 6:</b> Datum und Ort der Probennahme der verwendeten Seehund-Blutproben und die biologischen Merkmale der Tiere, mit * gekennzeichnete Tiere wurden aufgrund ihres kritischen allgemeinen Gesundheitszustands von Seehundjägern erschossen (n.b. – nicht bestimmt; m - männlich, w - weiblich; P.v. - <i>Phoca vitulina</i> ; W - Wildfang).....	35
<b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung der Laufpuffer für die SAX-Chromatographie .....	41
<b>Tabelle 8:</b> Optimierte HPLC-Parameter für die SAX-Chromatographie von Tf.....	42
<b>Tabelle 9:</b> ICP-MS Einstellungen für die eisenspezifische Detektion von Tf aus Seehund-Blutproben bei Kopplung mit SAX-HPLC.....	43
<b>Tabelle 10:</b> Zusammensetzung der selbst gegossenen 12%igen Tris-HCl-Gele.....	44
<b>Tabelle 11:</b> Zusammensetzung des Rehydratisierungspuffers für die Probenaufgabe auf die IPG-Streifen .....	45
<b>Tabelle 12:</b> Bedingungen für die Isoelektrische Fokussierung von 11 cm und 24 cm IPG-Streifen.....	45
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers I und II .....	46
<b>Tabelle 14:</b> Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers für die Gelelektrophorese .....	46
<b>Tabelle 15:</b> Einstellungen für die Auftrennung in der 2. Dimension der Gelelektrophorese .....	47
<b>Tabelle 16:</b> Probenpräparation für MALDI-MS auf einem AnchorChip™ 600/384 mit den verwendeten Matrices und Lösungen .....	51
<b>Tabelle 17:</b> Verwendeten Suchparameter für die <i>Cross-species</i> -Protein-Identifizierung mit dem Mascot Algorithmus über die tryptischen Peptide von Seehund-Transferrin.....	52
<b>Tabelle 18:</b> Parameter für die ESI-MS Messungen in der Analyst Software von Applied Biosystems.....	53
<b>Tabelle 19:</b> Verwendete Suchparameter zum Abgleich der Fragmentspektren der tryptischen Peptide mit Datenbank-Fragmentspektren .....	53
<b>Tabelle 20:</b> Gradienten-Bedingungen für die FIA-Quantifizierung und Schaltung des externen Ventils für das humane Referenzmaterial (ERM®-DA470k/IFCC) und für Seehund-Blutproben.....	55
<b>Tabelle 21:</b> Die ICP-MS-Parameter für die Massendiskriminierung und Spike-Charakterisierung.....	60
<b>Tabelle 22:</b> Datenbankeinträge für die Serotransferrin AS-Sequenzen verschiedener Säugetierspezies mit der Anzahl an AS, molekulare Masse des Proteinrückgrats und der theoretischen pI-Werte.....	69

<b>Tabelle 23:</b> Retentionszeiten ( $t_R$ ) und relativen Peakflächen (area) der Tf-Glykoformen, der SAX-HPLC ICP-MS Chromatogramme (P.v. 4190, Serum) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Enzym Neuraminidase bei 37 °C <b>a)</b> 3 h ohne Zugabe von Neuraminidase <b>b)</b> 3 h mit Neuraminidase <b>c)</b> 24 h mit Neuraminidase.....	76
<b>Tabelle 24:</b> Zusammenfassung der Identifizierung durch den Interspezies-Vergleich der tryptischen Peptide des Seehund-Tfs (P.v. 4191) .....	81
<b>Tabelle 25:</b> Kobalt Konzentrationen und $^{59}\text{Co}$ -Intensitäten mit Mittelwert ( $\bar{x}$ ), SD und RSD für eine der drei externen Kalibrierungen.....	84
<b>Tabelle 26:</b> Volumen der Proben, $^{59}\text{Co}$ -Intensitäten, Mittelwert und Standardabweichung der Kalibrierung der Probenschleife für die Flussinjektion mit einem Co-Standard und Berechnung des Probenschleifenvolumens .....	85
<b>Tabelle 27:</b> Die jeweils injizierten Eisenkonzentrationen und entsprechende absolute Eisenmenge einer Flussinjektion (8,722 $\mu\text{L}$ über die Probenschleife), der Mittelwert der Peakfläche ( $\bar{x}_{\text{area}}$ ) mit SD und RSD. Mobile Phase A: 20 mM Bis-Tris, und B: 20 mM Bis-Tris + 500 mM Ammoniumacetat, mit Gradientenkompensation bei einem Fluss von 0,75 mL/min beider Pumpen.....	88
<b>Tabelle 28:</b> Zusammenstellung der experimentell bestimmten Tf- und CDT-Konzentration sowie die zertifizierte Tf-Konzentration für das humane Referenzserum ERM-DA470k/IFCC .....	90
<b>Tabelle 29:</b> Zusammenstellung der Mittelwerte der Retentionszeiten $\bar{x}(t_R)$ mit zugehöriger relativen Standardabweichung (RSD) und der relativen Standardabweichung der Peakflächen für die Tf-Glykoformen des zertifizierten humanen Referenzserums (ERM-DA470k/IFCC, n=3).....	91
<b>Tabelle 30:</b> Zusammenstellung der Mittelwerte der Retentionszeit $\bar{x}(t_R)$ mit zugehörigen RSD und die RSD der Peakflächen der Tf-Glykoformen einer Serum-Probe von P.v. 4190 (n=3) nach der SAX-Chromatographie mit HPLC-ICP-MS. ....	91
<b>Tabelle 31:</b> Tf-Konzentration zweier Seehunde quantifiziert mit FIA und <i>post-column</i> IDA .....	95
<b>Tabelle 32:</b> Mit <i>double-spiking</i> IDA quantifizierte Tf-Konzentration des zertifizierten humanen Referenzserums ERM-DA470k/IFCC und die entsprechende zertifizierte Konzentrationsangabe.....	100
<b>Tabelle 33:</b> Zusammenstellung der erhaltenen Informationen aus den <i>double-spiking</i> IDA-Messungen, Serum-Eisen, <i>unsaturated iron binding capacity</i> (UIBC), <i>total iron binding capacity</i> (TIBC), Tf-Konzentration und Tf-Sättigung für das humane Referenzserum und Seehund-Serumproben. Die getöteten Tiere sind mit einem * gekennzeichnet.....	101
<b>Tabelle 34:</b> Vergleich der FIA und <i>double-spiking</i> IDA anhand von Tf-, CDT- und $\text{S}_4$ -Konzentration, Differenzen der Tf- und CDT-Konzentrationen $\geq 0,3$ g/L sind in roter Schrift hervorgehoben.....	102
<b>Tabelle 34 (Fortsetzung):</b> Vergleich der FIA und <i>double-spiking</i> IDA anhand von Tf-, CDT- und $\text{S}_4$ -Konzentration, Differenzen der Tf- und CDT-Konzentrationen $\geq 0,3$ g/L sind in roter Schrift hervorgehoben.....	103
<b>Tabelle 35:</b> Tf- und CDT-Konzentration mit Standardabweichung und CDT-Level für 43 Seehunde aus der deutschen Nordsee gefangen auf der Lorenzenplate (L) und Helgoland (H). Juvenile ( $\leq 2$ Jahre) und adulte ( $> 2$ Jahre), männliche (m) und weibliche (w) Tiere (zur besseren Übersicht mit einer Linie abgegrenzt).....	108
<b>Tabelle 36:</b> Statistische Parameter für die Tf- und CDT-Konzentrationen von Serum-Proben der 43 Seehunde aus der deutschen Nordsee.....	109
<b>Tabelle 37:</b> Statistische Parameter für Serum-Eisen, <i>unsaturated iron binding capacity</i> (UIBC), <i>total iron binding capacity</i> (TIBC), Tf-Konzentration und Tf-Sättigung quantifiziert mit <i>double-spiking</i> IDA für Seehund-Serumproben. Die getöteten Tiere sind mit einem * gekennzeichnet.....	111
<b>Tabelle 38:</b> Tf- und CDT-Konzentration mit Standardabweichung und CDT-Level für fünf Seehunde von einem Wildfang (W) nahe Neuwerk (N) in 2008. Juvenile ( $\leq 2$ Jahre) und adulte ( $> 2$ Jahre), männliche (m) und weibliche (w) Tiere.....	113

---

<b>Tabelle 39:</b> Konzentrationen von Tf und der relative CDT-Level sowie die Konzentration der Akut-Phase-Proteine Hp und CRP (Kakuschke <i>et al.</i> 2010b), in rot sind die gegenüber dem Referenzbereich für Hp <sup>1</sup> (Kakuschke <i>et al.</i> 2010a) erhöhten Werte markiert, Pink weist auf die nur leicht angestiegenen Werte im Vergleich zu denen anderer Tiere dieser Fallstudie hin.....	114
<b>Tabelle 40:</b> Tf- und CDT-Konzentration mit Standardabweichung und CDT-Level für sechs Seehunde, die aufgrund ihres kritischen allgemeinen Gesundheitszustands von Seehundjägern erschossen wurden (*). Fundorte Helgoland (H) und Sylt. Juvenile ( $\leq 2$ Jahre) und adulte ( $> 2$ Jahre), männliche (m) und weibliche (w) Tiere. ....	115
<b>Tabelle 41:</b> Konzentrationen der Akut-Phase-Proteine Tf, Hp und CRP und der CDT-Level. In rot sind die gegenüber dem Referenzbereich erhöhten Werte markiert, Pink weist auf die nur leicht angestiegenen Werte hin <sup>1</sup> (Kakuschke <i>et al.</i> 2010a). ....	116
<b>Tabelle A1:</b> Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Gefahreinstufung und Sicherheitshinweisen nach GHS ("Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals") .....	I
<b>Tabelle A2:</b> y- und b-Ionenserien der ESI-MS/MS Fragmentspektren zu den tryptischen Peptiden mit den Massen 1756,98 <i>m/z</i> , 1994,17 <i>m/z</i> und 1096,61 <i>m/z</i> .....	X

## Abkürzungen

2D GE	zwei-dimensionale Gelelektrophorese
a.u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheit)
AD	Außendurchmesser
amu	<i>atomic mass unit</i> (Atomare Masseneinheit) veraltet für u ( <i>unified atomic mass unit</i> )
APP	Akut-Phase-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
Blast	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Albumin aus Rinderserum)
CDT	<i>carbohydrate deficient transferrin</i> (Kohlenhydrat-defizientes Transferrin: Summe von A-, Mono- und Disialotransferrin)
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio)-1-propansulfonat
cps	<i>counts per second</i> (Zählrate)
CRP	C-reaktives Protein
DAD	<i>Diode Array Detektor</i>
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMS	<i>enhanced mass spectrum</i> (erweitertes Massenspektrum)
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FIA	<i>flow injection analysis</i> (Flussinjektionsanalyse)
HCB	Hexachlorbenzen
HCCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> (α-Cyano-4-hydroxizimtsäure)
Hp	Haptoglobin
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
IAA	Iodoacetamid
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie)
ID	Innendurchmesser
IDA	<i>isotope dilution analysis</i> (Isotopenverdünnungsanalyse)
IPD	<i>isotope pattern deconvolution</i> (Isotopenmuster-Entfaltung)
IPG	immobilisierter pH-Gradient
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> (Durchlässigkeit der Membran bis zur genannten Molekülgröße)
N <sub>1</sub>	Umfang der Stichprobe 1
N <sub>2</sub>	Umfang der Stichprobe 2
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NPV	Nationalpark-Verwaltung
<i>P</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit
P.v.	<i>Phoca vitulina</i>
PEEK	Polyetheretherketon
PFA	Perfluoralkoxylalkan
pl	isoelektrischer Punkt
PNGase	<i>Peptide N-Glycosidase</i> (Peptid N-Glykosidase)
PP	Polypropylen

PS	Polystyrol
QTrap	<i>Quadrupole-linear-iontrap</i> (lineare Quadrupol-Ionenfalle)
rps	<i>rounds per second</i> (Umdrehungen pro Sekunde)
RSD	<i>relative standard deviation</i> (relative Standardabweichung)
RT	Raumtemperatur
S/N	<i>signal noise ratio</i> (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
SAX	<i>strong anion exchange</i> (starker Anionentauscher)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SRM	<i>standard reference material</i> (standardisiertes Referenzmaterial)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TICB	<i>total iron binding capacity</i> (Gesamteisenbindungskapazität)
TMAP	<i>Trilateral Monitoring and Assessment Program</i> (Trilaterales Beobachtungs- und Bewertungs-Programm zwischen Deutschland, Dänemark und den Niederlanden)
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
$t_R$	Retentionszeit
U	Prüfgröße des U-Tests, Rangsumme der Stichprobe
UIBC	<i>unsaturated iron binding capacity</i> (Eisenbindungskapazität ungesättigten Transferrins)

### mathematische Formelzeichen

A	<i>abundance</i> (Isotopenhäufigkeit)
$A_r$	relative Atommasse
area	Peakfläche
c	Konzentration
e	Elementarladung, Eulersche Zahl
f	Verdünnungsfaktor
flow	Fluss
I	Intensität
k	Konstante
L	Länge
m	Masse
M	molare Masse
MF	Massenfluss, <i>mass flow</i>
n	Stoffmenge
R	<i>ratio</i> (Verhältnis)
t	Zeit
U	Spannung
V	Volumen
x	Isotopenhäufigkeit, Stoffmengenanteil
y	Vektor der Isotopenhäufigkeit
z	Ladung
$\Delta$	Differenz
$\bar{x}$	Mittelwert
	<b>Zucker</b>
Gal	Galactose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin

---

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





## 1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

In der Nordsee sind drei Arten von Säugetieren beheimatet. Neben dem Schweinswal (*Phocoena phocoena*) und der Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) lebt dort vorherrschend der Seehund (*Phoca vitulina*). Die Nordsee und im Besonderen das Wattenmeer als seichtes Gewässer mit vielen Sandbänken, die bei Ebbe trockenfallen, sind ein idealer Lebensraum für Seehunde. Sie sind benthische Fresser, die ihre Nahrung in Bodennähe finden und ungestörte Liegeplätze an Land zur Geburt und zum Säugen ihrer Jungen sowie zur Erholung benötigen (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Seehunde (*Phoca vitulina vitulina*) im Wattenmeer nahe der Insel Neuwerk (Quelle: P. Koerber, NPV Hamburgisches Wattenmeer)

Im Laufe der Geschichte wurde der Seehundbestand in der Nordsee immer wieder dezimiert. Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde der Seehund als Nahrungskonkurrent intensiv bejagt. Seit die Seehundjagd 1973 in Deutschland verboten wurde und 1985 der Nationalpark Wattenmeer gegründet wurde, hat sich der Bestand an Seehunden wieder erholt. Jedoch gab es ein massives Seehundsterben in der Nordsee ausgelöst durch zwei große Staupe-Virus Epidemien in 1988 und 2002. Der Seehundbestand ist seitdem aber wieder sehr deutlich angestiegen. In 2009 wurde durch die jährlichen Zählungen im August während des Fellwechsels im gesamten Gebiet (NL, D, DK) des Ökosystems Wattenmeer die Populationsgröße auf 21 571 Tiere beziffert. Damit ist der bisherige Höchststand seit dem Beginn der Zählungen in 1977 erreicht (Reijnders *et al.* 2009).

In der heutigen Zeit sind die Seehunde nicht mehr durch die Jagd bedroht. Der Lebensraum Wattenmeer ist jedoch durch die intensive anthropogene Nutzung des Küstenraums stark beansprucht und beeinträchtigt. Aktuell geht eine Gefährdung insbesondere durch Schadstoffeinträge aus Flüssen, stark frequentierter Schifffahrtsrouten und der dafür

notwendigen wiederkehrenden Baggerarbeiten zur Fahrrinnen-Vertiefung, Bau und Betrieb von *Offshore*-Windkraftanlagen sowie Fischfang und Tourismus aus.

Im Jahr 1997 verpflichteten sich die drei Anrainerstaaten des Wattenmeers - Dänemark, Deutschland und die Niederlande - mit Unterzeichnung des Trilateralen-Wattenmeer-Plans zum gemeinschaftlichen Schutz des einzigartigen Ökosystems Wattenmeer. Sie vereinbarten ein Monitoring Programm (*Trilateral Monitoring and Assessment Program*, TMAP), in dem wissenschaftliche Forschung über den Status und die Entwicklung des Wattenmeers festgelegt wurde. Im TMAP werden Seehunde als Indikator für mittel- und langfristige Änderungen im marinen Ökosystem benannt. Neben der Anzahl der Tiere, der Altersstruktur und dem Geschlechterverhältnis der Population sind u.a. immunologische und toxikologische Untersuchungen einzelner Individuen zur Beurteilung des Gesundheitszustands der marinen Säuger gefordert (Bakker *et al.* 1998; Reijnders *et al.* 2009).

Aufgrund ihrer langen Lebensspanne, der späten Geschlechtsreife, des relativ geringen Reproduktionspotentials und ihrer hohen trophischen Stufe im Nahrungsnetz sowie der Anreicherung von Schadstoffen in ihrer Speckschicht sind Seehunde den Stressoren wie Schadstoffbelastung, Lärmbelästigung und Konkurrenz um Nahrungsressourcen bzw. Lebensraum besonders stark ausgesetzt. Demzufolge eignen sie sich gut als Indikator für das jeweilige Ökosystem (Fair und Becker 2000).

Als Carnivoren stehen Seehunde am oberen Ende der Nahrungskette und nehmen so über die Nahrung eine Vielzahl organischer und anorganischer Umweltkontaminanten in angereicherter Konzentration auf. Durch die Aufnahme verschiedener Schadstoffe, die auf die intensive anthropogene Nutzung des Küstenraumes sowie durch Einträge aus Flüssen und der Atmosphäre zurückzuführen sind, kann das Immunsystem der Seehunde geschwächt werden. Ein Zusammenhang zwischen Schadstoffbelastung mariner Säugetiere und immunologischen Funktionsstörungen wurde im Rahmen von verschiedenen Studien gezeigt (Ross *et al.* 1995; 1996; Kakuschke und Prange 2007; Dufresne *et al.* 2010). Durch diese Schwächung können die Tiere anfälliger für Parasiten, Bakterien und virale Infektionen sein. Ferner wird diskutiert, dass schadstoffbedingte Beeinträchtigungen das Massensterben bei Seehunden in der Nordsee während der beiden großen Staupe-Virus Infektionen in den Jahren 1988 und 2002 begünstigt haben (Ross 2002; Härkönen *et al.* 2006).

Der Gesundheitszustand von Seehunden kann somit ein indirekter, aber aussagekräftiger Parameter für die Überwachung von Umweltveränderungen sein. Gleichzeitig ist er jedoch ein sehr vager und schwer greifbarer Begriff, der ein ebenso komplexes wie vielschichtiges Untersuchungsfeld darstellt. Zudem steht neben der Bestimmung von Gewicht und Länge der Tiere und der Beurteilung durch einen Veterinär allein die Untersuchung des Blutes als

diagnostisches Mittel lebender Tiere zur Verfügung. Eine Vielzahl an Faktoren, wie hämatologische und immunologische Untersuchungen, biochemische Analysen von Enzymen und Metaboliten, bakteriologische Screenings ebenso wie Konzentrationsbestimmungen von anorganischen Spurenelementen und organischen Schadstoffen im Blut können Hinweise auf den Gesundheitszustand des jeweiligen Tiers liefern.

Zum Gesundheitszustand bzw. Immunstatus (Kakuschke *et al.* 2005; Siebert *et al.* 2007; Hasselmeier *et al.* 2008) und/oder der Schadstoffbelastung (Griesel *et al.* 2008; Ahrens *et al.* 2009; Kuenstl *et al.* 2009; Weijs *et al.* 2009) von Seehunden im Wattenmeer wurden verschiedene Studien durchgeführt. Die Liste der Parameter umfasst die Speziation ausgewählter Elemente (Kuenstl *et al.* 2009) und die Konzentrationsbestimmung von Spurenelementen (Griesel *et al.* 2008), organischen Schadstoffen (Kakuschke *et al.* 2010b), und einzelner Akut-Phase-Proteine (APP) (Rosenfeld *et al.* 2009; Kakuschke *et al.* 2010a; 2010b), die Untersuchung der Lymphozyten-Proliferation (Kakuschke *et al.* 2005; 2008a; 2008b), ebenso wie standardisierte Parameter der klinischen Chemie (Kakuschke *et al.* 2010b).

Akut-Phase-Proteine sind eine heterogene Gruppe von Plasmaproteinen mit unterschiedlichen molekularen und physiologischen Eigenschaften, deren Konzentration sich z.B. bei akuten Entzündungen innerhalb von wenigen Stunden bis zu einigen Tagen oder gar Wochen (Duffy *et al.* 1996; Gabay und Kushner 1999) gegenüber dem Referenzbereich um mindestens 25 % ändert (Ceciliani *et al.* 2002). Verallgemeinernd kann die Wirkungsweise der APPs als entzündungshemmend beschrieben werden. Sie können als Indikatorproteine bzw. Biomarker wichtige Hinweise auf den aktuellen Gesundheitszustand des untersuchten Tieres liefern. Indes ergeben sich aus der Betrachtung einzelner Biomarker alleine nur limitierte Informationen. Daher ist es erforderlich, ein möglichst umfangreiches Set an Biomarkern in Kombination mit anderen diagnostischen Parametern zu nutzen (Cajaraville *et al.* 2000).

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt in der Erweiterung des bisher zur Verfügung stehenden Sets an diagnostisch relevanten APPs. Ein diagnostisch wichtiges APP ist Transferrin (Tf), das als Eisen-Transport-Protein im Blut aller Säugetiere vorhanden ist. In der Veterinärmedizin stellen APP ein wichtiges diagnostisches Mittel zur Überwachung dar, insbesondere bei der Verlaufskontrolle verschiedener Krankheiten, Stress auf zellulärer Ebene und akuten pathogenen Effekten (Eckersall 2000; Murata *et al.* 2004; Petersen *et al.* 2004). In der klinischen Diagnostik werden Verschiebungen im Muster der einzelnen Tf-Glykoformen als Biomarker für Funktionsstörungen der Leber und verschiedener Lebererkrankungen herangezogen (Murawaki *et al.* 1997; Arndt 2001; Helander *et al.* 2001a;

Fraenkel *et al.* 2009). Diese zählen zu den am häufigsten erfassten Befunde bei Seehunden in der Nordsee (Siebert *et al.* 2007).

Besonders die spezifische Bestimmung von ausgewählten diagnostischen Marker-Proteinen und deren posttranslational veränderten Isoformen, z.B. Glykoformen, stellen einen neuen Ansatz für die Untersuchung des Gesundheitszustands von Seehunden dar.

Gegenstand der Arbeit ist die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung des APPs Tf und dessen Glykoformen in der komplexen Matrix des Seehund-Bluts.

Der Mangel an akkuraten, standardisierten Quantifizierungsmethoden für die Bestimmung von Biomarkern ist ein generelles Problem und besonders problematisch für ein kontinuierliches Monitoring über einen langen Zeitraum.

Zur Tf-Bestimmung in der humanen Medizin werden gegenwärtig überwiegend antikörperbasierende Methoden, wie Immunoturbidimetrie (Helander *et al.* 2001b; Fraenkel *et al.* 2009), Immunoblotting (Helander *et al.* 2001a; Wu *et al.* 2008) oder Immunoaffinität (Aubailly *et al.* 2011; Makino *et al.* 2011) eingesetzt. Antikörper sind jedoch lediglich für ausgewählte Spezies, wie Mensch oder bedeutende Haustierarten verfügbar. Daher ist eine Anwendung von diesen antikörperbasierenden Methoden für wildlebende Tiere, wie Seehunde nicht durchführbar. Methodische Ansätze, wie HPLC-UV/Vis sind dazu geeignet die Tf-Glykoformen zu separieren, jedoch werden die Tf-Glykoformen nur relativ zur Gesamt-Tf-Konzentration bestimmt (Arndt *et al.* 2008). Bei den zweimal jährlich vom Referenzinstitut für Bioanalytik durchgeführten Ringversuchen zur Tf-Glykoform-Bestimmung zeigten die Messungen eine starke Abhängigkeit von der angewendeten Methode. Sogar innerhalb einer Methode wurden Unterschiede zwischen Kits verschiedener Hersteller festgestellt (Kleesiek *et al.* 2010).

Ein viel versprechender Ansatz ist die ICP-MS basierte Methode von del Castillo Busto *et al.* (2005; 2006; 2008) über die Quantifizierung des an Tf gebundenen Eisens. Die Eisen-Detektion ist unabhängig von der Fe-Spezies, es erfolgt keine Diskriminierung einzelner Glykoformen, wie es z.B. bei Immunoassays der Fall sein kann. Die elementspezifische ICP-MS Methode ist ein aussichtsreicher Ansatz in der quantitativen Proteomics (Sanz-Medel *et al.* 2003; Prange und Pröfrock 2008; Sanz-Medel *et al.* 2008; Bettmer *et al.* 2009).

Neben der Isolierung und Identifizierung von Tf aus Seehund-Blut mit molekülspezifischen Methoden, wie 2D-Gelelektrophorese, MALDI- und ESI-MS, soll in Rahmen dieser Arbeit eine HPLC-ICP-MS basierte Quantifizierungsmethode für die Seehund-Tf-Glykoformen entwickelt werden.

## 2. Stand der Wissenschaft

### 2.1. Der Seehund (*Phoca vitulina*)

Der Seehund *Phoca vitulina* gehört zur Familie der Hundсроbben (Phocidae), deren Arten über die Küstengewässer der ganzen Welt verbreitet sind. *Phoca vitulina* ist an allen eisfreien Küsten der Nordhalbkugel beheimatet, wobei fünf geographisch getrennte Unterarten unterschieden werden. In der Nordsee lebt der Ostatlantische Seehund *Phoca vitulina vitulina*, der auch als Europäischer Seehund bezeichnet wird (Burns 2002).

Taxonomisch lässt sich der Seehund folgendermaßen einordnen:

Klasse:	Mammalia (Säuger)
Ordnung:	Carnivora (Raubtiere)
Unterordnung:	Pinnipedia (Flossenfüßer)
Familie:	Phocidae (Hundсроbben)
Unterfamilie:	Phocinae
Gattung:	<i>Phoca</i>
Art:	<i>Phoca vitulina</i> (Seehund)
Unterart:	<i>Phoca vitulina vitulina</i> (Ostatlantischer Seehund) <i>Phoca vitulina concolor</i> (Westatlantischer Seehund) <i>Phoca vitulina mellonae</i> (Ungava-Seehund) <i>Phoca vitulina richardsi</i> (Ostpazifischer Seehund) <i>Phoca vitulina stejnergeri</i> (Westpazifischer Seehund)

Als Anpassung an das Leben im Wasser hat der Seehund einen lang gestreckten spindelförmigen Körper mit zu Flossen umgebildeten Extremitäten. Die vorderen Flossen sind kurz mit kräftigen Krallen, die Hinterflossen sind ausschließlich nach hinten gerichtet. Dadurch ist an Land nur eine robbende Fortbewegung möglich (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Europäischer Seehund (*Phoca vitulina vitulina*) während eines Wildfangs im Oktober 2008 auf einer Sandbank nahe der Insel Neuwerk (Quelle: P. Koerber, NPV Hamburgisches Wattenmeer)

Die Ohrmuscheln der Hundсроbben fehlen im Gegensatz zu denen der Familie der Ohrenrobбен. Die Nasen- und die verbleibenden Ohrenöffnungen des Seehundes können

verschlossen werden. Der Seehund hat sehr sensitive Tasthaare, die Vibrissen. Diese sind bei dem oft trüben Wasser der küstennahen Bereiche das wichtigste Organ bei der Nahrungssuche. Die Augen der Seehunde sind, in Bezug auf ihre Körpergröße, überproportional groß. Sie sind sowohl an das Sehen über als auch unter Wasser angepasst (Bowen 2002).

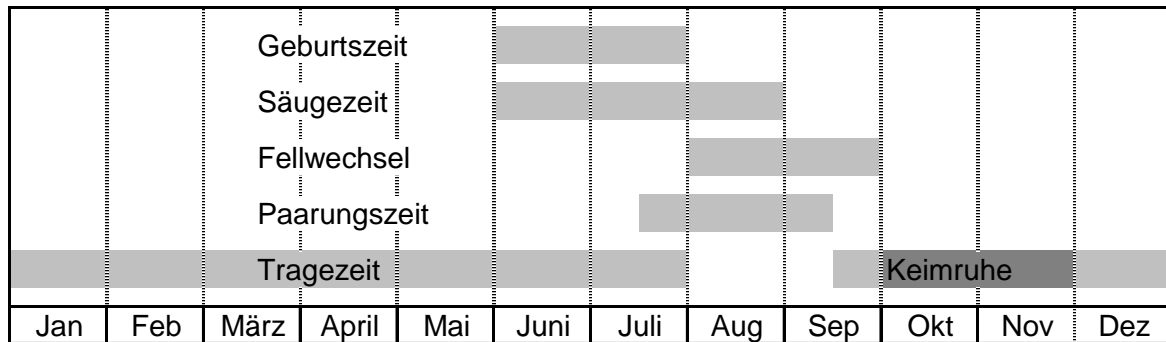
Das Haarkleid variiert stark in der Farbe und dem gepunkteten Muster. Es kommen Fellfarben von gelblich-sandbraun bis hin zu stahl- und dunkelgrau vor, mit kleinen unregelmäßigen teilweise verwischten Flecken auf dem Rücken und einer überwiegend helleren Bauchseite. Einmal jährlich in den Spätsommermonaten erfolgt ein Fellwechsel. Während dieser Zeit suchen die Seehunde ihre Liegeplätze so oft als möglich auf, um sich in der Sonne aufzuwärmen (Burns 2002). Das Haarkleid ist durch die Einfettung mittels eines Talgdrüsensekrets wasserundurchlässig und die dicke Speckschicht unter der Haut schützt die Seehunde vor dem Auskühlen im Wasser. Im Vergleich zu Landraubtieren haben Robben als weitere Anpassung an die kalte Umgebung eine kleine Körperoberfläche im Verhältnis zu ihrem Körpervolumen (Berta 2002). Die adulten männlichen Tiere werden 160 - 186 cm lang und 87 - 170 kg schwer, die Weibchen sind etwas kleiner, mit 148 - 169 cm und 65 - 142 kg. Weibliche Seehunde werden mit 3 - 4 Jahren geschlechtsreif und sind mit 6 - 7 Jahren ausgewachsen, Männchen hingegen erst mit 4 - 5 Jahren bzw. mit 7 - 9 Jahren. Die Lebenserwartung beider Geschlechter liegt bei bis zu 35 - 40 Jahren (Burns 2002). Die biologischen Kenngrößen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Biologische Kenngrößen des Seehunds *Phoca vitulina* (Burns 2002)

	Weiblicher Seehund	Männlicher Seehund
Körperlänge [cm]	148 - 169	160 - 186
Körpergewicht [kg]	65 - 142	87 - 170
Körperlänge Jungtier [cm]		82 - 98
Geburtsgewicht [kg]		10 - 19
Jährlingsgewicht [kg]		30 - 55
Tragezeit [Monate]	11 - 12	
Säugezeit [Wochen]	ca. 4	
Geschlechtsreife [Jahre]	3 - 4	4 - 5
Ausgewachsen [Jahre]	6 - 7	7 - 9
Lebenserwartung [Jahre]		35 - 40

Seehunde können in größeren Gruppen beobachtet werden. Diese Gruppen scheinen eher zufällig zu entstehen, dadurch dass einzelne Tiere die gleichen Sandbänke während ihrer Ruhezeiten nutzen. Diese Gruppen lassen keine soziale Struktur erkennen und es gibt keine ersichtlichen sozialen Interaktionen zwischen den einzelnen Seehunden (Burns 2002).

Die besonderen Zeiten in einem Seehundjahr sind in dem Seehundkalender in Abbildung 3 zusammengefasst (Adelung *et al.* 2007).



**Abbildung 3:** Seehundkalender nach Adelung *et al.*(2007)

Nach einer Tragezeit von etwa 11 Monaten kommen die Jungtiere im Juni bis Juli zur Welt. Seehunde gebären an Land und in der Regel nur ein Jungtier. Die Jungtiere der Seehunde sind weit entwickelt und direkt schwimmfähig mit einem sogleich wasserdichten Fell, welches demjenigen der adulten Tiere entspricht. Das Embryonalfell, Lanugo, wird schon im Uterus abgestreift und mit der Nachgeburt ausgestoßen. Dadurch sind die Seehundjungen in der Lage, innerhalb der ersten Stunde nach der Geburt sofort das Wasser aufzusuchen. Diese Anpassung ermöglicht es den Weibchen auch im periodisch trockenfallenden Wattenmeer der Nordsee ihre Jungen auf einer Sandbank zur Welt zu bringen.

Die mütterliche Zuwendung beschränkt sich auf das Säugen für etwa 4 Wochen. Die Milch der Seehunde ist sehr energiereich mit einem Fettanteil von 50 %, so dass die Jungtiere pro Tag mehr als ein halbes Kilogramm Gewicht zulegen. Das Junge wird ausschließlich an Land gesäugt, wohingegen das Muttertier die Hauptzeit damit verbringt, im Wasser auf Futtersuche zu gehen, um die energiereiche Milch produzieren zu können (Bowen 2002).

Seehunde sind, bezogen auf ihr Nahrungsspektrum, Generalisten und ihr Vorkommen ist an ein reiches Nahrungsangebot gebunden. Sie ernähren sich hauptsächlich von kleinen und mittleren Fischen, wie Hering, Dorsch, Seezunge, Seelachs, Grundeln und diversen Plattfischen, aber auch von Tintenfischen und Krabben. Die Hauptbestandteile der Nahrung variieren je nach Vorkommen der Nahrungsquellen in Abhängigkeit der geographischen Region wie auch der Jahreszeit (Andersen *et al.* 2007). Variationen im Nahrungsspektrum kommen auch aufgrund der individuellen Nahrungssuchestrategie und des jeweiligen Entwicklungsstadiums zustande. Jungtiere fressen eher pelagische Spezies wie Heringe und Tintenfische, da sie noch nicht so ausdauernd tauchen können, wohingegen die adulten Tiere überwiegend benthische Spezies bevorzugen (Bowen 2002).

Seehunde sind temporär standorttreu, d. h. sie haben einen oder einige wenige bevorzugte küstennahe Liegeplätze und kehren auch nach mehrtägigen Beutezügen in tiefere nahrungsreiche Gewässer zu diesen zurück. In der Regel tauchen sie steil bis zum Boden und suchen für mehrere Minuten den Untergrund nach Nahrung ab (Adelung *et al.* 2007).

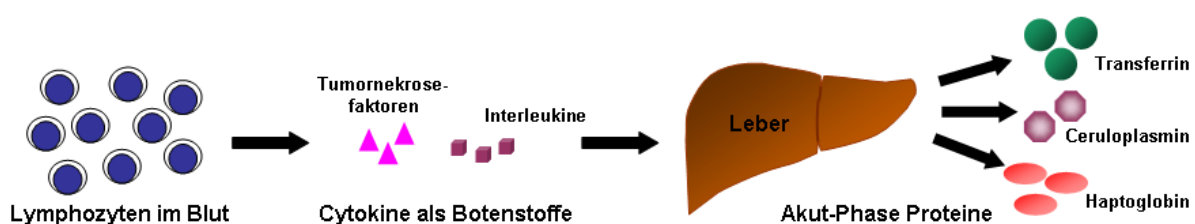
Seehunde sind sehr gut ans Tauchen angepasst, da sie die überwiegende Zeit unter Wasser verbringen und nur zum Luftholen auftauchen und vergleichsweise selten für periodische Ruhepausen das Wasser komplett verlassen. Seehunde tauchen nicht nur während der Futtersuche, sie verbringen die meiste Zeit tauchend und schlafen sogar unter Wasser. Als physiologische Anpassung haben Seehunde ein größeres Blutvolumen sowie einen höheren Myoglobingehalt in den Muskeln. Dadurch können sie mehr Sauerstoff pro Kilogramm Körpergewicht speichern als landlebende Säugetiere (Bowen 2002).

## 2.2. Biomarker und Akut-Phase-Proteine

Ein Biomarker ist ein Molekül, welches auf einen Effekt oder das Voranschreiten einer Erkrankung, eines Zustands oder einer Behandlung hinweist oder zum Bemessen dessen genutzt wird (Mischak *et al.* 2009). Damit können die molekularen Bestandteile des Immunsystems, die als Parameter zur Charakterisierung und Einschätzung des Gesundheitszustands herangezogen werden, auch als Biomarker bezeichnet werden.

Die angeborene unspezifische Immunantwort bei höheren Säugetieren ist unabhängig gegenüber der Art des „Angriffs“ und damit der schnelle erste Abwehrmechanismus des Körpers. Die unspezifische Immunantwort ist die entwicklungsgeschichtlich ältere Form der Verteidigung im Vergleich zur spezifischen Immunantwort. Sie ist zwischen den Tierarten hoch konserviert. Diese angeborene Immunität wird innerhalb von Stunden aktiviert.

Die erste Reaktion auf eine unbestimmte exogene oder endogene Irritation ist die Lymphozyten-Proliferation, bei der vermehrt Lymphozyten gebildet werden. Die Lymphozyten exprimieren Cytokine, wie Interferone, Interleukine und Tumornekrosefaktoren, welche als unspezifische Mediatoren wirken. Zum einen erweitern sie die Blutgefäße und erhöhen die Durchlässigkeit der Kapillarwände, zum anderen wirken sie auf die Leber als Botenstoff, wodurch die Hepatozyten angeregt werden Akut-Phase-Proteine (APP) zu bilden (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Zusammenspiel von Zellen, Proteinen und Organen bei der unspezifischen Immunantwort, die zur Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen führt



Die APP werden während der Akut-Phase-Reaktion (APR) ausgeschüttet, mit dem Ziel das verschobene Gleichgewicht wiederherzustellen und mikrobielles Wachstum zu hemmen (Murata *et al.* 2004). Die APR ist ein zentraler physiologischer, schnell reagierender Prozess beispielsweise während einer Entzündung, bei einem Trauma oder einer Infektion. Sie ist durch eine signifikante Konzentrationsänderung um mindestens 25 % der APP gekennzeichnet (Ceciliani *et al.* 2002).

Zu den APPs zählen unter anderem Proteine, wie C-reaktives-Protein (CRP), Serum-Amyloid-A, Haptoglobin (Hp), Ceruloplasmin und Transferrin. Die verschiedenen APPs reagieren unterschiedlich schnell (Gabay und Kushner 1999; Cray *et al.* 2009) und in unterschiedlicher Ausprägung, abhängig von der Tierspezies, auf die entsprechenden Auslöser (Kalmovarin *et al.* 1991; Eckersall 2000; Ceron *et al.* 2005). Daher ist es sinnvoll, mehrere APPs gemeinsam und in Zusammenhang mit anderen diagnostischen Parametern zu betrachten.

### **2.3. Das Eisentransportprotein Transferrin**

Eisen ist das quantitativ wichtigste Spurenelement bei Säugetieren. Es hat eine essentielle Funktion im Stoffwechsel von Säugetieren, da es sowohl als Elektronen-Donor als auch Elektronen-Akzeptor fungieren kann.

Diese Eigenschaft macht Eisen zu einem potenten Zentralatom verschiedenster Proteine im Stoffwechsel von Säugetieren. In der häufigsten Form kommt Fe als Häm vor. Hierbei ist ein Fe-Ion an ein Tetrapyrrolysystem, das so genannte Protoporphyrin, gebunden. Häm als die prosthetische Gruppe von Hämoglobin und Myoglobinen ist essentiell zum Sauerstofftransport und zur -speicherung. Ebenso ist es in der Atmungskette notwendig, vertreten in den Cytochromen. Darüber hinaus ist es unerlässlich als Co-Faktor vieler Enzyme wie z.B. Katalasen, Peroxidasen und Desaturasen. Im aktiven Zentrum weiterer Enzyme wie der Aconitase und Succinat-Dehydrogenase, beides Enzyme des Citratzyklus, ist Eisen in Fe-S-Clustern gebunden (Streuer 1999).

Die Fähigkeit des Eisens sowohl Elektronen abzugeben wie aufzunehmen kann bewirken, dass freies Eisen Elektronen an Sauerstoff überträgt und Superoxid-Anionen und Hydroxyl-Radikale entstehen. Daher ist Eisen nicht nur essentiell für alle Eukaryoten, sondern kann ebenfalls toxisch sein (De Domenico *et al.* 2008; Weinberg 2010).

Aus diesem Grund liegt Eisen in Säugetieren fast vollständig proteingebunden vor. Im humanen Organismus entfallen 66 % auf Hämoglobin, 6 % auf Myoglobin, 1 % auf Häm-Enzyme, 1 % auf Eisen-Schwefel-Cluster, die z.B. in der Atmungskette als Co-Faktoren fungieren. Die restlichen 26 % sind an das Eisenspeicherprotein Ferritin und das Eisentransportprotein Transferrin gebunden (Koolman und Röhm 2009).

Transferrin (Tf) ist ein etwa 80 kDa großes Protein, das bei allen Säugetierarten vorkommt. Es erfüllt zwei essentielle physiologische Aufgaben: Erstens bindet Tf sämtliches freies Eisen im Blut-Plasma und zweitens dient es dem Eisentransport im Blut. Verwandte Proteine, wie das Ovotransferrin in Vogeleiern und das Lactoferrin in Sekreten wie Speichel, Tränen und Milch von Säugetieren, dienen ebenfalls der Eisenbindung und dem Eisentransport. Die Proteine der Transferrin-Proteinfamilie halten die Konzentrationen an freiem Eisen in den Körperflüssigkeiten bei Werten unter  $10^{-10}$  mol/L, da höhere Eisenkonzentrationen toxisch sind. Freie Fe-Ionen katalysieren die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, also starken Oxidationsmitteln oder freien Radikalen, die Zellen zerstören, indem sie funktionelle Moleküle, wie Proteine, Lipide und DNA schädigen. Des Weiteren verhindert ein niedriger Spiegel an freiem Eisen die Vermehrung von pathogenen Bakterien und Pilzen, die Eisen als essentiellen Wachstumsfaktor benötigen (Kaim und Schwederski 2004; De Domenico *et al.* 2008; Koolman und Röhm 2009; Weinberg 2010).

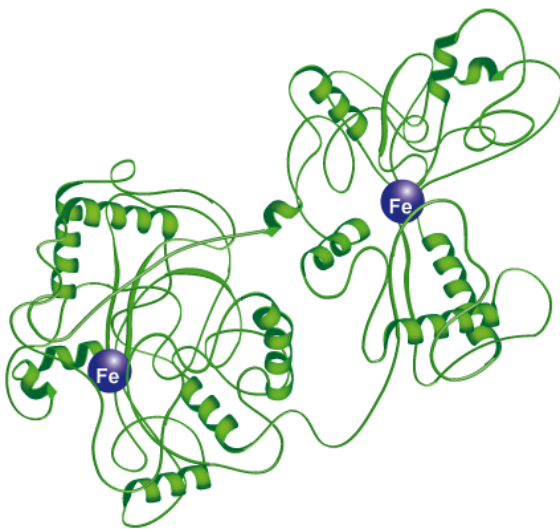
Die Kontrolle der Eisenmenge im Körper wird alleine durch die Eisenaufnahme und die Eisenspeicherung reguliert, da es keine gesteuerten Ausscheidungsprozesse für Eisen gibt. Die Eisenaufnahme aus der Nahrung erfolgt im Darm über hoch regulierte Transportmechanismen durch Zellmembranen bis es schließlich ins Blut-Plasma gelangt. In gesunden Organismen wird nur der notwendige Anteil an Eisen aus der Nahrung aufgenommen, der überwiegende Teil des Eisenbedarfs wird beim Abbau der gealterten Erythrozyten von Makrophagen durch Recycling des Häms gedeckt (De Domenico *et al.* 2008).

Dadurch, dass Fe nicht aktiv ausgeschieden werden kann, ist es bei einer Entzündung oder Infektion notwendig, den Level an Fe im Plasma zu senken. Dies erfolgt durch das Herabsetzen der Fe-Aufnahme und durch die Erhöhung der Eiseneinlagerung in Gewebe wie Leber und Milz. Dadurch zirkuliert weniger Fe im Plasma und es wird weniger Tf benötigt. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Konzentrationsabsenkung des Tfs im Blutplasma während einer Akut-Phase-Reaktion (APR), also z.B. einer Entzündungsreaktion. Das Tf würde damit als negatives APP eingestuft werden.

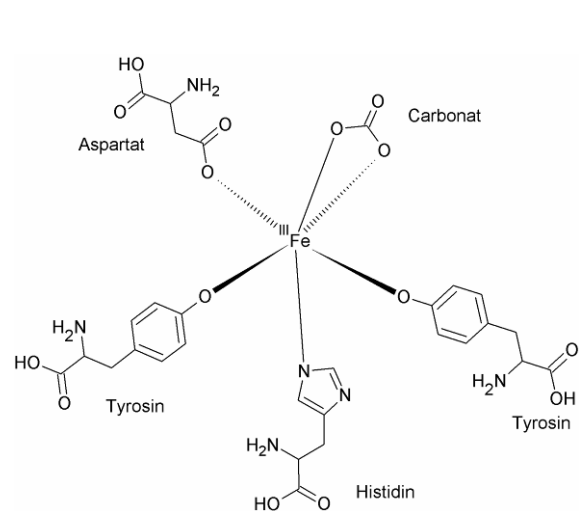
Andererseits würde die Tatsache, dass Tf durch die Komplexierung des freien Eisens antimikrobiell wirkt (Murata *et al.* 2004; Weinberg 2010), für eine Erhöhung der Tf-Konzentration während einer APR sprechen, also für die Reaktion von Tf als positives APP. Durch die Erhöhung von Tf im Plasma kann mehr Eisen gebunden werden und steht so nicht für einzellige Pathogene zur Verfügung. Fakt ist, dass Tf abhängig von der jeweiligen Tierspezies entweder als negatives oder positives APP reagiert (Kalmovarin *et al.* 1991; Ceciliani *et al.* 2002; Murata *et al.* 2004; Ceron *et al.* 2005; Gruys *et al.* 2005; Cray *et al.* 2009).

Transferrin ist ein monomeres Protein bestehend aus zwei gleichartigen Domänen, die jeweils eine Bindungsstelle für ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion beinhalten. Tf bindet reversibel zwei Eisen-Ionen pro Tf-Molekül kooperativ mit jeweils einem  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ion. Fe wird von Tf komplexiert, wobei das Fe-Ion von vier Aminosäure-Resten (Asp, Tyr, His, Tyr) und dem Carbonat-Ion koordiniert wird (Sun *et al.* 1997; MacGillivray *et al.* 1998; Adams *et al.* 2003; Byrne *et al.* 2010). Diese Bindung von Eisen an Tf ist sehr stabil. In der Literatur wird für den humanen Fe-Tf-Komplex eine Dissoziationskonstante von  $10^{-19}$  -  $10^{-23}$  M bei neutralem pH angegeben (El Hage Chahine und Pakdaman 1995; Crichton *et al.* 2002; Kaim und Schwederski 2004; del Castillo Busto *et al.* 2006; De Domenico *et al.* 2008; Byrne *et al.* 2010).

Die Struktur von Tf ist zwischen den verschiedenen Tierspezies konserviert, da Tf eine essentielle Rolle im Stoffwechsel spielt. Eine schematische Illustration der Zwei-Domänen-Struktur von Tf mit jeweils einem gebundenen Fe-Ion ist in Abbildung 5 dargestellt. In Abbildung 6 ist die Komplexbildung des  $\text{Fe}^{3+}$ -Ions im Fe-Tf-Komplex durch vier Aminosäure-Reste und das kooperativ gebundene  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ion skizziert.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung von Säugetier-Transferrin mit zwei gebundenen Fe-Ionen



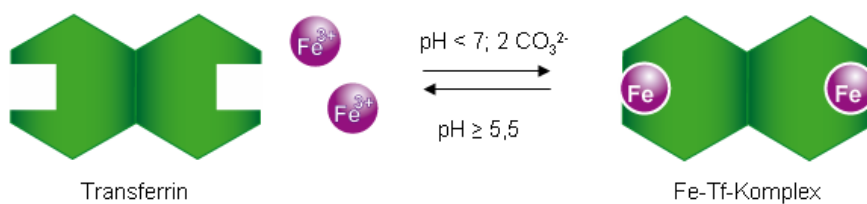
**Abbildung 6:** Komplexbildung des  $\text{Fe}^{3+}$ -Ions im Fe-Tf-Komplex durch vier Aminosäure-Reste (Asp, Tyr, His, Tyr) und das kooperativ gebundene  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ion

Transferrin transportiert das Fe zu den Zellen, die Eisen für ihre Funktion benötigen. Dies sind in erster Linie alle teilungsfähigen Zellen und die unreifen Erythrozyten, die Retikulozyten. Diese Zellen haben auf ihrer Oberfläche den Transferrin-Rezeptor-1 (TfR1) exprimiert. Bei einem Eisenüberschuss wird überzähliges Fe vorherrschend in die Leber zur Speicherung transportiert. Auf den Oberflächen der Leberzellen ist der TfR2 vorhanden. Dieser TfR2 bindet den Fe-Tf-Komplex mit einer viel geringeren Affinität als TfR1 (De Domenico *et al.* 2008).

Die Eisenbindung und der Transport von Eisen durch Transferrin stellt sich im Organismus als ein Zyklus dar, bei dem das Tf üblicherweise mehr als 100mal recycelt wird (Crichton *et al.*

al. 2002). Die Eisenbindung durch das leere Tf (*apo*-Tf) erfolgt bei einem neutralen bis leicht basischen pH-Wert von 7,4 im Plasma. Der so entstandene Fe-Tf-Komplex (*holo*-Tf) bindet an die TfR. *Holo*-Tf bindet mit einer viel höheren Affinität an den Rezeptor als Tf, welches nur mit einem Fe-Ion beladen ist. Der *holo*-Tf-TfR-Komplex wird mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose durch mit Clathrin umhüllte Vesikel in die entsprechende Zelle aufgenommen. Diese Vesikel werden angesäuert und bei einem pH-Wert unter 5,5 wird eine Konformationsänderung des Tfs und des Tf-Rezeptors induziert, die bewirkt, dass das Fe aus dem Tf-TfR-Komplex entlassen wird. Der *apo*-Tf-TfR-Komplex wird nun wieder vollständig mit dem Vesikel zurück zur Zellmembran transportiert. Wenn sich das Vesikel in die Zellmembran integriert und nach außen in das neutrale Medium hin öffnet, wird das *apo*-Tf vom Rezeptor gelöst und der Zyklus kann von Neuem beginnen (El Hage Chahine und Pakdaman 1995; Crichton *et al.* 2002; De Domenico *et al.* 2008; Grant und Donaldson 2009).

Durch die unterschiedlichen Anforderungen an den pH-Wert für die Eisenbindung und Eisensfreigabe aus dem Fe-Tf-Komplex lässt sich die Eisensättigung von Tf sehr gut *in vitro* nachstellen. Die erforderlichen Bedingungen der reversiblen Eisenbindung durch Tf sind schematisch in Abbildung 7 zusammengefasst.



**Abbildung 7:** Reaktionsbedingungen für die Sättigung von Tf mit Eisenionen

Die Eisensättigung von humanem Tf liegt bei etwa 20 - 30% (del Castillo Busto *et al.* 2006; De Domenico *et al.* 2008; del Castillo Busto *et al.* 2010). Für verschiedene Tierspezies existiert ein breiter Bereich für die Tf-Sättigung. Einige Werte aus der Literatur für Verwandte des Seehundes werden im Folgenden aufgeführt. Für die Tf-Sättigung von Hunden (*Canis familiaris*) wird ein Referenzbereich von 25 - 52 % angegeben (Marchetti *et al.* 2010). Für marine Säugetiere wurden vereinzelte Studien durchgeführt. Fair *et al.* (2006) ermittelten für Große Tümmler (*Tursiops truncatus*) aus dem Mündungsgebiet des Charlston in Kanada einen Bereich von 42 - 49 %. Für Nördliche Seebären (*Callorhinus ursinus*) aus dem Mystic Aquarium in der USA wurde für die weiblichen Tiere ein Tf-Sättigung von  $36 \pm 9,3$  % und für die Männchen von  $56 \pm 16,5$  % bestimmt (Mazzaro *et al.* 2004). Für sieben weibliche Seelöwen (*Eumetopias jubatus*) aus dem Vancouver Aquarium in Kanada ergibt sich aus dem Eisenstatus ein Mittelwert von 32 % Tf-Sättigung (Kumagai 2004). Eine Studie mit 13 wildlebenden weiblichen Seehunden aus Kanada ergab eine Tf-Sättigung von  $68,9 \pm 6,4$  % (Burns *et al.* 2004).

Transferrin wird ebenso wie die anderen APP hauptsächlich in der Leber in den metabolisch aktiven Hepatozyten gebildet und als Glykoprotein in das Plasma sezerniert (Crichton *et al.* 2002; Murata *et al.* 2004; Ceron *et al.* 2005). Tf ist ein höher abundantes Plasmaprotein mit einer Konzentration von etwa 2 - 3 g/L. Del Castillo Busto *et al.* (2006) haben für Serum-Proben von zehn gesunden Menschen einen Bereich von 1,5 - 4,0 g/L Tf gemessen. In einigen wenigen Studien über marine Säugetiere wurde die Gesamteisenbindungskapazität (*total iron binding capacity*, TIBC) als indirekter Parameter für die Tf-Konzentration colorimetrisch bestimmt. Einzig Burns *et al.* (2004) untersuchten 13 wildlebende adulte weibliche Seehunde auf ihren Eisenstatus. Für diese adulten Weibchen wurde ein Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für TIBC von  $64,9 \pm 7,9 \mu\text{mol/L}$  bestimmt. Diese Eisenkonzentration entspricht etwa einer Tf-Konzentration von  $2,6 \pm 0,3 \text{ g/L}$ .

#### **2.4. Molekülspezifische Methoden in der Proteinanalytik**

Das Proteom ist als die Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt und/oder bestimmten Bedingungen definiert (Rehm 2006, S. 204ff). Bei der Proteomanalytik steht das Gesamt-Proteinmuster im Fokus. Allerdings ändert sich die Proteinzusammensetzung der verschiedenen Gewebe und des Bluts mit der Zeit, sie ist abhängig vom Geschlecht, dem Alter und der Nahrung. Daher ist es nicht unkompliziert, Proteinmuster als diagnostisches Mittel zu verwenden. Zudem sind die Möglichkeiten der Detektion und Quantifizierung von Proteinspots z. B. bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese limitiert.

Viel versprechender ist der Ansatz, einzelne Proteine genauer zu charakterisieren und entsprechende Quantifizierungsmethoden zu entwickeln, damit ein Set an Indikatorproteinen für diagnostische Untersuchungen bereitstellen werden kann.

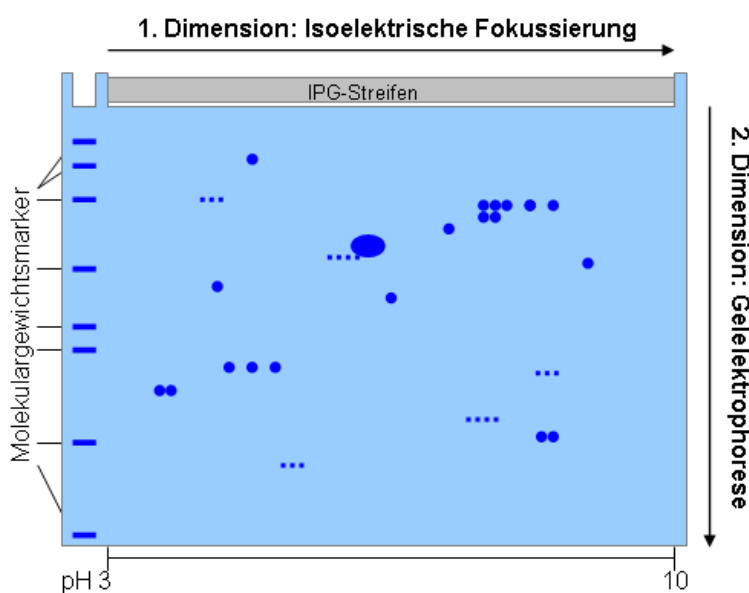
Die Identifizierung von Proteinen kann mit massenspektrometrischen Techniken erfolgen. Für einen zweifelsfreien Nachweis von Proteinen werden diese enzymatisch in spezifische Peptide gespalten. Für jedes Protein entsteht dadurch ein einmaliger Peptid-Massen-Fingerabdruck (PMF). Ein mathematischer Algorithmus gleicht die gemessenen Peptidmassen mit den in einer Datenbank von *in silico* verdauten Proteinen hinterlegten Peptidmassen ab. Die Proteinidentifizierung über einen PMF setzt voraus, dass die Proteine in höchstem Maße aufgereinigt vorliegen (Aebersold und Goodlett 2001). Eine sehr gute Proteinseparation eines komplexen Gemischs lässt sich mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese erreichen. Daher ist eine Kombination aus dieser Aufreinigung mit anschließender enzymatischer Spaltung in Peptide und der massenspektrometrischen Analyse eine der häufigsten Arbeitsabläufe in der Proteomics. Ein zweiter Weg ist die Kombination aus teilweiser Proteinaufreinigung und anschließender Tandem-MS (Aebersold

und Mann 2003), also der Fragmentierung der spezifischen Peptide, so dass die Peptidsequenz bestimmt werden kann.

In dieser Arbeit wurden zur Identifizierung und Charakterisierung von Tf aus Seehund-Blutproben beide Wege parallel eingeschlagen. Zum einen wurden die Proteine über Gelelektrophorese aufgereinigt und nach einem enzymatischen Verdau mit MALDI-MS PMF-Spektren generiert und zum anderen wurden ebendiese Peptide mit ESI-MS/MS analysiert. Im Folgenden werden die Grundlagen der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der verwendeten massenspektrometrischen Methoden kurz beschrieben.

### 2.4.1. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Kombination aus zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-GE) und molekularer MS ist die meist verwendete Methodik in der Proteomanalytik. Abhängig von der Größe der Gele und der verwendeten immobilisierten pH-Gradienten (IPG) können in der Routineanalytik simultan etwa 2000 Proteine aufgetrennt und ein Proteingehalt von  $< 1$  ng pro Spot detektiert werden (Görg *et al.* 2004). Damit ist die 2D-Gelelektrophorese eine ideale Methode zur Isolierung von Proteinen aus komplexen biologischen Matrices wie kompletten Zelllysaten, Gewebeextrakten oder Blutproben. Die 2D-GE liefert ein komplexes Bild der intakten Proteine in Bezug auf ihren isoelektrischen Punkt (pI), ihr Molekulargewicht (*molecular weight*, MW) und relative Menge (Abbildung 8). Eine der großen Vorteile liegt darin, dass auch Proteine mit posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen, dabei als intaktes Protein dargestellt werden.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der 2D-Gelelektrophorese

Bei der 2D-GE werden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem  $pI$  aufgetrennt. Dazu werden Gelstreifen mit einem pH-Gradienten verwendet, der durch den Einsatz von Gradienten aus puffernden Ampholyten im Gel immobilisiert wurde (Westermeier *et al.* 2008, S. 44ff). Diese IPG-Streifen sind in einem pH-Bereich von 2,5 - 12 erhältlich (Görg *et al.* 2004). Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung migrieren die Proteine entlang des im Gelstreifen immobilisierten pH-Gradienten bis zu ihrem individuellen  $pI$ . Dieser Gelstreifen mit den nach der 1. Dimension aufgetrennten Proteinen wird in die Probentasche des Gels fixiert. Durch erneutes Anlegen einer elektrischen Spannung werden die Proteine nun in der 2. Dimension nach ihrer Größe separiert (Abbildung 8). Proteine mit einer Molekülmasse zwischen 15 - 150 kDa können ohne Probleme aufgetrennt werden. Durch die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) erfolgt die Auftrennung der Proteine ausschließlich nach ihrer Größe. Das SDS bindet an die Proteine. Diese werden dabei denaturiert und erhalten eine multiple negative Ladung, welche die Löslichkeit der Proteine erhöht und bewirkt, dass das Ladungs- zu Masse-Verhältnis aller Proteine gleich ist. Nach der Trennung enthalten die Proteinspots die intakten Proteine, welche durch einfaches Ausschneiden isoliert werden können und somit zur weiteren Charakterisierung über molekulspezifische Massenspektrometrie zur Verfügung stehen.

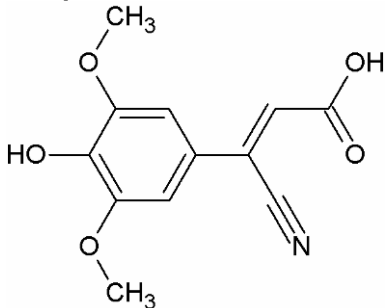
#### 2.4.2. MALDI-TOF-MS

Massenspektrometer (MS) bestehen aus einer Ionen-Quelle, welche die Analyte ionisiert und in die Gasphase überführt, dem Massen-Analysator, in dem die ionisierten Analyte nach ihrem Verhältnis aus Masse zu Ladung ( $m/z$ ) getrennt werden und einem Detektor, der die Anzahl der Ionen zu jedem  $m/z$  Wert ermittelt (Aebersold und Mann 2003).

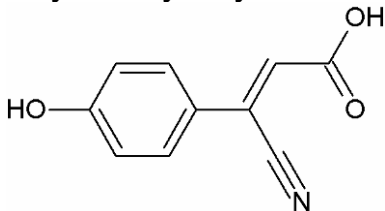
Die Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (*matrix-assisted laser desorption/ionisation*, MALDI)-MS ist eine sehr häufig eingesetzte Methode in der Protein-Analytik, mit einer schnellen und einfachen Probenpräparation und Aufwendung einer nur geringen Probenmenge. Bei der MALDI-MS werden die Analyten in eine UV-absorbierende Matrix eingebettet. In Abbildung 9 sind die Strukturen der in dieser Arbeit als MALDI-Matrices verwendeten Sinapinsäure und  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamsäure ( *$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*, HCCA) dargestellt. Die Ionisierung bei der MALDI-MS erfolgt durch einen Laserbeschuss auf den Kokristall aus Matrix und Analyt. Wie die Ionisierung im Einzelnen verläuft ist bislang ungeklärt. Vermutet wird, dass die Laserenergie auf die Matrixmoleküle durch resonante elektronische Anregung des  $\pi$ -Elektronensystems übertragen wird. Dadurch wird wahrscheinlich die Kristallstruktur derart gestört, dass es zu einer explosiven Ausdehnung kommt, die Matrix-Moleküle werden desorbiert und die eingebetteten Analyten werden mitgerissen (Abbildung 10). Die Ionisierung der zu analysierenden Proteine oder Peptide erfolgt dann wahrscheinlich durch Protonentransfer von der Matrix (Bahr *et al.* 1994;

Lottspeich 2006, S. 330ff). Durch die Kokristallisation der Proteine oder Peptide mit der Matrix wird die Laserenergie nicht direkt von den Analyt-Molekülen aufgenommen, was Fragmentierungen hemmt. Die Protonenübertragung liefert überwiegend einfach geladenen Analyt-Ionen ( $M+H^+$ ) und bei größeren Molekülen auch in geringerem Maß zweifach und dreifach positiv geladene Analytmoleküle (Bahr *et al.* 1994; Rehm 2006, S. 236ff).

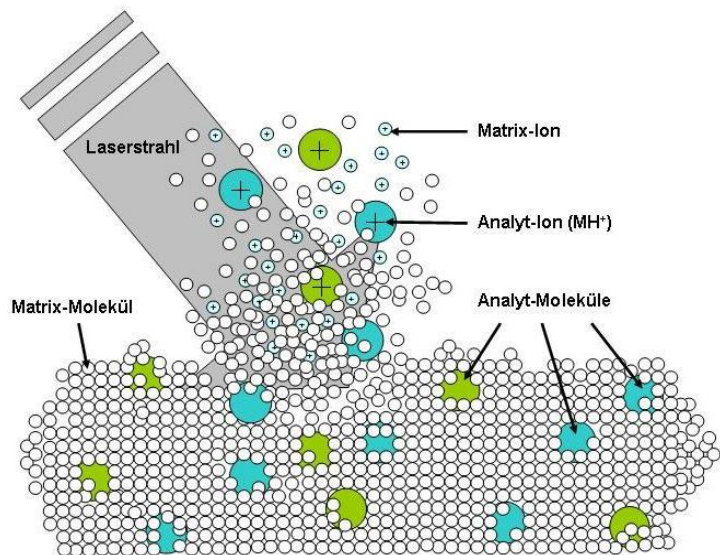
#### Sinapinsäure



#### $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure



**Abbildung 9:** Strukturen der MALDI-Matrix Sinapinsäure und  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (Rehm 2006, S. 240)



**Abbildung 10:** Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (nach Lottspeich 2006, S.332)

Die gebildeten Ionen werden durch eine angelegte Spannung beschleunigt und gelangen in einen feldfreien Driftraum des Massenspektrometers. Das Flugzeitmassenspektrometer (*time of flight*, TOF) detektiert die Flugzeit der Analytione im Vergleich zu einem Standard. Ionen mit hoher Masse benötigen eine längere Zeitspanne bis zum Detektor als Ionen mit leichterer Masse. Das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) ist dabei proportional zum Quadrat der Zeit (Gleichung 1) (Lottspeich 2006).

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

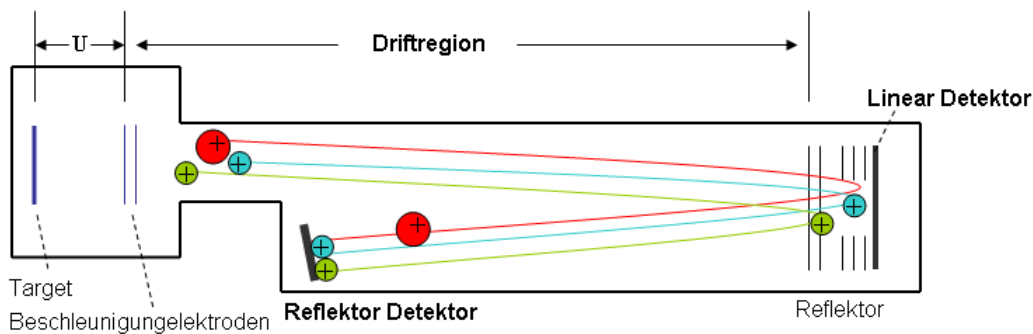
**Gleichung 1**

mit der Masse des Ions ( $m$ ), der Ladung des Ions ( $z$ ), der Elementarladung ( $e$ ), der Beschleunigungsspannung ( $U$ ), der Flugstrecke ( $L$ ) und der Flugzeit ( $t$ ).

Je länger die Flugstrecke ist, desto größer werden die Abstände der Ionen unterschiedlicher Masse. So verbessert sich die Auflösung eines TOF-MS durch die Verwendung eines Reflektor-Flugrohrs im Vergleich zu einem linearen Flugrohr, denn die Flugstrecke verlängert sich und zusätzlich werden kleinste Unterschiede in den Flugzeiten der Ionen mit gleicher Masse kompensiert und diese mit einer höheren Genauigkeit auf den Detektor fokussiert.

In Abbildung 11 ist ein Flugrohr des verwendeten MALDI-TOF-MS mit linearem Detektor und Reflektor-Detektor schematisch dargestellt.



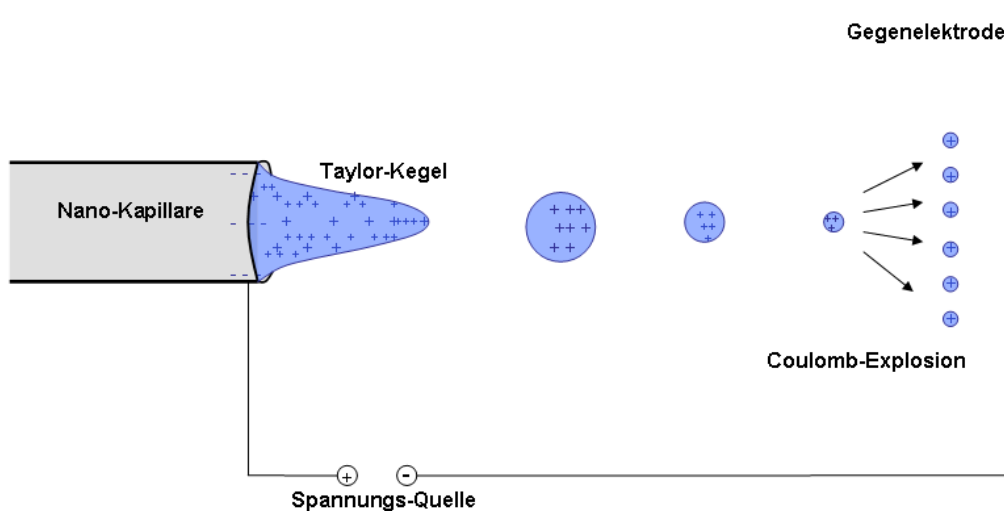


**Abbildung 11:** Flugrohr eines Flugzeitmassenspektrometers

Das Auflösungsvermögen des TOF-Analysators wird durch den Reflektor-Modus erhöht. Die Ionen treten durch die Beschleunigungselektroden in den feldfreien Driftraum ein, wobei die Ionen mit höherer Masse (rot) langsamer fliegen und länger für den Weg zum Detektor benötigen, als die leichteren Ionen (blau, grün). Ionen mit gleicher Masse (blau und grün) aber unterschiedlichen Energien, weisen geringe Flugzeitunterschiede auf. Diese Unterschiede können durch den Reflektor kompensiert werden. Die Ionen mit leicht höherer Energie (blau) treten tiefer in den Reflektor ein und legen damit eine etwas weitere Strecke zurück als die Ionen mit geringerer Energie (grün) und kommen schlussendlich zur selben Zeit am Reflektor-Detektor an (Lottspeich 2006).

### 2.4.3. ESI-MS und ESI-MS/MS

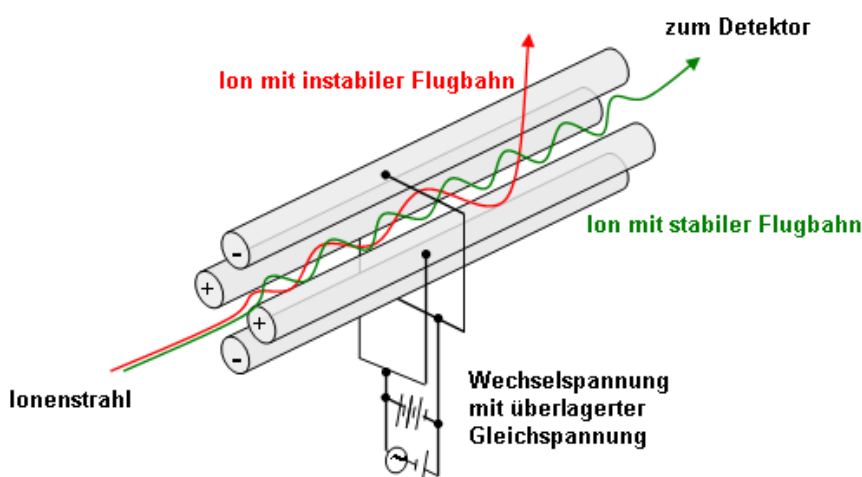
Die Ionisierung durch einen Elektrospray (*electrospray ionisation*, ESI) ist eine milde Ionisierungstechnik, die es ermöglicht, große Moleküle aus einer Lösung in die Gasphase zu überführen, zu ionisieren und zu analysieren. Sie ist ideal dazu geeignet Proteine und Peptide zu untersuchen. In Abbildung 12 ist diese Ionenquelle mit einer Nano-Kapillare skizziert.



**Abbildung 12:** Elektrospray-Ionenquelle (nach Lottspeich 2006; Rehm 2006)

Die Probenlösung wird bei Atmosphärendruck aus einer dünnen Kapillare, bei einer nano-Kapillare mit einer Öffnung von 1 - 2  $\mu\text{m}$ , in ein starkes elektrisches Feld versprüht. Die an der Kapillarspitze und einer Gegenelektrode angelegte Spannung ist verantwortlich für die schnelle und feine Zerstäubung der aus der Kapillare austretenden Lösung und für die effektive Ionisierung der Moleküle. An der Kapillarwand kommt es zur teilweisen Entladung, so dass überwiegend positive Ionen verbleiben und zur Gegenelektrode gezogen werden. Es bildet sich ein Flüssigkeitskegel aus, der Taylor-Kegel. Zur Unterstützung der Vernebelung wird bei der ESI ein Stickstoffstrom entlang der Kapillare eingesetzt, der bei der Nano-Kapillare jedoch nicht benötigt wird, da die Flussraten mit 5 - 100 nL/min deutlich geringer sind. Die gebildeten Tröpfchen verkleinern sich durch ständiges Verdampfen des Lösungsmittels. Dadurch erhöht sich die Ladungsdichte der Tröpfchen bis zu einem Grenzwert, dem Raleigh-Limit und es kommt in der Folge zur Coulomb-Explosion. Dieser Vorgang kann sich mehrmals wiederholen, immer wenn die elektrostatische Abstoßung der Ionen größer wird als die Oberflächenspannung des Flüssigkeitströpfchens, wodurch aus den Analyt-Molekülen schließlich einzelne Ionen entstehen. Die Moleküle sind jedoch nicht selbst geladen, sondern erhalten ihre ionisierte Form durch Anlagerung kleiner Ionen wie  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ . Bei dieser Ionisierungstechnik kommt es kaum zur Bildung von Fragment-Ionen, allerdings werden die Moleküle, abhängig von ihrer Aminosäurestruktur, häufig mehrfach geladen. Die generierten Ionen werden durch eine Öffnung im Zentrum der Gegenelektrode in den Analysator des Massenspektrometers überführt (Fenn 2002; Budzikiewicz und Schäfer 2005; Lottspeich 2006; Rehm 2006).

Der Analysorteil des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometers, ein Quadrupol-Analysator, ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.



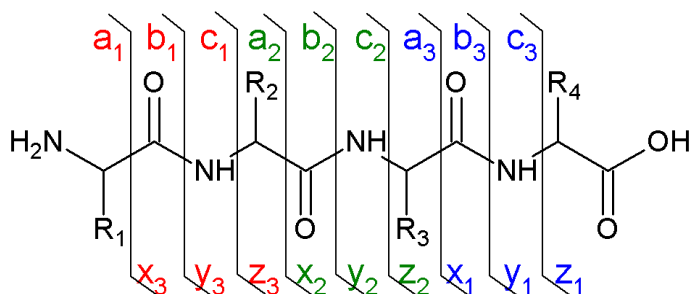
**Abbildung 13:** Schematische Skizze eines Quadrupol-Analysators (nach Niessen 1999)

Ein Quadrupol ist aus vier Metallstäben, die kreuzweise miteinander leitend verbunden sind, aufgebaut. Dadurch entstehen zwei Paare von Stäben. An den gegenüberliegenden Stäben liegt jeweils eine Wechselspannung an, die abwechselnd positive und negative Felder

aufbaut. Diese Wechselspannung ist von einem Paar zum anderen um eine halbe Amplitude verschoben. Die Wechselspannung wird zusätzlich bei einem Paar mit einer positiven Gleichspannung, bei dem anderen Paar mit einer negativen Gleichspannung überlagert (Budzikiewicz und Schäfer 2005; Lottspeich 2006). Die in den Analysator eintretenden Ionen erfahren durch die alternierenden elektrischen Felder eine Beschleunigung, die sie durch den Quadrupol steuert. Er ist ein Massenfilter, der nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis durch die kombinierte Wechsel- und Gleichspannung oszillierend zum Detektor leitet (Abbildung 13). Welche Ionen Resonanz zeigen und welche Ionen nicht resonant sind, wird durch eine geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechselspannung festgelegt. Die nicht resonanten Ionen werden derart abgelenkt, dass sie entweder mit den Elektroden kollidieren oder aus dem Analysator hinaus katapultiert werden.

Bei dem eingesetzten ESI-MS handelt es sich um ein Tripel-Quadrupol System, wobei der letzte Quadrupol als eine lineare Ionenfalle (*iontrap*) ausgebildet ist (lineare QTrap). Durch die Kombination aus drei hintereinander geschalteten Quadrupolen sind ESI-MS/MS Experimente möglich. Für Sequenzinformationen über Peptide der zu identifizierenden Proteine können unter niederenergetischen Stoßbedingungen die Peptidbindungen entlang der Aminosäurekette gespalten werden (Lottspeich 2006, S. 346ff).

Die Detektion der Peptidionen erfolgt im ersten Quadrupol, ebenso die Auswahl der Mutter-Ionen (*Precursor-Ionen*). Diese Mutter-Ionen werden im zweiten Quadrupol durch Kollision mit einem Kollisionsgas (z.B.  $N_2$ , He oder Ar) in Tochter-Ionen fragmentiert (*collision induced dissociation*, CID). Über den dritten Quadrupol erfolgt schließlich die Detektion der Fragmentspektren. Ein Peptid wird in ein N-terminales (a-, b-, c-Ion) und ein C-terminales (x-, y-, z-Ion) Fragment gespalten, die Fragmentierung kann an verschiedenen Positionen im Protein bzw. Peptid erfolgen, dadurch entstehen verschiedene Arten von Fragmenten. In Abbildung 14 sind die möglichen Fragmentserien entlang der Aminosäurekette mit der gebräuchlichen Nomenklatur dargestellt.

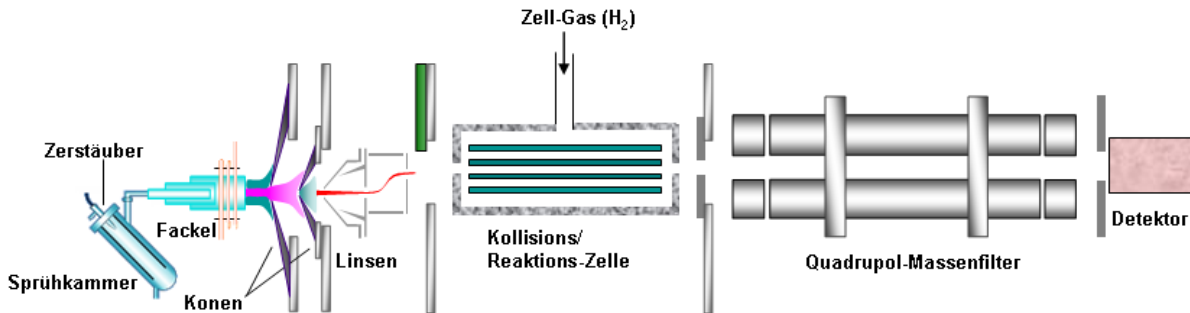


**Abbildung 14:** Fragmentierung eines Peptids, Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlman (1984)

Die Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren bricht bei der Niedrigenergie-CID am häufigsten, so dass vorherrschend die y- und b-Ionen gebildet bzw. detektiert werden (Link und LaBear 2010).

## 2.5. Eisenspezifische Detektion mit ICP-MS

Die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (*inductive coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) ist eine elementspezifische Analysetechnik mit einer Hochtemperatur-Ionenquelle. Der Aufbau eines ICP-MS (7500cs Agilent) mit Kollisions-/Reaktions-Zelle ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung einer ICP-MS mit Kollisions-/Reaktions-Zelle

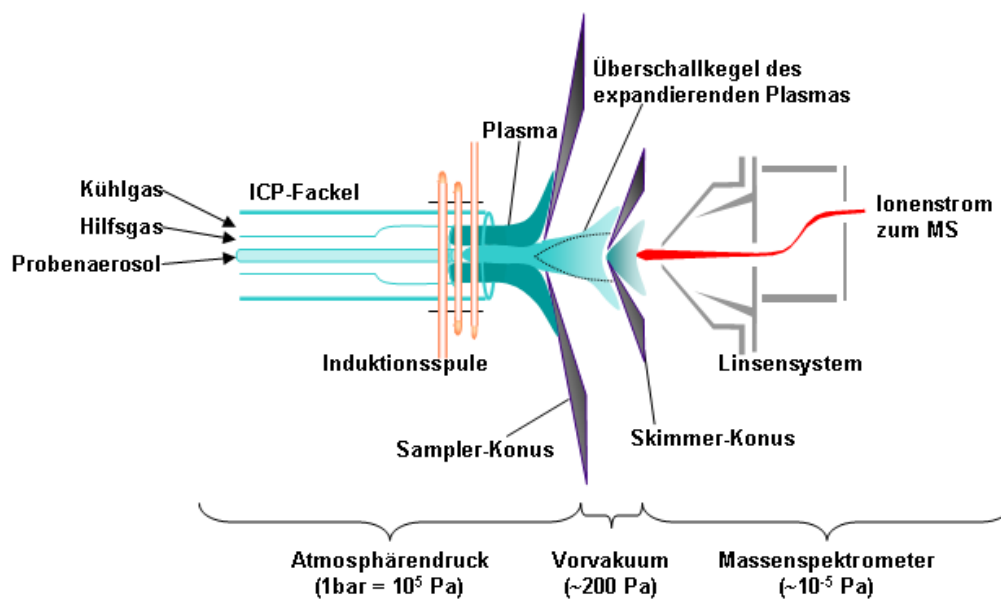
Als Ionenquelle wird ein Argon-Plasma verwendet, welches in einer Quarz-Fackel durch eine Induktionsspule angeregt wird (Abbildung 15). Dieses Plasma erzeugt einen Ionenstrom, der durch einen weiteren Argonstrom zu den Konen transportiert wird. Dort wird der Ionenstrahl gebündelt und von dem sich anschließenden Linsensystem fokussiert. Die in der Regel einfach positiv geladenen Element-Ionen werden mittels eines Quadrupol Massenfilters nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennt und über einen Detektor erfasst.

Der Zerstäuber generiert aus der Analyt-Lösung ein Proben-aerosol, das mit dem Argon-Gasfluss in die Sprühkammer eingetragen wird. In dieser werden die größeren Tropfen separiert, indem sie an der gekühlten Sprühkammerwandung kondensieren und abfließen. So gelangen nur die kleinsten Tropfen mit einem Durchmesser unter  $10\ \mu\text{m}$  in die Plasmaregion. Die kleinen Tropfen benötigen zur Desolvation weniger Plasmaenergie, daher ist das Plasma stabiler und die bestandteile der Probenmatrix können besser atomisiert werden. Es ergeben sich eine erhöhte Ionisierungsrate sowie eine Minimierung von wasserbasierten polyatomaren Interferenzen.

Das Plasma ist ein leitfähiges Gas, das aus Molekülen, Atomen, Ionen, Radikalen und freien Elektronen besteht. Es ist der Zustand der Materie, in dem die Atome in die entsprechenden Kationen und Elektronen dissoziiert sind. Der Plasmazustand wird auch als vierter Aggregatzustand bezeichnet (Pfeifer 2010, S. 6).

Das Plasma wird in einer Fackel erzeugt, welche aus drei konzentrischen Quarzröhren besteht, deren offenes Ende von einer Induktionsspule, der Tesla-Spule, umgeben ist. Die Induktionsspule wird vom Hochfrequenzgenerator mit einer Energie von  $600 - 1600\ \text{W}$  gespeist und erzeugt ein elektromagnetisches Feld. Freie Elektronen werden in diesem elektromagnetischen Feld beschleunigt und durch Zusammenstöße mit dem Plasmagas

werden Elektronen aus den Ar-Molekülen herausgelöst. Die durch diese Elektronenstoßionisierung (EI) generierten freien Elektronen besitzen ebenfalls eine hohe kinetische Energie und die Kollision der freien Elektronen mit dem Plasma- und Analyt-Molekülen resultiert in einer Kaskade von neu erzeugten freien Elektronen und einfach positiv geladenen Argon- und Analytionen, so dass ein kontinuierliches Plasma entsteht (Turner und Montaser 1998). Die Ionisierung der Analyt-Moleküle kann aber unter anderem auch durch einen Ladungstransfer der  $\text{Ar}^+$ -Ionen erfolgen. Detailliertere Ausführungen zu den Anregungs- und Ionisierungs-Prozessen im Plasma können bei Becker (2007, S. 30f) nachgelesen werden.



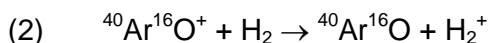
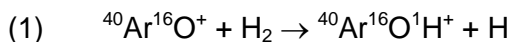
**Abbildung 16:** Schematische Aufbau einer ICP-Plasmafackel mit Interface und Ionenoptik

Das Probenaeosol wird von einem Argonstrom mit etwa  $1 \text{ mL/min}$  durch die innere Glasröhre der Fackel, die direkt mit der Sprühkammer verbunden ist, ins Plasma geleitet (Abbildung 16). Im mittleren Ring der Glasröhren wird zur Unterstützung des Probenverkehrs durch das Plasma ein Hilfsgasfluss von ebenfalls  $1 \text{ mL/min}$  Argon eingeführt und durch die äußere Glasröhre wird ein Argonstrom von  $15 \text{ mL/min}$  zur Kühlung der Glasfackel gepresst. Argon ist das bevorzugte Plasmagas, da es ein hohes erstes Ionisierungspotential ( $15,76 \text{ eV}$ ) hat. Dieses ist höher als das erste Ionisierungspotential der meisten anderen Elemente, aber immer noch niedriger als deren zweites Ionisierungspotential. Als Konsequenz sind die meisten Analytionen, die in einem Argonplasma erzeugt werden, einfach positiv geladen. Das Plasma wird bei Atmosphärendruck erzeugt, wobei das Massenspektrometer bei einem Vakuum von  $10^{-5} \text{ Pa}$  arbeitet. Dies macht eine Schnittstelle, das Interface, notwendig, welches diesen Übergang vermitteln und das Vakuum im MS aufrechterhalten kann. Dazu strömen die gebildeten Ionen durch eine  $1 \text{ mm}$  große Öffnung in dem Sample-Konus in ein Vorvakuum von etwa  $200 \text{ Pa}$  und schließlich durch den

Skimmer-Konus durch das Linsensystem und weiter in die Kollisions-/Reaktionszelle. Der Übergang vom Atmosphärendruck zum Vorvakuum bedingt eine schlagartige Expansion des Plasmas und einer gerichteten Bewegung der Ionen durch den zweiten Konus zu den elektrostatischen Linsen der Ionenoptik. An diesen vier Linsen liegt jeweils eine unterschiedliche Spannung an, die für das entsprechende Analyt-Ion optimiert werden kann. Die vorfokussierten Ionen werden durch das Linsensystem zu einem Ionenstrahl gebündelt, wobei die Ionen von den Neutralteilchen, Elektronen und Photonen getrennt, der Ionenstrahl fokussiert und die Ionen zum Massenanalysator beschleunigt werden.

Bei einigen Elementmassen kann es zu Interferenzen durch kleine Molekül-Ionen, doppelt geladene Ionen oder Oxide der Elemente kommen. Die Detektion der Masse 56 des Hauptisotops von Fe ( $^{56}\text{Fe}$  91,7 %) kann beispielsweise durch  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  oder  $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$  Molekül-Interferenzen (Vanhaecke und Köllensperger 2003),  $^{54}\text{Fe}$  (5,845 %) durch  $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$  und  $^{57}\text{Fe}$  (2,119 %) durch  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$  überlagert werden (Bettmer *et al.* 2009). Um die Problematik der Interferenzmoleküle zu kompensieren gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen ist die Probenvorbereitung ein nicht zu unterschätzender Faktor. Je weniger Matrixmoleküle in das Plasma eingebracht werden, desto weniger matrixbedingte Interferenzen können sich unter den herrschenden Plasmabedingungen bilden. Den dennoch entstanden Interferenz-Molekülen kann instrumentell entgegengewirkt werden. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Kollisions-/Reaktions-Zelle der Agilent 7500cs kann auch ein hochauflösendes Massenspektrometer, welches in der Lage ist, die feinen Massenunterschiede zwischen dem Analyt-Ion und den Interferenz-Ionen aufzulösen, verwendet werden (Turner *et al.* 1998; Vanhaecke und Köllensperger 2003).

Die in dieser Arbeit eingesetzte Kollisionszelle besteht aus einem linear angeordnetem Oktopol, der im Aufbau der ICP-MS im Anschluss an das Linsensystem folgt. In dieser Zelle wird optional ein Kollisionsgas bzw. Reaktionsgas eingesetzt, welches geeignet ist die auftretenden interferierenden Molekülionen zu minimieren. Wasserstoff reduziert effektiv interferierende Molekül-Ionen, entweder durch eine Protonentransfer- (1) oder Ladungstransfer-Reaktion (2) (Tanner *et al.* 2002).



Zusätzliche wird durch die Einstellungen von Oktopol- und Quadrupol-Bias eine kinetische Energie-Diskriminierung vorgenommen, um den Untergrund weiter zu reduzieren. Die Potentialdifferenz zwischen Quadrupol und Oktopol verhindert, dass die Molekül-Ionen, mit ihrer geringeren kinetischen Energie gegenüber den Element-Ionen, weiter in den Massenfilter geleitet werden (Leonhard *et al.* 2002; Tanner *et al.* 2002; Yamada *et al.* 2002).

Der Quadrupol separiert die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis und leitet sie zum Detektor, einem Elektronen-Vervielfacher. Das Prinzip des verwendeten Detektors kann bei Becker (2007, S. 105) nachgelesen werden.

Da die meisten Elemente nicht monoisotopisch sind, kann es zu Überlagerung einzelner Elementmassen kommen. So liegt bei dem  $^{54}\text{Fe}$ -Isotope (5,845 %) das  $^{54}\text{Cr}$ -Isotope mit einer natürlichen Isotopenhäufigkeit von 2,365 % und auf der Masse 58 liegt neben dem  $^{58}\text{Fe}$ -Isotop (0,282 %) auch  $^{58}\text{Co}$  (68,08 %). Diese Überlagerungen können mathematisch korrigiert werden, indem die Masse eines anderen Isotops des störenden Elements gemessen wird und aufgrund des natürlichen Isotopenverhältnisses der entsprechende Beitrag des „falschen“ Elements subtrahiert wird.

### 2.5.1. Eisen-Quantifizierung mit 1-Punkt-Kalibrierung über Flussinjektionen

Die Eisen-Detektion des Transferrins eignet sich aufgrund der festen und bekannten Stöchiometrie des Fe-Tf-Komplexes als Quantifizierungsmethode für Tf. Das gebundene Eisen ist ein natürliches Markerelement. Im etwa 5000 - 8000 K heißen Plasma (Becker 2007; Westmann-Brinkmalm und Brinkmalm 2009) der ICP-MS werden die Komponenten auf ihre Elemente reduziert. Die anschließende Detektion der Elemente ist daher unabhängig von ihrer Spezies, also der Form der ins Plasma eingebrachten chemischen Verbindungen. So ist oftmals eine Spezies-unabhängige Quantifizierung komplexer Moleküle mit einem einfachen zertifizierten Elementstandard möglich (Svantesson *et al.* 2002).

Die Ionisierung der zu analysierenden Elemente wird insbesondere durch die Zusammensetzung der Matrix beeinflusst. Eine Verbesserung der im Plasma ablaufenden Ionisierungsprozesse für schwierig zu ionisierende Elemente, wie As, Se oder P kann durch den konstanten Eintrag einer definierten Menge an kohlenstoffhaltigen Komponenten z.B. organischen Lösungsmitteln (AbouShakra *et al.* 1997; Larsen und Ludwigsen 1997) oder bestimmten Gasen, wie Stickstoff oder Helium (Durrant 1993; Sesi *et al.* 1994) ins Plasma, erreicht werden. Wenn allerdings die optimale Menge dieser zusätzlichen Matrixkomponenten überschritten wird, kann dies wiederum auch zu einer Suppression der Ionisierung führen. Dies geschieht beispielsweise bei der Verwendung von Gradientenbedingungen, die auch für die Separation der Tf-Glykoformen verwendet werden. Selbst bei geringen Flussraten, wie bei der Kapillar- oder Nano-LC üblich, werden unter Verwendung von Gradientenbedingungen, also sich verändernder Matrixzusammensetzung, signifikante Unterschiede bei der Elementdetektion festgestellt. Um trotzdem eine akkurate Quantifizierung zu gewährleisten, müssen diese Einflüsse kompensiert werden. Dies kann beispielsweise über mathematischen Korrekturfaktoren erreicht werden (Siethoff *et al.* 1999; Wind *et al.* 2001; Zinn *et al.* 2009), oder durch den Einsatz von Membrandesolvatoren, um überschüssige organische Lösungsmittel aus dem Aerosol zu entfernen (Edler *et al.* 2005,

2006). Andere Ansätze arbeiten mit einem zusätzlichen konstanten Eintrag (*constant post column sheath flow*) z.B. organischer Lösungsmittel, um die gradientenbedingten Veränderungen in der Elementdetektion zu puffern (Giusti *et al.* 2005; Pereira Navaza *et al.* 2007; Pereira Navaza *et al.* 2008). Besonders zum Ende des Gradienten reicht diese Pufferleistung des konstanten *sheath flows* oftmals nicht aus, wodurch vornehmlich eine Beeinflussung der Quantifizierung von spät eluierenden Analyte gegeben ist.

Zur Lösung dieser Probleme bei der Chromatographie phosphorylierter Peptide entwickelten Pröfrock und Prange (2009) einen analytischen Ansatz unter Verwendung eines genau abgestimmten *sheath flows* mit gegenläufigen Gradienten (*reversed gradient post column sheath flow*). Dadurch wird der Anteil an organischem Lösemittel, welches schlussendlich ins Plasma eingebracht wird, konstant gehalten. Dieser instrumentelle Aufbau erlaubt eine Trennung der Analyte bei Verwendung eines Gradienten und gleichzeitiger Ionisierung dieser unter konstanten Plasmabedingungen. Durch die gleich bleibende Matrixzusammensetzung ist zum Ende jeder chromatographischen Trennung eine automatische Flussinjektion mit einem zertifizierten Elementstandard für die Kalibrierung mittels FIA (*flow injection analysis*) möglich (Pröfrock und Prange 2009; Grebe *et al.* 2011).

Die FIA ist eine simple und schnelle Möglichkeit, die für die Quantifizierung notwendige Kalibrierung jedes einzelne Chromatogramms, unabhängig von einer Abweichung des Gerätes über die Zeit hinweg, durchzuführen. In dieser Arbeit wurde die FIA-Methode für die Quantifizierung von Seehund-Tf angewendet. Die Separation der Tf-Glykoformen kann chromatographisch erfolgen, was bei der Verwendung einer Anionenaustauschchromatographie eine Elution mit einem Salzgradienten notwendig macht. Dieser veränderliche Salzeintrag ins Plasma beeinflusst ebenfalls die Ionisierung der Analyte. Daher wurde der Ansatz der Gradientenkompensation in Kombination mit der FIA in dieser Arbeit als Methode zur Quantifizierung der Tf-Glykoformen weiter entwickelt.

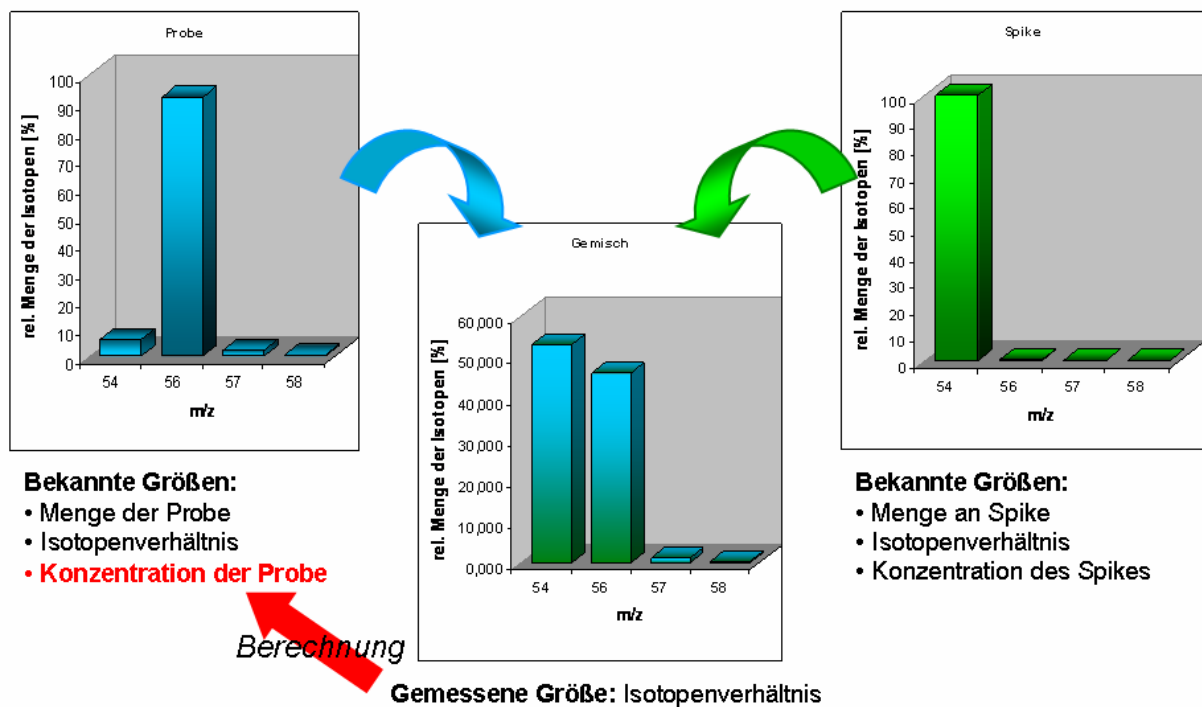
### **2.5.2. Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalytik**

Das Prinzip der Isotopenverdünnungsanalytik (*isotope dilution analysis*, IDA) basiert auf der Tatsache, dass die Elemente mit mehreren Isotopen natürlicherweise ein klar definiertes Isotopenverhältnis aufweisen. Quantifizierung mit Hilfe der Isotopenverdünnung ist damit prinzipiell für alle Elemente mit mindestens zwei stabilen Isotopen möglich. Das Prinzip der IDA ist schematisch in Abbildung 17 aufgezeigt und wird im Folgenden anhand der Quantifizierung von Tf erläutert.

Aus der Probe mit natürlichem Isotopenverhältnis des an Tf gebundenen Eisens und dem zugegebenen isotopisch angereicherten Spike entsteht ein Gemisch, dessen Isotopenverhältnis mit der ICP-MS gemessen wird. Aus diesem gemessenen Isotopenverhältnis kann mit der bekannten Probenmenge und dem natürlichen Isotopenverhältnis der Probe und den

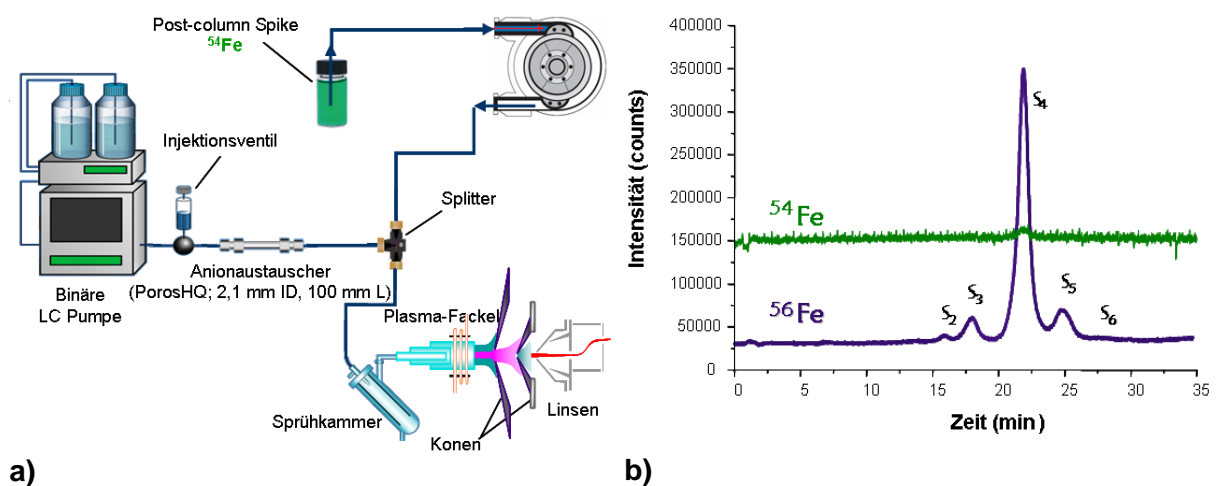


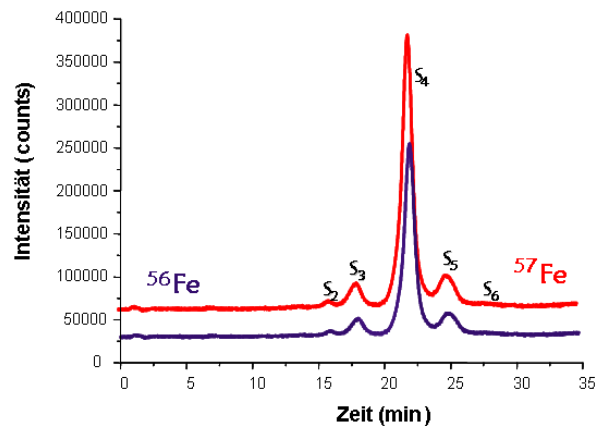
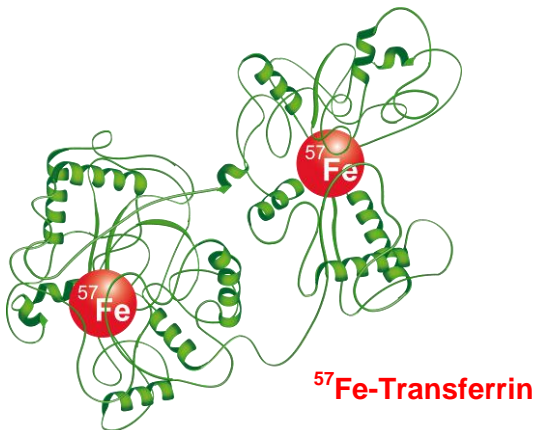
bekanntem Parametern (Spikemenge, Isotopenverhältnis und Spikekonzentration) des Spikes die Konzentration der Probe berechnet werden (Rodríguez-González *et al.* 2005).



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung des Prinzips der Isotopenverdünnungsanalytik (IDA)

Es gibt zwei Arten, auf die man einen isotopisch angereicherten Spike zur Quantifizierung einsetzen kann. Zum einen kann dies als *post-column* Spike erfolgen und zum anderen als *species-specific* Spike (Heumann 2004; Rodríguez-González *et al.* 2005). Beide Möglichkeiten sind in Abbildung 18a-d skizziert. In Abbildung 18a ist der schematische Versuchsaufbau für die *post-column* IDA dargestellt und in Abbildung 18b wird ein dazugehöriges Chromatogramm gezeigt. In Abbildung 18c ist das mit  $^{57}\text{Fe}$  gesättigte Tf dargestellt, welches als Spezies-spezifischer Spike eingesetzt werden kann. In Abbildung 18d ist ein daraus resultierendes Chromatogramm aufgezeigt.





c)

d)

**Abbildung 18:** a) schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Verwendung des *post-column* Spikes zur Quantifizierung und b) Skizze des dazugehörigen Chromatogramms; c) schematische Darstellung für ein spezies-spezifischen Spike am Beispiel des vollständig mit  $^{57}\text{Fe}$  gesättigten Transferrins und d) Skizze des dazugehörigen Chromatogramms

Der Vorteil der Isotopenverdünnung liegt darin, dass die Matrix, die mit in das Plasma des ICP-MS eingebracht wird, den Analyten und den Standard in gleicher Weise beeinflusst. Bei der Spezies-spezifischen Isotopenverdünnung (Abbildung 18c-d) wird dieser Ansatz um eine Ebene erweitert. Es wird ein spezifischer Standard, identisch zum Analyten, generiert, wobei das enthaltene Element durch eines seiner Isotope ersetzt wurde. Durch direkte Zugabe des Spikes als ersten Schritt in der Probenvorbereitung kann man auch alle Manipulationsschritte während der gesamten Probenvorbereitung normieren. Man kreiert also einen idealen internen Standard. Dazu müssen folgende Bedingungen erfüllt sein: Die Zusammensetzung und Struktur der Spezies von Interesse muss exakt bekannt sein, die vollständige Mischung von Analyt und internem Standard muss gewährleistet sein und es darf kein Isotopenaustausch zwischen dem natürlichen und dem isotopisch-angereicherten Metall auftreten (Rodríguez-González *et al.* 2005).

Auch auf dem Gebiet der IDA erfolgt kontinuierlich eine Weiterentwicklung der Methoden zur Optimierung der Präzision und Akkuratessse. Als Beispiele ist ein alternativer Ansatz zur Bestimmung des exakten Massenflusses des *post-column* Spikes (Swart *et al.* 2011) oder ein doppeltes IDA-Experiment mit einer *exact matching* Technik (Rienitz *et al.* 2007) zu nennen.

Die Struktur des Seehund-Tfs ist nicht bekannt, so dass man keinen synthetischen idealen internen Standard mit isotopisch angereichertem Tf herstellen kann. Ebenso ist die Herstellung eines Standards aus natürlichem Seehund-Tf mit isotopisch angereichertem Eisen nicht verlässlich genug zu realisieren. Daher ist in diesem Fall nur die Methode der *post-column* IDA (Abbildung 18a-b) anwendbar. Sie erlaubt die Quantifizierung von Elementen, auch wenn die Element-Spezies nicht bekannt ist. Allerdings wird der Analytverlust während der Probenvorbereitung bei dieser Methode nicht korrigiert.

### 2.5.2.1. Mathematische Grundlagen der *post-column* IDA

Bei der verwendeten *post-column* IDA erfolgt die Quantifizierung des vom Tf gebundenen Eisens, wie oben beschrieben, durch den Bezug auf den kontinuierlich zugeführten mit  $^{54}\text{Fe}$  angereicherten *post-column* Spike. Die Berechnung der Eisenkonzentration aus der Messung der Intensitäten für die einzelnen Fe-Isotope ist im Folgenden beschrieben.

Aus einem Chromatogramm mit Intensitäten der einzelnen Isotope kann das Isotopenverhältnis als Funktion der Zeit gebildet  $[R(t)]$  werden. Mit der folgenden Gleichung 2 kann der Massenfluss für die Probe als Funktion der Zeit  $[MF_{\text{sample}}(t)]$  berechnet werden (Rottmann und Heumann 1994; Giusti *et al.* 2005; Rodríguez-González *et al.* 2005). Diese Funktion beschreibt das *mass-flow*-Chromatogramm. Aus diesem *mass-flow*-Chromatogramm kann durch Integration der Peakflächen direkt die Konzentration der einzelnen Peaks ermittelt werden.

$$MF_{\text{sample}}(t) = c_{\text{spike}} * \text{flow}_{\text{spike}} * \frac{A_r^{\text{sample}}}{A_r^{\text{spike}}} * \left( \frac{x_{\text{spike}}^{54} * R_{\text{mixture}}^{56/54}(t) - x_{\text{spike}}^{56}}{x_{\text{sample}}^{56} - R_{\text{mixture}}^{56/54}(t) * x_{\text{sample}}^{54}} \right) \quad \text{Gleichung 2}$$

Der Massenfluss der Probe  $MF_{\text{sample}}$  ist gleich der Konzentration des Spikes  $c_{\text{spike}}$ , multipliziert mit dem Fluss des Spikes  $\text{flow}_{\text{spike}}$ , multipliziert mit dem Verhältnis der relativen Atommasse  $A_r$  von Probe zu Spike, multipliziert mit einem Term, der die Isotopenhäufigkeiten  $x$  von  $^{54}\text{Fe}$  und  $^{56}\text{Fe}$  in Spike und Probe mit den gemessenen Isotopenverhältnissen des Gemisches  $R^{56/54}_{\text{mixture}}$  in Beziehung setzt.

### 2.5.2.2. Berechnung für die *double-spiking* IDA und *Isotope pattern deconvolution*

In dieser Arbeit wurde zusätzlich eine Variante der *post-column* IDA zur Quantifizierung des Seehund-Tfs eingesetzt. Dazu wurde das natürlicherweise partiell mit Eisen ( $^{56}\text{Fe}$ ) gesättigte Tf mit einem weiteren Spike, dem  $^{57}\text{Fe}$ -Tracer als Indikator, vollständig gesättigt. Die eigentliche Quantifizierung erfolgt im Anschluss über den  $^{54}\text{Fe}$  *post-column* Spike, daher wird diese Methode als *double-spiking* IDA bezeichnet.

Bei der Verwendung von mehreren isotopisch angereicherten Spikes wird die Quantifizierung des Analyten aus den gemessenen Isotopenverhältnissen komplexer. Das Isotopenmuster, welches durch die einzelnen Isotopenverhältnisse beschrieben wird, muss entfaltet werden. Die Herleitung der für die mathematische Entfaltung des Isotopenmusters (*isotope pattern deconvolution*, IPD) verwendeten Matrix ist im Folgenden am Beispiel des mit  $^{57}\text{Fe}$  gesättigten Tfs und des  $^{54}\text{Fe}$ -*post-column*-Spikes aufgezeigt (Meija und Yang 2006; Rodríguez-Castrillon *et al.* 2008).

Die Stoffmenge ( $n$ ) an Eisen in der Probe setzt sich daher wie folgt zusammen:

$$n_{\text{sample}}^{\text{Fe}} = n_{\text{natural}}^{\text{Fe}} + n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}} + n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}} \quad \text{Gleichung 3}$$

Gleichung 3 beschreibt die Eisenmenge als Gesamtheit aller Eisenisotope. Die Zusammensetzung lässt sich auch für jedes verwendete Eisenisotop separat formulieren:

$$\begin{aligned} n_{\text{sample}}^{56} &= n_{\text{natural}}^{56} + n_{\text{tracer}}^{56} + n_{\text{postcolumn}}^{56} \\ n_{\text{sample}}^{57} &= n_{\text{natural}}^{57} + n_{\text{tracer}}^{57} + n_{\text{postcolumn}}^{57} \\ n_{\text{sample}}^{54} &= n_{\text{natural}}^{54} + n_{\text{tracer}}^{54} + n_{\text{postcolumn}}^{54} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 4}$$

Dieses Gleichungssystem (Gl. 4) lässt sich auch als lineare Kombination aus der Menge an Eisen und der entsprechenden Isotopenhäufigkeit (A) der Isotope des natürlich vorkommenden Eisens und des Spikes an angereicherten Isotopen darstellen:

$$\begin{aligned} n_{\text{sample}}^{\text{Fe}} * A_{\text{sample}}^{56} &= n_{\text{natural}}^{\text{Fe}} * A_{\text{natural}}^{56} + n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}} * A_{\text{tracer}}^{56} + n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}} * A_{\text{postcolumn}}^{56} \\ n_{\text{sample}}^{\text{Fe}} * A_{\text{sample}}^{57} &= n_{\text{natural}}^{\text{Fe}} * A_{\text{natural}}^{57} + n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}} * A_{\text{tracer}}^{57} + n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}} * A_{\text{postcolumn}}^{57} \\ n_{\text{sample}}^{\text{Fe}} * A_{\text{sample}}^{54} &= n_{\text{natural}}^{\text{Fe}} * A_{\text{natural}}^{54} + n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}} * A_{\text{tracer}}^{54} + n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}} * A_{\text{postcolumn}}^{54} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 5}$$

Dividiert man nun Gleichung 5 durch Gleichung 3, erhält man die folgenden Gleichungen:

$$\begin{aligned} A_{\text{sample}}^{56} &= x_{\text{natural}} * A_{\text{natural}}^{56} + x_{\text{tracer}} * A_{\text{tracer}}^{56} + x_{\text{postcolumn}} * A_{\text{postcolumn}}^{56} \\ A_{\text{sample}}^{57} &= x_{\text{natural}} * A_{\text{natural}}^{57} + x_{\text{tracer}} * A_{\text{tracer}}^{57} + x_{\text{postcolumn}} * A_{\text{postcolumn}}^{57} \\ A_{\text{sample}}^{54} &= x_{\text{natural}} * A_{\text{natural}}^{54} + x_{\text{tracer}} * A_{\text{tracer}}^{54} + x_{\text{postcolumn}} * A_{\text{postcolumn}}^{54} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 6}$$

wobei:

$$\begin{aligned} x_{\text{natural}} &= \frac{n_{\text{natural}}^{\text{Fe}}}{n_{\text{natural}}^{\text{Fe}} + n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}} + n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}}} \\ x_{\text{tracer}} &= \frac{n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}}}{n_{\text{natural}}^{\text{Fe}} + n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}} + n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}}} \\ x_{\text{postcolumn}} &= \frac{n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}}}{n_{\text{natural}}^{\text{Fe}} + n_{\text{tracer}}^{\text{Fe}} + n_{\text{postcolumn}}^{\text{Fe}}} \end{aligned}$$

Das obige Gleichungssystem (Gl. 6) lässt sich auch in der Matrixschreibweise zu einer Gleichung zusammenfassen:

$$\begin{pmatrix} A_{\text{sample}}^{56} \\ A_{\text{sample}}^{57} \\ A_{\text{sample}}^{54} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{\text{natural}}^{56} & A_{\text{tracer}}^{56} & A_{\text{postcolumn}}^{56} \\ A_{\text{natural}}^{57} & A_{\text{tracer}}^{57} & A_{\text{postcolumn}}^{57} \\ A_{\text{natural}}^{54} & A_{\text{tracer}}^{54} & A_{\text{postcolumn}}^{54} \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} x_{\text{natural}} \\ x_{\text{tracer}} \\ x_{\text{postcolumn}} \end{pmatrix} \quad \text{Gleichung 7}$$

Der Vektor der Isotopenhäufigkeit in der Probe ist y, die Matrix der Isotopenhäufigkeit der Einzelkomponenten ist A und der Vektor der unbekanntenen Molar-Fractionen ist x, damit lässt sich Gleichung 7 auch wie folgt schreiben:

$$y = A * x \quad \text{Gleichung 8}$$

$$\rightarrow y * A' = A * A' * x \quad \text{Gleichung 9}$$

$$\rightarrow (y * A') * (A * A')^{-1} = x \quad \text{Gleichung 10}$$

Zu Gleichung 9: Wenn  $A$  eine reguläre (mit linear unabhängigen Spaltenvektoren) quadratische Matrix ( $n \times n$ ) ist, dann existiert die inverse Matrix  $A^{-1}$ . Bei einer Matrix vom Typ  $n \times m$  existiert die Inverse  $(A'A)^{-1}$ , wenn alle  $m$  Spaltenvektoren linear unabhängig sind. D.h. man kann nur durch eine quadratische Matrix dividieren, also die Inverse bilden.

Wenn  $A$  eine reguläre quadratische Matrix ist, dann gilt:

$$x = A^{-1} * y \quad \text{Gleichung 11}$$

und

$$x = A^{-1} * y = (y * A') * (A * A')^{-1} \quad \text{Gleichung 12}$$

### 2.5.2.3. Korrektur der Massendiskriminierung

Der Effekt der Massendiskriminierung ist die Verschiebung der gemessenen Isotopenverhältnisse ( $R_{\text{measured}}$ ) hin zu den schwereren Isotopen im Vergleich zu den tatsächlichen Isotopenverhältnissen. Schwere Isotope werden effizienter durch das Interface transportiert und im Linsensystem der ICP-MS fokussiert als die leichteren Isotope. Wenn also, wie im Fall der IDA, Isotopenverhältnisse gemessen werden, wird zum Ausgleich ein Korrekturfaktor ermittelt. Dieser wird zur Berichtigung der Isotopenverhältnisse benötigt ( $R_{\text{corrected}}$ ).

Die Massendiskriminierung ist abhängig von den instrumentellen Einstellungen. Rodríguez-González *et al.* (2005) beschreiben zwei sich ergänzende Effekte, die diese Massendiskriminierung hervorrufen. Der *nozzle effect* oder Düseneffekt bewirkt, dass leichtere Isotope vor dem Skimmer im Vakuum-Interface aus dem Ionenstrom „heraus geblasen“ werden, wohingegen die schweren Isotope im zentralen Ionenstrom angereichert werden. Der *space-charge effect* oder Raumladungseffekt beschreibt einen Effekt der Ionenlinsen. Leichtere Isotope werden effizienter von den Linsen umgeleitet, die schwereren Isotope bleiben im zentralen Ionenstrom (Rodríguez-González *et al.* 2005; Rodríguez-Castrillon *et al.* 2008).

Die Korrektur des *mass bias* kann mit verschiedenen mathematischen Funktionen berechnet werden. In dieser Arbeit wurde die exponentielle Funktion verwendet, die von Rodríguez-González *et al.* (2005) beschrieben wurde,

$$R_{\text{corrected}} = R_{\text{measured}} * e^{(k * \Delta m)} \quad \text{Gleichung 13}$$

wobei  $\Delta m$  die Massendifferenz der Isotope ist und  $k$  der Korrekturfaktor.

Der Korrekturfaktor  $k$  wird durch die Messung der verschiedenen Isotope in einem Standard mit bekannten Isotopenverhältnissen ermittelt. Dabei wird auch die exponentielle Funktion benutzt.  $K$  ist die Steigung der linearen Regressionsgrade der Funktion:

$$\ln\left(\frac{R_{\text{experimentell}}}{R_{\text{theoretical}}}\right) = k * \Delta m$$

**Gleichung 14**

Der Fehler des experimentellen Isotopenverhältnisses zu dem theoretischen Isotopenverhältnis  $\ln(R_{\text{experimentell}}/R_{\text{theoretisch}})$  wird gegen die Massendifferenz  $\Delta m$  der entsprechenden Isotope aufgetragen. Die Steigung dieser Geraden ist der Korrekturfaktor  $k$ .

### 3. Experimenteller Teil

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien (Tabelle 2), die Verbrauchsmaterialien (Tabelle 3), Geräte (Tabelle 4) sowie die, für die Datenauswertung verwendete Software (Tabelle 5) mit den jeweiligen Herstellerangaben bzw. ihrer Bezugsquellen aufgelistet.

Die Gefahrenmerkmale und Sicherheitsratschläge für die Chemikalien, entsprechend des neuen vereinheitlichten europäischen Kennzeichnungssystems (GHS: **G**lobally **H**armonised **S**ystem of **C**lassification and **L**abelling of **C**hemicals), sind im Anhang in Tabelle A1 beigefügt. Bei Arbeiten mit Gefahrstoffen wurden die Sicherheitshinweise aus den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern befolgt. Die Abfälle wurden entsprechend ihrer Einstufung getrennt gesammelt und fachgerecht entsorgt.

Reinstwasser (18 MΩ cm), produziert mit einem Millipore Elix 3/Milli-Q Element Reinstwassersystem, diente als Basis zur Herstellung aller Puffer und Lösungen. Wenn möglich wurden die Laborarbeiten in einem Reinraum der Klasse 1000 durchgeführt. Bei Arbeitsschritten in anderen Laboratorien wurde unter einer Reinraumwerkbank (*clean bench*) der Klasse 100 gearbeitet. Die verwendeten Gefäße für die Lösungen und Puffer wurden vor dem Gebrauch für mindestens 24 Stunden in eine mindestens 2%ige HNO<sub>3</sub>-Lösung eingelegt. Eine Subboiling-Anlage diente der zweifachen Aufreinigung der eingesetzten Salpetersäure.

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angaben zum Hersteller

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Aceton, Optigrade® (CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> )	Promochem, LGC Standards GmbH, Wesel, Dtl.
Acetonitril (CH <sub>3</sub> CN), Suprapure®	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Agarose	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Ameisensäure, Suprapure®	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Ammoniaklösung, 25%, Suprapure®	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
APS; Ammoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Dtl.
Argon 5.0 (99.999%)	Air Liquide, Lübeck, Dtl.
Bio-Lyte® 3/10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Bis-Tris, BioUltra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
BSA ( <i>bovine serum albumine</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
1-Butanol	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Canin Transferrin ELISA	Immunology Consultants Laboratory Inc., Newberg, OR, USA
CHAPS; 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propan sulfonat)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Dtl.
Chelex® 100	Fluka, Buchs, Schweiz
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Dextransulfat, Na-Salz, von <i>Leuconostoc</i> ssp.;	Fluka, Buchs, Schweiz
Mr-500000, BioChemika	

**Tabelle 2 (Fortsetzung):** Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angaben zum Hersteller

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
DTT; Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Eisen-III-chlorid Hexahydrat p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
<sup>54</sup> Fe-Isotop und <sup>57</sup> Fe-Isotop als Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	STB Isotope Germany GmbH, Hamburg, Dtl.
Element Standards, CertiPUR® 1000 mg/L: Fe, Ge, Cs, Co, Y; rückführbar auf SRM von NIST	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
ERM®-470k/IFCC zertifiziertes Referenzmaterial, humanes Serum	European Commission, JRC, IRMM, Geel, Belgien
Essigsäure (hochrein)	Promochem, LGC Standards GmbH, Wesel, Dtl.
Ethanol, Suprapure®	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Glycerol	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Glycin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Harnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
HCCA, α-Cyano-4-hydroxymethylsäure	Bruker Daltonics Inc., Bremen, Dtl.
IAA; Iodoacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Magnesiumchlorid Hexahydrat, BioChemika Ultra	Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Methanol Optigrade	Promochem, LGC Standards GmbH, Wesel, Dtl.
Mineralöl, Biotechnology grade	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Natriumcarbonat, wasserfrei, Suprapure® (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
ortho-Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
PageRuler® (MW-Marker 10-170 kDa)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Dtl.
Peptid Calibration Standard 2 (Angiotensin II, Angiotensin I, Substanz B, Bombesin, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, Somatostatin 28)	Bruker Daltonics Inc., Bremen, Dtl.
PHASE™ RANGE, Haptoglobin Kit (2nd G.)	Tridelta Development Ltd., County Kildare, Irland
PNGase F (Peptid N-Glykosidase aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Protein Calibration Standard 1 (Trypsinogen, Protein A, BSA)	Bruker Daltonics Inc., Bremen, Dtl.
Salpetersäure, 65%, ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Dtl.
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> ), Natriumdodecylsulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Sinapinsäure	Bruker Daltonics Inc., Bremen, Dtl.
TEMED; N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
TFA, Trifluoressigsäure, Suprapure®	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
Transferrin bovine (holo)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Transferrin human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Tris-Base (Trizma® base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.
Wasserstoff 5.0 (99.999%)	Air Liquide, Lübeck, Dtl.
α(2→3,6,8,9)Neuraminidase von <i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Dtl.



**Tabelle 3:** Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte mit zugehörigen Herstellerangaben

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße ( <i>safe lock tubes</i> )	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
10% Tris-HCl Gele, Criterion®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
AnchorChip™ 600/384	Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Dtl.
Dionex PepMap C18 Säule, 75 µm x 150 mm	Dionex GmbH, Idstein, Dtl.
Einmalkanüle 12 x 100 mm, TSK-Supra	TSK-Laboratory, Japan
Einweg-Borsilicat-Kapillare, metallbeschichtet	Proxeon Biosystems, Odense, Dänemark
Fackel + Schild	Agilent Technologies, Tokyo, Japan
GELoader Pipettenspitzen (1-10µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Glassäule	Dionex GmbH, Idstein, Dtl.
IPG Streifen, readyStripe	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Mikrotiterplatte <i>96well flat bottom</i> , Polystyrol	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Monovetten (Lithium-Heparin; Serum Gel S)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Dtl.
PEEK Kapillaren und Verschraubungen (1/16'' AD)	Upchurch Scientific/GAT Analysen Technik, Bremen, Dtl.
PEEKsil Kapillare (200 µm x 200 mm)	Upchurch Scientific/GAT Analysen Technik, Bremen, Dtl.
Perfluoralkoxylalkan (PFA) Gefäße mit Schraubdeckel (10 - 250 ml)	Nalgene® Labware, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA
PFA Zerstäuber, konzentrisch, 100 micron	Upchurch Scientific/GAT Analysen Technik, Bremen, Dtl.
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1 ml, 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Poros HQ; 2,1 mm x 100 mm, 10µm Partikelgröße	Applied Biosystems, Foster City, USA
Schott Duran® Glasflaschen	Schott AG, Mainz, Dtl.
Schraubdeckel-Probengefäß mit 200 µl Polypropylen Einsatz	Agilent Technologies, Tokyo, Japan
Scott Sprühkammer, Quarz	Agilent Technologies, Tokyo, Japan
Ultrafiltrationseinheiten, Vivaspin 6 (MWCO 10 000 Da)	Satorius, Göttingen, Dtl.

**Tabelle 4:** Verwendete Geräte und Laborausstattung mit Herstellerangaben

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Agilent 1100 HPLC System	Agilent Technologies, Waldbronn, Dtl.
Agilent 7500cs ICP-MS	Agilent Technologies, Tokyo, Japan
Agilent 7500s ICP-MS	Agilent Technologies, Tokyo, Japan
Agilent 7700 ICP-MS	Agilent Technologies, Tokyo, Japan
Blockthermostat TCR 200	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Dtl.
Bruker Ultraflex II MALDI-TOF-TOF-MS	Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Dtl.
CRITERION® Zelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Dodeca™ Stainer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
ESI-MS 4000 QTrap®	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
externe peristaltische Pumpe, Perimax 12	SPETEC GmbH, Erding, Dtl.
externes Ventil, 6 Kanäle, LabPro	Rhedyne, Cotati, CA, USA
Feinwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Dtl.
Fokussierungseinheit, Protean IEF Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Kreis-Schüttler 3005	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Dtl.
Magnetrührer, Mini MR Standard	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Dtl.
Mikroliterspritze 1000µl; 4,61mm ID	Hamilton Company, Bonaduz, Schweiz
Millipore Elix 3/Milli-Q Element	Millipore, Milford, MA, USA

**Tabelle 4 (Fortsetzung):** Verwendete Geräte und Laborausstattung mit Herstellerangaben

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
pH-Meter, inoLab pH Level 2	WTW GmbH, Weilheim, Dtl.
Photometer, Victor <sup>3</sup> ™, Multilab Counter 1420	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
PowerPac 1000 und 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
PROTEAN Plus Dodeca Zelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtl.
Schüttler, LABOSHAKE	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Dtl.
Spritzenpumpe 11Plus	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Ultraschallbad, transsonic 460 Elma®	NeoLab®, Heidelberg, Dtl.
Vakuumentrifuge	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Dtl.
Waage	Satorius, Göttingen, Dtl.

**Tabelle 5:** Zur Datenauswertung eingesetzte Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Origin 7.5	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
Microsoft® Office Excel 2003, SP2	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<b>HPLC 1100series</b>	
ChemStation for LC systems B.01.01	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
<b>ICP-MS 7500/7700</b>	
ICP-MS ChemStation B.03.05	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
ICP-MS Chromatographic Software C.01.00	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
ICP-MS MassHunter B.01.01	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
<b>Multilabel Counter 1420, victor<sup>3</sup></b>	
Wallac 1420 Workstation 3.00 Revision 3	Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA
<b>ESI-qTrap-MS</b>	
Analyst® 1.4.2	Applied Biosystems Sciex Instruments, Foster City, CA, USA
Protein Pilot 2.0	Applied Biosystems MDS Sciex, Foster City, CA, USA
<b>MALDI-TOF-MS</b>	
flexAnalysis 2.4	Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Dtl.
BioTools 3.0	Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Dtl.
Mascot Algorithmus	Matrix Science Inc., Bosten, MA, USA

### 3.1. Probenherkunft

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen von Seehunden aus der Nordsee, die im Rahmen des Lebendmonitorings während verschiedener Wildfang-Aktionen in 2006 und 2007 auf der Sandbank Lorenzenplate im nordfriesischen Wattenmeer und auf der Düne der Insel Helgoland gefangen wurden (Reijnders *et al.* 2009). Ein weiterer Wildfang fand nahe der Insel Neuwerk auf Scharhörn statt (Kakuschke *et al.* 2010b). Zusätzliche Proben stammen von Seehunden, die nach Untersuchung durch einen Veterinärmediziner als nicht überlebensfähig eingestuft und aufgrund ihres kritischen allgemeinen Gesundheitszustands von Seehundjägern erschossen wurden. Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar im Anschluss. Die biologischen Merkmale aller Seehunde, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind mit Datum und Ort der Probennahme in Tabelle 6 aufgelistet. Die Alters- und

Geschlechtsbestimmung der Tiere wurde von Veterinären vorgenommen. Für diese Arbeit wurde eine Gruppierung in juvenile ( $\leq 2$  Jahre) und adulte ( $> 2$  Jahre) Seehunde vorgenommen. Die Orte der Wildfänge und die Fundorte der getöteten Tiere sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Fang- und Fundorte (mit Kreuz markiert) der in dieser Studie untersuchten Seehunde (Quelle der Karte:<sup>[1]</sup> <http://www.stepmap.de/karte/nordsee-deutsche-bucht-3-141095>)

**Tabelle 6:** Datum und Ort der Probennahme der verwendeten Seehund-Blutproben und die biologischen Merkmale der Tiere, mit \* gekennzeichnete Tiere wurden aufgrund ihres kritischen allgemeinen Gesundheitszustands von Seehundjägern erschossen (n.b. – nicht bestimmt; m - männlich, w - weiblich; P.v. - *Phoca vitulina*; W - Wildfang)

Tier-Nr.	Datum	Ort	Alter [Jahre]	Geschlecht	Totallänge [cm]	Gewicht [kg]
P.v. 3675*	12.03.07	Helgoland	$\leq 2$	m	109,5	18,8
P.v. 4144*	06.12.07	Helgoland	$\leq 2$	w	101	17,8
P.v. 4145*	06.12.07	Helgoland	$\leq 2$	m	110	17,4
P.v. 4190*	29.01.08	Helgoland	$\leq 2$	w	97	15,8
P.v. 4191*	29.01.08	Helgoland	$\leq 2$	m	112	22,6
P.v. 4195*	14.02.08	Sylt	$\leq 2$	m	100	17,4

**Tabelle 6 (Fortsetzung):** Datum und Ort der Probennahme der verwendeten Seehund-Blutproben und die biologischen Merkmale der Tiere, mit \* gekennzeichnete Tiere wurden aufgrund ihres kritischen allgemeinen Gesundheitszustands von Seehundjägern erschossen (n.b. - nicht bestimmt; m - männlich, w - weiblich; P.v. - *Phoca vitulina*; W - Wildfang)

Tier-Nr.	Datum	Ort	Alter [Jahre]	Geschlecht	Totallänge [cm]	Gewicht [kg]
P.v. 3287	10.04.06	Helgoland	>2	m	142	55
P.v. 3288	10.04.06	Helgoland	>2	m	160	95
P.v. 3289	10.04.06	Helgoland	>2	m	155	n.b.
P.v. 3290	10.04.06	Helgoland	≤2	m	n.b.	34
P.v. 3294	11.04.06	Helgoland	>2	m	144	53
P.v. 3296	11.04.06	Helgoland	>2	m	145	53
P.v. 3300	19.04.06	Lorenzenplate	≤2	m	143	35
P.v. 3301	19.04.06	Lorenzenplate	≤2	w	125	29
P.v. 3303	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	150	48
P.v. 3305	19.04.06	Lorenzenplate	>2	w	165	72
P.v. 3306	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	165	n.b.
P.v. 3307	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	170	92
P.v. 3308	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	167	82
P.v. 3309	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	158	82
P.v. 3310	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	180	100
P.v. 3312	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	165	78
P.v. 3313	19.04.06	Lorenzenplate	>2	w	145	49
P.v. 3314	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	178	97
P.v. 3315	19.04.06	Lorenzenplate	>2	m	180	89
P.v. 3563	27.09.06	Helgoland	≤2	w	110	22
P.v. 3564	28.09.06	Helgoland	>2	m	165	73
P.v. 3565	28.09.06	Helgoland	>2	m	165	69
P.v. 3566	28.09.06	Helgoland	>2	m	165	71
P.v. 3677	13.03.07	Lorenzenplate	>2	m	165	91
P.v. 3681	13.03.07	Lorenzenplate	>2	m	170	93
P.v. 3682	13.03.07	Lorenzenplate	>2	m	180	98
P.v. 3683	13.03.07	Lorenzenplate	≤2	w	137	48
P.v. 3684	13.03.07	Lorenzenplate	≤2	m	150	40
P.v. 3687	13.03.07	Lorenzenplate	≤2	m	150	42
P.v. 3688	13.03.07	Lorenzenplate	>2	m	160	82
P.v. 3689	13.03.07	Lorenzenplate	≤2	m	125	39
P.v. 3690	13.03.07	Lorenzenplate	>2	w	166	85
P.v. 3691	13.03.07	Lorenzenplate	≤2	m	120	47
P.v. 3692	13.03.07	Lorenzenplate	≤2	m	110	34,5
P.v. 4112	02.11.07	Lorenzenplate	>2	m	185	93
P.v. 4115	02.11.07	Lorenzenplate	>2	m	149	61,5
P.v. 4116	02.11.07	Lorenzenplate	>2	m	165	62,5
P.v. 4117	02.11.07	Lorenzenplate	≤2	w	138	38,5
P.v. 4118	02.11.07	Lorenzenplate	≤2	w	n.b.	43
P.v. 4119	02.11.07	Lorenzenplate	>2	w	150	63
P.v. 4120	02.11.07	Lorenzenplate	>2	m	153	50,5
P.v. 4123	02.11.07	Lorenzenplate	>2	m	180	90
P.v. 4124	02.11.07	Lorenzenplate	≤2	m	143	51
W 01/08 Pv	10.10.08	Neuwerk	≤2	m	96	25
W 02/08 Pv	10.10.08	Neuwerk	>2	m	130	48
W 03/08 Pv	10.10.08	Neuwerk	>2	m	147	49
W 04/08 Pv	10.10.08	Neuwerk	≤2	m	112	24
W 05/08 Pv	10.10.08	Neuwerk	≤2	m	119	39

Die Blutproben wurden von einem Veterinär mit einer 12 mm x 100 mm Einmalkanüle direkt vor Ort aus der epiduralen Vertebralvene der Seehunde entnommen. Abhängig von den durchzuführenden Versuchen wurden die Blutproben in Lithium-Heparin Monovetten für die Metall-Analytik und in Serum Gel S Monovetten überführt. Innerhalb von 24 h wurden die zellulären Bestandteile vom Serum bzw. Plasma durch Zentrifugation abgetrennt und dieses in 1 mL-Aliquote bei -80 °C eingefroren.

Zu Beginn wurde für einige Tests versuchsweise mit Tf-Standards (human, bovine) gearbeitet. Für die Validierung der Methode wurde zertifiziertes Referenzmaterial (ERM®-DA470k/IFCC) aus gepooltem Humanserum verwendet.

Die methodischen Entwicklungen zur Isolierung von Tf aus Blutproben, sowie zur Identifizierung und Charakterisierung von Seehund-Tf wurden mit Probenmaterial von zwei Seehunden durchgeführt (P.v. 4190 und P.v. 4191). Diese Tiere wurden aufgrund ihres kritischen allgemeinen Gesundheitszustands getötet, daher stand von diesen beiden Individuen eine deutlich größere Probenmenge zur Verfügung (etwa 10 mL Serum und Plasma pro Tier).

### **3.2. Quantitative Immunoassays zur Konzentrationsbestimmung einzelner APPs**

#### **3.2.1. ELISA-Test für Hunde-Transferrin**

Der Seehund ist nahe verwandt mit dem Haushund (*Canis familiaris*), daher wurde eine mögliche Kreuzreaktivität von Seehund-Tf mit Anti-Canin-Tf – Antikörper vermutet. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung der Tf-Konzentration in einem ersten Versuch die Verwendung eines *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) für Tf von Hunden getestet. Es kam ein Doppel-Antikörper-„Sandwich“-ELISA zum Einsatz, wobei an den zweiten Anti-Tf – Antikörper das Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Dieses oxidiert das chromogene Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin unter Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu dem farbigen Tetramethylbenzidin-Radikal.

Der Test wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt:

- Anti-Tf – Antikörper sind an die Mikrotiterplatte gebunden
- 100 µl Kontroll-Serum (6,25 / 12,5 / 25 / 50 / 100 / 200 / 400 µg/L) oder Probe zugeben
- Tf x Anti-Tf – Komplex bildet sich (22°C, 15 min)
- Waschen, um ungebundene Proteine zu entfernen
- Zugabe von 100 µl des Anti-Tf-Peroxidase – Konjugats
- Der „Sandwich“ aus Anti-Tf x Tf x Anti-Tf-Peroxidase bildet sich (22 °C, 15 min)
- Waschen, um das ungebundene Anti-Tf-Peroxidase – Konjugat zu entfernen
- Hinzufügen von 100 µl des chromogenen Substrats (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
- Nach exakt 10 min: Bestimmung der Peroxidase-Enzymaktivität (450 nm)

### 3.2.2. Bestimmung von Haptoglobin und C-reaktivem Protein

Als zusätzliche Parameter wurden die Konzentrationen der APP Haptoglobin (Hp) und C-reaktives Protein (CRP) bestimmt.

Die Konzentration an Hp wurde im Serum von Seehunden mit einem Spezies-unabhängigen quantitativen colorimetrischen Test im Mikrotiterplatten-Format bestimmt (Kakuschke 2006; Kakuschke *et al.* 2010a; Kakuschke *et al.* 2010b). Das Test-Prinzip beruht auf der Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins, die bei niedrigem pH-Wert inhibiert wird. Haptoglobin bindet an das freie Hämoglobin und erhält die Peroxidase-Aktivität auch bei einem geringen pH-Wert. Die Peroxidase-Aktivität ist proportional zur Hp-Konzentration, die durch Umsetzung des chromogenen Substrats bei 630 nm photometrisch bestimmt. Der Test hat eine analytische Sensitivität von 0,005 g/L Haptoglobin. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben in Dreifachbestimmung:

- Pipettieren von 7,5 µL Probe bzw. Kalibrator (0,312 / 0,625 / 1,25 g/L) in Mikrotiterplatte
- Zugabe von 100 µl Reagenz 1 (Hämoglobin), vorsichtiges Mischen
- Zugabe von 140 µl Reagenz 2 (Chromogen), 5 min, RT
- Direkt nach 5 min: Bestimmung der Peroxidase-Enzymaktivität (630 nm)

Die Konzentrationsbestimmung von CRP im Serum von Seehunden wurde im synlab.vet Hamburg durchgeführt (Kakuschke *et al.* 2010b; Kakuschke *et al.* 2011). Verwendung fand ein ELISA-Test (OSR6147) mit Anti-Human-CRP – Antikörper. Die immunoturbidimetrische Messung erfolgte mit einem OLYMPUS AU 2700.

### 3.3. Isolierung von Seehund-Transferrin

Zur Isolierung von Seehund-Tf wurden einige Vorversuche mit Affinitätschromatographie, Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) und verschiedenen Anionenaustauschchromatographie-Säulen durchgeführt. Zu Beginn wurde eine Agilent 7500s ICP-MS verwendet. Da hier ohne den Einsatz einer Kollisions-/Reaktionszelle gearbeitet wurde, erfolgte die Detektion über das weniger interferierte <sup>54</sup>Fe-Isotop.

Die Isolierung von Tf aus Lebergewebe wurde in einigen Experimenten getestet. Da die zu entwickelnde Methodik im Rahmen eines Lebendmonitorings angewendet werden soll, wurde das Verfahren für Blutproben in Kombination mit der Anionenaustauschchromatographie-Säule PorosHQ optimiert. Im Folgenden werden die optimierten experimentellen Einzelheiten zur Auftrennung der Tf-Glykoformen aufgeführt.

### 3.3.1. Probenvorbereitung für die Chromatographie

Zur Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung von Seehund-Tf wurden die oben beschriebenen Proben verwendet. Die Probenvorbereitung setzte sich aus zwei Schritten zusammen. Zuerst wurde das Tf vollständig mit Eisen abgesättigt und anschließend die Lipoproteine aus der Probe ausgefällt. Zu allen Probenvorbereitungsschritten wurde die Verdünnung über das Gewicht ermittelt.

#### 3.3.1.1. Sättigung von Transferrin mit Eisen

Die Fe-Sättigung von Tf ist für die Quantifizierung über den Eisengehalt notwendig, da nur so eine einheitliche Stöchiometrie von zwei Fe-Ionen pro Tf-Molekül gewährleistet werden kann. Zum anderen ist sie für die Auftrennung der Tf-Glykoformen mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie wichtig, da so die Ladungsunterschiede ausschließlich auf das Protein zurückzuführen sind und ihren Ursprung nicht in einem unterschiedlichen Beladungsgrad an Eisen haben.

Die Sättigung von Tf in Seehund Blut-Proben wurde in Anlehnung an ein Prozedere, welches bei del Castillo Busto *et al.* (2005; 2006) beschrieben wird, optimiert. Zu 100 µL einer Plasma- oder Serum-Probe wurden 5 µL einer 500 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 5 µL einer 25 mM FeCl<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, gemischt und für 30 min bei RT inkubiert.

#### 3.3.1.2. Lipoproteinfällung

Im Anschluss wurden aus der gesättigten Plasma- bzw. Serum-Probe die Lipoproteine ausgefällt. Diese Lipoproteinfällung geht auf ein, von Jeppsson *et al.* (1993) beschriebenes Verfahren, zurück. Die Entfernung der Lipoproteine erhöht die Langlebigkeit der Chromatographiesäulen und liefert eine bessere Auftrennung der Tf-Glykoformen, da mögliche interferierende hochabundante Matrixkomponenten entfernt werden.

Zur Fällung wurden 5 µL des Fällungsreagenz, bestehend aus 200 mg MgCl<sub>2</sub> und 100 mg Dextransulfat in 1 mL H<sub>2</sub>O zu der mit Eisen gesättigten Probe gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 30 min. Im Folgenden wurde die Probe 10 min bei 4 °C mit 18000 g zentrifugiert und 100 µL des Überstands mit 400 µL eines 20 mM Bis-Tris-Puffers pH 6.5 (Laufmittel A, siehe Kapitel 3.3.3. Tabelle 7) verdünnt und erneut für 5 min bei 4 °C mit 18000 g zentrifugiert. Dieser Überstand wurde im Anschluss für die chromatographische Auftrennung verwendet.

### 3.3.2. Einsatz der SEC für die Ermittlung der zeitabhängigen Sättigungskurve

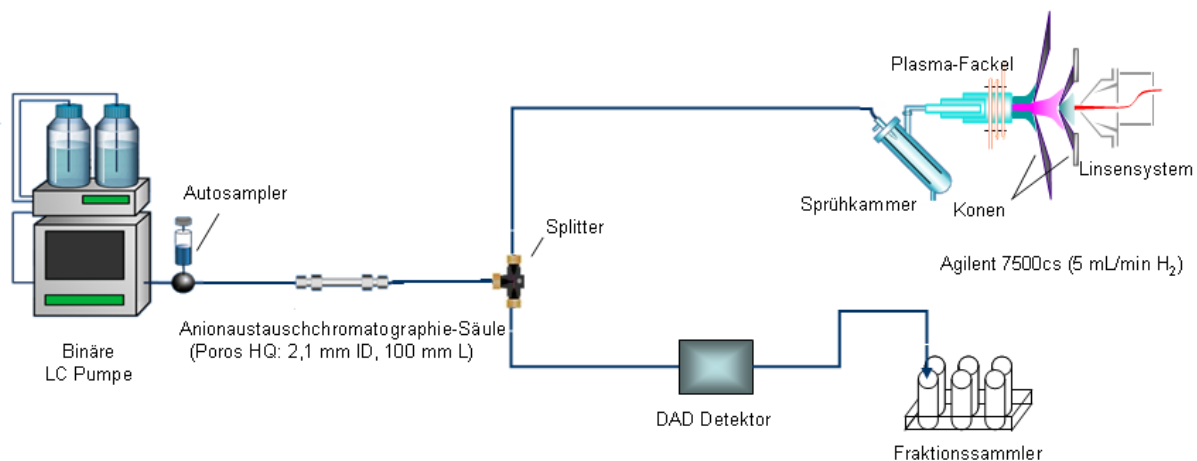
Für die Überprüfung des zeitlichen Verlaufs der Eisen-Sättigung von Tf wurden Vorversuche mit teilweise gesättigtem humanen Tf-Standard durchgeführt. Dazu wurde dieses Tf wie zuvor beschrieben mittels  $\text{FeCl}_3$  mit  $\text{Fe}^{3+}$  gesättigt und direkt im Anschluss mit SEC aufgetrennt. Die eisenspezifische Detektion erfolgte mit einem Agilent 7500s ICP-MS unter Verwendung des  $^{54}\text{Fe}$ -Isotops. Als Ausgangswert wurde die mit SEC-ICP-MS ermittelte Peakfläche des teilweise gesättigten humanen Tf-Standards festgelegt. Im Anschluss wurden die Peakflächen der gesättigten Probe nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bestimmt.

### 3.3.3. Anionenaustauschchromatographie mit anschließender eisenspezifischer Detektion und Fraktionierung

Für die Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*, LC) und die anschließende Detektion wurde ein Agilent 1100 LC-System mit einem Agilent 7500cs ICP-MS gekoppelt.

Dieses LC-System ist modular aufgebaut und besteht aus einer binären LC-Pumpe, einem Vierkanal-Online-Degaser, einem gekühlten automatischen Probengeber (im Folgenden: Autosampler), einem Säulenofen, einem Dioden-Array-UV-Detektor (DAD) mit einer Standard-Flusszelle und einem gekühlten Fraktionssammler. Die Verbindungen wurden mit Polyetheretherketon (PEEK)-Kapillaren von 1/16'' Außendurchmesser (AD) und 125  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser (ID) und passenden PEEK-Verschraubungen hergestellt.

Der instrumentelle Aufbau für die Auftrennung der Tf-Glykoformen mit Anionenaustauschchromatographie und paralleler ICP-MS- bzw. DAD-Detektion mit anschließender Fraktionierung ist in Abbildung 20 schematisch aufgezeigt.



**Abbildung 20:** Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus für die Auftrennung der Tf-Glykoformen mit Anionenaustauschchromatographie und paralleler ICP-MS sowie DAD-Detektion mit anschließender Fraktionierung



Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte unter Verwendung eines starken Anionentauschers (*strong anion exchange*, SAX), der PoroshQ Säule mit einer Partikelgröße von 10  $\mu\text{m}$ .

Als mobile Phase wurde ein 20 mM Bis-Tris Puffer mit pH 6,5 hergestellt. Obwohl bei allen Experimenten Chemikalien der höchsten verfügbaren Reinheit verwendet wurden, trugen die unterschiedlichen Chargen des Bis-Tris zu einem erhöhten Eisenuntergrund bei der ICP-MS-Detektion bei. Um den Untergrund zu reduzieren und damit die eisenspezifische Detektion zu verbessern, wurde eine Abreicherung von mehrfach geladenen Metallionen über ein Ionentauscher-Harz durchgeführt.

Das Ionentauscher-Harz Chelex® 100 wurde mit Wasser aufgeschlämmt, in eine Glassäule gefüllt und mit 1 M  $\text{HNO}_3$ -Lösung regeneriert. Die Füllhöhe des Harzes in der Säule betrug etwa ein Drittel der Säulenhöhe, dies entspricht einem Volumen von etwa 70  $\text{cm}^3$ . Im Anschluss wurde das Säulenmaterial mit Reinstwasser gespült, bis der Durchlauf einen pH-Wert von etwa 7 erreichte. Danach wurde das Harz mit mindestens zwei Säulenvolumina des zu reinigenden Puffers equilibriert. Dabei nahm das Volumen des Harzes um mehr als das Doppelte des Volumens in regeneriertem Zustand zu.

Für den 20 mM Bis-Tris Puffer wurde eine Stammlösung von 200 mM Bis-Tris hergestellt und die Metallionen über das Chelex® 100 Harz abgereichert. Insgesamt konnte so der Eisenuntergrund der verwendeten Puffer reduziert werden. Die Zusammensetzung der Stammlösung sowie der daraus hergestellten Bis-Tris Puffer, als Laufmittel A und mit 500 mM Ammoniumacetat zur Elution der Proteine von der SAX-Säule als Laufmittel B, sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die optimierten Gradientenbedingungen und die verwendeten Parametereinstellungen der HPLC sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Laufpuffer für die SAX-Chromatographie

**Stammlösung: 200 mM Bis-Tris**

Bis-Tris	200 mM	83,3 g
Reinstwasser		<b>2000 g Endvolumen</b>

**Laufmittel A: 20 mM Bis-Tris; pH 6,5**

Bis-Tris (Stammlösung)	20 mM	200 g
$\text{HNO}_3$	pH 6,5	~1300 $\mu\text{L}$
Elementstandard Ge (1 g/L)	10 ppb (10 $\mu\text{g/L}$ )	20 $\mu\text{L}$
Reinstwasser		<b>2000 g Endvolumen</b>

**Laufmittel B: 20 mM Bis-Tris; pH 6,5 + 500 mM Ammoniumacetat**

Bis-Tris (Stammlösung)	20 mM	200 g
Essigsäure	500 mM	60 g
Ammoniaklösung (25 %)	pH 6,5	~ 60 g
Elementstandard Ge (1 g/L)	10 ppb (10 $\mu\text{g/L}$ )	20 $\mu\text{L}$
Elementstandard Cs (1 g/L)	10 ppb (10 $\mu\text{g/L}$ )	20 $\mu\text{L}$
Reinstwasser		<b>2000 g Endvolumen</b>

**Tabelle 8:** Optimierte HPLC-Parameter für die SAX-Chromatographie von Tf**HPLC Agilent 1100**

SAX Säule	PorosHQ, 2,1 mm x 100 mm, 10 µm Partikel	
Mobile Phase	A: 20 mM Bis-Tris, pH 6,5, 10 µg/L Ge B: 20 mM Bis-Tris, 500 mM Ammoniumacetat, pH 6,5; 10 µg/L Ge, Cs	
Injektionsvolumen	50 µL	
Fluss	0,75 mL/min	
Säulenofen	30°C	
UV-Detektion	280 nm, 460 nm	
Gradient	Zeit [min]	Puffer B [%]
	0	0
	2	0
	26	12
	33	12
	35	100
	41	100
	45	0
	50	0

Nach der Chromatographiesäule wurde der Fluss geteilt, um eine parallele Detektion zu ermöglichen. Als Splitter wurde ein T-Stück verwendet, die Kapillare zur ICP-MS hatte einen ID von 125 µm während die Kapillare zum UV-Detektor einen ID von 1 mm hatte. Dadurch ergab sich ein Splittverhältnis von etwa 1:1. Die UV-Detektion erfolgte bei 280 nm und 460 nm zusätzlich zur elementspezifischen Detektion mittels ICP-MS.

Das hauptsächlich eingesetzte Agilent 7500cs ICP-MS besitzt einen axialen Oktopol, der als Reaktionszelle eingesetzt wurde. Um die polyatomaren Interferenzen zu reduzieren (im Fall von  $^{56}\text{Fe}$  interferieren  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  und  $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ ), wurde  $\text{H}_2$  mit einer Flussrate von 5 mL/min als Reaktionsgas eingesetzt. Zusätzlich wurde eine kinetische Energiediskriminierung durch die Einstellungen des Oktopol- und Quadrupol-Bias erreicht. Die ICP-MS Einstellungen sind im Einzelnen in Tabelle 9 aufgelistet.

Für die Kopplung der HPLC mit dem ICP-MS wurde ein konzentrischer PFA 100 µFLOW-Zerstäuber zusammen mit einer serienmäßigen Quarz Scott-Sprühkammer eingesetzt.

Für weitere Untersuchung wurden die, nach der UV-Detektion gesammelten Fraktionen mit Ultrafiltrationseinheiten Vivaspin 6 mit einer Durchlässigkeit bis zu 10 kDa (*molecular weight cut off*, MWCO) bei 4 °C und 6 000 g filtriert. Die Proben wurden durch Spülen mit dem dreifachen Probenvolumen an Reinstwasser entsalzt und gleichzeitig aufkonzentriert. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -28 °C.

**Tabelle 9:** ICP-MS Einstellungen für die eisenspezifische Detektion von Tf aus Seehund-Blutproben bei Kopplung mit SAX-HPLC**ICP-MS Agilent 7500cs (Zeitaufgelöste Analyse)**

RF Energie	1600 W
Trägergas	0,85 - 0,95 L/min (Argon)
Makeup Gas	0,20 - 0,30 L/min (Argon)
Sprühkammertemperatur	4 °C
Linse: Extrakt 1	4 - 6,5 V
Linse: Extrakt 2	- 180 V
Octopol Bias	- 18 V
Quadrupol Bias	- 16 V
Reaktionsgas	5 mL/min H <sub>2</sub>
Peak-Muster	TRA (1) ( <i>time resolved analysis</i> )
Integrationszeit	0,1 Sek
Gemessene Isotope	Cr 53 m/z
	Fe 54 m/z, 56 m/z, 57 m/z, 58 m/z
	Ni 60 m/z
	Ge 72 m/z
	Cs 133 m/z

**3.3.4. Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) wurde im Vorfeld eine Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteingehaltes in der entsprechenden Probe mit einem Bradford-Test durchgeführt (Bradford 1976). Der Bradford-Test basiert auf der Reaktion des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit den basischen Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Die Bildung des Protein-Farbstoff-Komplexes bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Der Test wurde nach der Anleitung des Microtiterplatten-Testprotokolls des Herstellers des Farbstoffkomplexes mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Als Standard für die Kalibrierkurve wurde bovines Serumalbumin (BSA) in 10 Verdünnungen von 0,1 - 1 mg/L hergestellt. Zu 5 µL der Probe bzw. des Proteinstandards wurden 250 µL des Bradford Reagenz zugegeben und für ca. 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung des Protein-Farbstoff-Komplexes bei 595 nm. Der lineare Bereich bei der photometrischen Detektion lag zwischen 0,1 und 1 für die Absorption. Der Bradford-Test wird durch Detergenzien wie SDS und CHAPS gestört, ist jedoch kompatibel mit reduzierenden Reagenzien sowie leicht und schnell durchzuführen.

Für die 2D-GE wurden Gel-Streifen mit einem linear immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) in den Bereichen pH 3 - 10 und pH 5 - 8 in entsprechender Länge des jeweiligen Gels eingesetzt. Vorgefertigte 10%ige Tris-HCl Gele von BioRad wurden für die IPG-Streifen

von 11 cm Länge verwendet. Die 24 cm Gele für die PROTEAN Plus Dodeca Zelle wurden selbst gegossen. Der Zusammenbau der Kammer erfolgte entsprechend der Bedienungsanleitung abwechselnd mit einer trennenden Plastikfolie und einer Glasplatte für die Gele. Für 12 Gele wurde ein Gesamtvolumen von etwa 900 mL der 12%igen Acrylamid-Lösung in Tris-HCl Puffer benötigt. Die Zusammensetzung für 12%ige Tris-HCl Gele ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der selbst gegossenen 12%igen Tris-HCl-Gele

<b>12%ige Tris-HCl Gele</b>		
Endkonzentration	Volumen	Stammlösung
12 % Acrylamid/Bis-Acrylamid	360 mL	30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)
0,375 M Tris-HCl	225 mL	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	300 mL	Reinstwasser
1 % SDS	9 mL	10 % SDS
0,025 % TEMED	225 µL	TEMED
0,05 % APS	4,5 mL	APS 10 %

Die Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung wurde mit Tris-HCl-Puffer und Reinstwasser gemischt und, da Sauerstoff die Polymerisation beeinträchtigt, für ca. 1 h entgast. Im Anschluss wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie die Initiatoren der Polymerisation N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) zugegeben. Die Lösung wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und direkt in die vorbereitete Gelgießkammer gegossen. Die Gele wurden zum Abschluss mit Wasser gesättigtem Butanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Durch die gewählte Zusammensetzung aus Acrylamid und Bis-Acrylamid (29 + 1) ergibt sich eine Quervernetzung von 3,3 %. TEMED, ein tertiäres Amin, katalysiert die Bildung von freien Radikalen aus APS, welche dann die Polymerisation von Acrylamid und Bis-Acrylamid einleiten. Nach der vollständigen Polymerisation über Nacht wurden die Gele verwendet.

Für die IPG-Streifen mit der Länge von 11 cm wird eine maximale Proteinbeladung von 100 - 200 µg Protein in einem Volumen von 200 µL vom Hersteller empfohlen. Für die 24 cm langen IPG-Streifen entsprechend 400 - 800 µg Protein in 450 µL. Dazu wurden die Proben auf das entsprechende Volumen mit Rehydratisierungspuffer verdünnt. Die Zusammensetzung des Rehydratisierungspuffers ist in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des Rehydratisierungspuffers für die Probenaufgabe auf die IPG-Streifen

<b>Rehydratisierungspuffer</b>		
Harnstoff	8 M	4,8 g
CHAPS	2 % (w/v)	0,2 g
Bio-Lyte® 3/10, 100fach	0,2 % (v/v)	5 µL
Bromphenol Blau	0,001 % (v/v)	10 µL (1%ige Lösung)
Reinstwasser		<b>10 mL Endvolumen</b>
in 600 µL Aliquote aufteilen und bei -20 °C lagern		
DTT	70 mM	6,5 mg (für 600 µL)

Der Rehydratisierungspuffer enthält Harnstoff zur Denaturierung und Lösung der Proteine. 3-((3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio)-1-propansulfonat (CHAPS) ist ein zwitterionisches Detergens, welches ebenfalls zur Lösung der Proteine beiträgt. Dithiothreitol (DTT) reduziert die Disulfidbrücken, die enthaltenen Ampholyte stabilisieren den pH-Gradienten der IPG-Streifen und das enthaltene Bromphenol Blau dient als Marker für die Lauffront während der Trennung.

Die in Rehydratisierungspuffer vorliegenden Proben mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 200 µL wurden in jeweils einen Kanal des Trogs für die isoelektrische Fokussierung (IEF) pipettiert. Die IPG-Streifen wurden nach Entfernen der Schutzfolie mit der Gelseite nach unten in den jeweiligen Kanal blasenfrei auf die Probe gelegt. Anschließend erfolgten die Überschichtung der Streifen mit Mineralöl und die aktive Rehydratisierung bei 50 V für 16 h.

Nach der Rehydratisierung wurde das Mineralöl entfernt und in jeden Kanal auf beide Elektroden ein in Reinstwasser getauchtes Filterpapierstück (0,5 x 1 cm) unter die rehydratisierten IPG-Streifen gelegt. Danach wurden die IPG-Streifen erneut mit Mineralöl bedeckt. Die Fokussierung erfolgte für die 11 cm Gele in nur einem Schritt und für die 24 cm Gele in einem mehrstufigen Prozess. Die Fokussierungsbedingungen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12:** Bedingungen für die Isoelektrische Fokussierung von 11 cm und 24 cm IPG-Streifen

<b>Isoelektrische Fokussierung</b>			
<b>11 cm IPG Streifen</b>			
Stufe 1	8 000 V	30 000 V*h	rapid
<b>24 cm IPG Streifen</b>			
Stufe 1	200 V	1 h	rapid
Stufe 2	500 V	1 h	rapid
Stufe 3	1 000 V	1 h	rapid
Stufe 4	10 000 V	1 h	linear
Stufe 5	10 000 V	40 000 V*h	rapid

Nach der Fokussierung wurden die IPG-Streifen in einem Equilibrierungs-Tray zuerst für 15 min in je 2 mL (11 cm) bzw. 6 mL (24 cm) Equilibrierungspuffer I auf einem Schüttler inkubiert. Darauf erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min mit Equilibrierungspuffer II, ebenfalls bei gleichmäßigem Durchmischen. Die Zusammensetzung der beiden Puffer für die Equilibrierung ist in Tabelle 13 verzeichnet.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers I und II

<b>Equilibrierungspuffer</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	
Tris-HCl Puffer pH 8,8	0,375 M	0,375 M	50 mL
Harnstoff	6 M	6 M	72,07 g
SDS	2 % (w/v)	2 % (w/v)	4,0 g
Glycerol	30 % (v/v)	30 % (v/v)	60 mL
Reinstwasser			<b>200 mL Endvolumen</b>
in 10 ml Aliquots aufteilen und bei -20 °C lagern			
DTT	130 mM	---	200 mg (für 10 mL)
IAA	---	135 mM	250 mg (für 10 mL)

Durch das DTT werden noch verbliebene oder wieder geschlossene Disulfidbrücken gespalten und durch das Iodoacetamid (IAA) erfolgt eine Alkylierung der Cysteinreste. Die Carboxyamidomethylierung des Cysteinschwefels bewirkt eine irreversible Zerstörung der Disulfidbrücken. Als Nebenreaktion der Alkylierung mit IAA werden auch der N-Terminus und das Lysin-NH<sub>2</sub> alkyliert. Nach der Equilibrierung wurden die IPG-Streifen mit SDS-Laufpuffer gespült, um die verbliebenen Reagenzien abzuwaschen. Die enthaltenen Komponenten des SDS-Laufpuffers sind in Tabelle 14 aufgelistet.

**Tabelle 14:** Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers für die Gelelektrophorese

<b>SDS-Laufpuffer</b>		
Tris-base	25 mM	3,03 g
Glycin	192 mM	14,4 g
SDS	0,5 % (w/v)	1,0 g
<b>1000 ml Endvolumen</b>		

Agarose wurde bei 95 °C im Heizblock geschmolzen und verwendet, um die IPG-Streifen in der Geltasche zu fixieren. Der Molekulargewichts-Marker PageRuler® (*molecular weight* Marker, MW-Marker) wurde für die selbst gegossenen 24 cm Gele auf ein Filterpapierstück (0,5 cm x 1 cm) pipettiert (5 µL) und dann mit 10 µL flüssiger Agarose eingebettet. Dieses Filterpapierstück wurde in der rechten Ecke der Geltasche ebenfalls mit Agarose befestigt. Anschließend wurde die gesamte Geltasche mit verflüssigter Agarose überzogen. Bei den fertigen 11 cm Tris-HCl Gelen wurden 3 µL des MW-Markers in die dafür vorgesehene

separate Tasche pipettiert. Der IPG-Streifen wurde, wie bei den 24 cm Gelen, in die große Tasche in Agarose gebettet, um den direkten Kontakt zum Gel zu gewährleisten.

Die Auftrennung der Proteine nach der Größe (2. Dimension) erfolgte durch Anlegung einer elektrischen Spannung mit einem PowerPac 3000 bzw. 300. Für die 24 cm Gele wurde ein zweistufiger Prozess gewählt, während die Auftrennung der 11 cm Gele in einer Stufe konstant bei 200 V erfolgte (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Einstellungen für die Auftrennung in der 2. Dimension der Gelelektrophorese

**Gelelektrophorese - 2. Dimension**

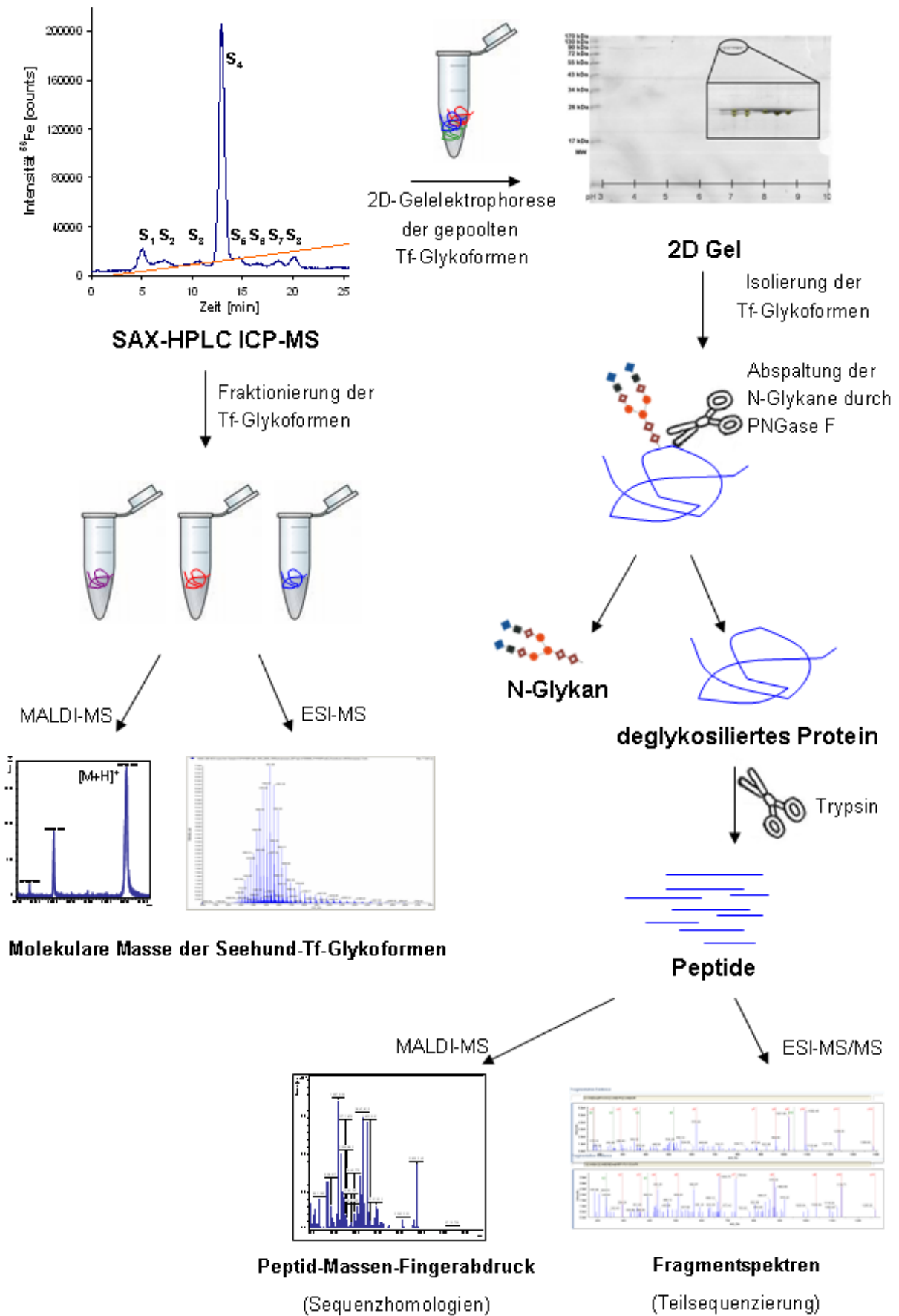
11 cm Gele (PowerPac 300) CRITERION® Zelle

Stufe 1	200 V (konst.)	400 mA	250 W	55 min
24 cm Gele (PowerPac 3000) PROTEAN Plus Dodeca Zelle				
Stufe 1	1 000 V	16 mA/Gel (konst.)	250 W	1 h
Stufe 2	80 V (konst.)	30 mA/Gel	250 W	26 h

Nach der Auftrennung wurden die Gele angefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Die Gele wurden für 1 h mit einer 20 % Methanol / 1 % Phosphorsäure-Lösung fixiert und im Anschluss mit Coomassie-Färbelösung (20 % Methanol / 20 % Coomassie® Brilliant Blue-Lösung) über Nacht angefärbt. Um die Hintergrund-Färbung zu reduzieren, wurden die Gele abschließend mit einer 25 % Methanol-Lösung für wenigstens 15 min gewaschen. Die Fixierung, Färbung und Entfärbung erfolgte für die 11 cm Fertiggele in einer Plastikschaale. Die Inkubation wurde unter leichtem Schwenken der Schalen auf einem Schüttler durchgeführt. Die 24 cm Gele wurden in dem Dodeca™ Stainer fixiert, gefärbt und entfärbt.

### 3.4. Identifizierung und Charakterisierung des Seehund-Transferrins

Die Identifizierung von Tf des Seehundes erfolgte über eine Indizienkette zur Bestätigung der These, dass Seehund-Tf homolog zu Tf anderer Säugetierspezies ist. Dazu wurden die Eigenschaften des Proteins analytisch erfasst und im Hinblick auf Homologien mit Tf bekannter und sequenzierter Säugetier-Spezies verglichen. Für die Beschreibung struktureller Eigenschaften von Seehund-Tf wurden verschiedene Experimente mit molekulspezifischer Massenspektrometrie (siehe Kapitel 2.4.) durchgeführt, einerseits für das Gesamtprotein andererseits für Teilstücke des Seehund-Tfs. Der Abbau von Tf in Peptide bzw. die Abspaltung von Glykaneinheiten erfolgte durch Hydrolyse-Reaktionen katalysiert durch verschiedene spezifische Enzyme. In Abbildung 21 ist die methodische Vorgehensweise zur Identifizierung und Charakterisierung des Seehund-Tfs schematisch aufgezeigt.



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der verwendeten Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Seehund-Tf



### 3.4.1. Enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Seehund-Transferrin

Um Strukturinformationen über ein Protein zu erhalten ist es sinnvoll, das Gesamtprotein in einzelne Bruchstücke zu unterteilen und diese separat zu betrachten. Da es sich bei Tf um ein Glykoprotein handelt, erfolgte eine erste wichtige Unterteilung durch die Abspaltung des Zuckeranteils von dem Protein. Das Proteinerückgrat wiederum kann mit sehr spezifischen Enzymen in charakteristische Peptide gespalten werden. Die Natur hat eine Vielzahl an unterschiedlichen zuckerabspaltenden und proteinspaltenden Enzymen hervorgebracht. In dieser Arbeit wurden Peptid N-Glykosidase aus *Flavobacterium meningosepticum* (PNGaseF) und Neuraminidase für unterschiedliche Zuckerabspaltungen sowie Trypsin für den proteolytischen Verdau verwendet.

#### 3.4.1.1. Tryptischer In-Gel-Verdau mit Abspaltung der N-Glykane durch PNGaseF

Die Spaltung des Proteins durch Trypsin erfolgt spezifisch nur auf der carboxyterminalen Seite von Arginin und Lysin, also nach Arg (R) und Lys (K).

Das Protein in den Gelspots lag nach der oben beschriebenen Durchführung der 2D-SDS-Gelelektrophorese in denaturierter Form vor und die Cysteine waren carbamidomethyliert. Die entsprechenden Gelspots wurden mit einem Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten und im Anschluss analog der Vorschrift des GlycoProfil™ Kit von Sigma verdaut.

Zuerst wurden die Gelspots mit 200 µL einer 200 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung in 40 % Acetonitril bei 37 °C für 30 min entfärbt. Dieser Arbeitsschritt wurde noch mindestens zweimal wiederholt, bis die Gelspots erkennbar nicht mehr blau eingefärbt waren. Im Anschluss wurden die entfärbten Gelspots in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zu jedem Gelspot wurden 10 µL (entspricht 5 U (Sigma) PNGaseF) der PNGaseF-Lösung (50 U (Sigma) in 5 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Gelspot mit 20 µL Reinstwasser bedeckt und für weitere 16 - 18 h inkubiert.

Nach dem PNGaseF-Verdau wurde die PNGaseF-Lösung mit den darin enthaltenen abgespaltenen N-Glykanen von den Gelspots abpipettiert. Die Gelspots wurden mit 200 µL Reinstwasser für 30 min im Ultraschallbad gewaschen und die Waschlösung abpipettiert. Nach drei weiteren Wiederholungen des Waschschriffs wurden die Gelspots erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zu den getrockneten Gelspots wurden 20 µL (entspricht 0,4 µg Trypsin) der vorbereiteten Trypsin-Lösung (20 µg/mL Trypsin in 0,1 mM HCl, 36 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 8,1 % Acetonitril) gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µL des Reaktionspuffers (40 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 9 % Acetonitril) hinzugefügt und bei 37 °C über Nacht (mind. 16 h) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand mit den verdauten Peptiden in ein neues 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die

Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  einer Extraktionslösung (0,1 % TFA in 50 % Acetonitril) zu den Gelspots erfolgte, um bei 37 °C für 30 min die in der Gelmatrix verbliebenen Peptide zu extrahieren. Die Extraktionslösung wurde mit dem Überstand aus dem Trypsinverdau vereint und auf etwa 10  $\mu\text{L}$  in der Vakuumzentrifuge eingeeengt.

#### 3.4.1.2. Abspaltung der N-Glykane mit PNGaseF

Zu den häufigsten und wichtigsten posttranslationalen Modifikation von Proteinen zählen Glykosylierungen, es wird zwischen O-Glykane und N-Glykane unterschieden. Die O-Glykane sind an den Sauerstoff der Hydroxygruppe von Serin (Ser, S) und Threonin (Thr, T) gebunden, wohingegen die N-Glykane mit dem Stickstoff von Asparagin (Asn, N) verbunden werden. Für die N-Glykosylierung muss ein Bindungsmotiv aus drei bestimmten Aminosäuren (Asn-X-Ser/Thr) innerhalb der Aminosäuresequenz vorhanden sein.

Für den PNGaseF-Verdau der Tf-Glykoformen, die in den gesammelten Fraktionen enthalten sind, muss das Protein zuerst denaturiert werden, so dass PNGaseF die Schnittstelle zwischen dem Asparagin des Proteinrückgrats und dem ersten N-Acetylglucosamin (GlcNAc) des N-Glykans erreichen kann. Dazu wurde die Proteinlösung für 10 min auf 99 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurden zu 50  $\mu\text{L}$  der denaturierten Proteinlösung 50  $\mu\text{L}$  40 mM Ammoniumhydrogencarbonat als Reaktionspuffer und 10  $\mu\text{L}$  (entspricht 5 U (Sigma) PNGaseF) der rekonstituierten PNGaseF-Lösung (50 U in 5 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) zugefügt. Die Reaktivität des Enzyms wurde nach einer Inkubation bei 37 °C für 4 h durch erneutes Heizen der Probe auf 99 °C gestoppt.

Im Anschluss wurde der Verdau ultrafiltriert, zuerst mit Ultrafiltrationseinheiten mit einem MWCO von 50 kDa, um das Tf von den Glykanen und der PNGaseF zu trennen. Der resultierende Durchfluss wurde erneut unter Verwendung einer 30 kDa MWCO Ultrafiltrationseinheiten ultrafiltriert, um die PNGaseF von den N-Glykanen zu separieren. Die N-Glykane im Durchfluss wurden nachfolgend eingefroren und in der Vakuumzentrifuge eingeeengt.

#### 3.4.1.3. Sialinsäure-Abspaltung durch Neuraminidase

Die verwendete  $\alpha(2\rightarrow3,6,8,9)$ Neuraminidase von *Arthrobacter ureafaciens* spaltet alle endständigen N-Acetylneuraminat-Reste (Sialinsäure, NeuAc) durch Hydrolysieren der  $\alpha(2\rightarrow6)$ ,  $\alpha(2\rightarrow3)$ ,  $\alpha(2\rightarrow8)$  und  $\alpha(2\rightarrow9)$  Bindungen (Affinität in der angegebenen Reihenfolge) von Oligosacchariden ab.

10  $\mu\text{L}$  (entspricht 5 U (Sigma)) des rekonstituierten Enzyms wurden direkt zu 100  $\mu\text{L}$  Seehund-Serum gegeben. Die Hydrolyse wurde bei 37 °C für verschiedene Inkubationszeiten durchgeführt. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  500 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

gestoppt, so dass direkt im Anschluss die notwendige Probenvorbereitung (Kapitel 3.3.1.) für die HPLC-ICP-MS Analyse erfolgte.

### 3.4.2. Einsatz von molekülspezifischer Massenspektrometrie zur Charakterisierung und Identifizierung von Seehund-Transferrin

#### 3.4.2.1. MALDI-TOF-MS

Es wurde ein Bruker Ultraflex II MALDI-TOF-TOF-MS, ausgestattet mit einem 200 Hz-Laser, verwendet. Als MALDI-Target wurde ein AnchorChip™ 600/384 eingesetzt.

Eine Reinigung des Targets erfolgte vor jedem Gebrauch. Dazu wurde es mit Methanol gespült und alte Matrixreste mit einem Methanol befeuchteten fusselfreien Papiertuch abgewischt. Hartnäckige  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA)-Matrixreste wurden zusätzlich mit einem Aceton befeuchteten Tuch entfernt. Anschließend wurde das Target für 5 min in Methanol und 5 min in Reinstwasser im Ultraschallbad gereinigt. Nach dem Spülen mit Reinstwasser wurde das Target in einem Stickstoffgasstrom getrocknet.

Die Präparation der Proben erfolgte direkt auf dem Target, zusammen mit der jeweiligen Matrix. Zur Bestimmung der Masse von Seehund-Tf (20 000 - 100 000  $m/z$ ) wurde eine Sinapinsäure-Matrix gewählt. Für die Peptide im Massenbereich von 400 - 4400  $m/z$  wurden die Proben mit einer HCCA-Matrix präpariert. Die Zusammensetzung der verwendeten Matrices und Lösungen sowie deren Präparation sind in Tabelle 16 zusammengestellt.

**Tabelle 16:** Probenpräparation für MALDI-MS auf einem AnchorChip™ 600/384 mit den verwendeten Matrices und Lösungen

<b>Proteine:</b>		<b>Sinapinsäure</b>	
Matrix		Sinapinsäure	in Acetonitril / 0,1 % TFA (9:1)
Stammlösung	gesättigte	Sinapinsäure	in Acetonitril
Präparation	0,5 $\mu$ L	Analyt-Lösung	
	0,5 $\mu$ L	Matrix	zusammen trocknen lassen
Waschen	1 $\mu$ L	0,1 % TFA	nach 5-10 s entfernen, Kristall trocknen lassen
Rekristallisieren	0,5 $\mu$ L	Matrix	
(optional)	0,5 $\mu$ L	Ethanol / Aceton / 0,1 % TFA (6:3:1)	
<b>Peptide:</b>		<b>HCCA</b>	
Matrix	0,3 g/L	HCCA	in Ethanol / Aceton (2:1)
Stammlösung	1 g/L	HCCA	in Aceton
Präparation	0,5 $\mu$ L	Analyt-Lösung	
	1 $\mu$ L	Matrix	zusammen trocknen lassen
Waschen	1 $\mu$ L	10 mM Ammoniumphosphat in 0,1 % TFA (5-10 s),	trocknen lassen
Rekristallisieren	1 $\mu$ L	Ethanol / Aceton / 0,1 % TFA (6:3:1)	

Die Massenkalisierung erfolgte als externe Kalibrierung (*near neighbour mass calibration*) mit einem Gemisch aus verschiedenen Proteinen bzw. Peptiden. Als Standard für die

Proteinproben wurde der Protein Calibration Standard 1 (Trypsinogen, Protein A, BSA) von Bruker verwendet. Für die Peptidanalytik wurde der Peptid Calibration Standard 2 (Angiotensin II, Angiotensin I, Substanz B, Bombesin, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, Somatostatin 28) nach dem Protokoll in Tabelle 16 präpariert. Die Messungen erfolgten für Proteine im linearen Modus und für Peptide im Reflektor-Modus.

Durch die Hydrolyse von genau festgelegten Peptidbindungen in der Aminosäuresequenz sind die tryptischen Peptide für jedes Protein spezifisch. Dieser spezifische Fingerabdruck der Peptidmassen (*peptide mass fingerprint*, PMF) kann mit Hilfe von Suchalgorithmen mit den Sequenzinformationen von homologen Proteinen anderer Tierspezies, die in Datenbanken vorliegen, abgeglichen werden. Die MALDI-MS Daten der tryptischen Peptide von Tf aus Seehunden wurden mit dem Mascot Suchalgorithmus auf homologe Entsprechungen in Proteinsequenzen anderer Säugetierspezies untersucht. Dieser Interspezies-Vergleich wird auch als *Cross-species*-Protein-Identifizierung bezeichnet. Durch eine online Mascot-Suche<sup>[2]</sup> wurden die experimentell bestimmten Peptidmassen auf Übereinstimmungen mit *in silico* Verdauen von Proteinen, die in Datenbanken hinterlegt sind, abgeglichen. Die verwendeten Einstellungen der Suchparameter sind in Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 17:** Verwendeten Suchparameter für die *Cross-species*-Protein-Identifizierung mit dem Mascot Algorithmus über die tryptischen Peptide von Seehund-Transferrin

Suchparameter	Einstellung
Algorithmus	Mascot
Taxonomie	andere Säugetiere
Datenbank	SwissProt
Enzym	Trypsin
Globale Modifikation	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikation	Oxidation (M)
übergangene Schnittstellen	1
Massentoleranz	50 ppm
Wert der Massen	MH <sup>+</sup> , monoisotopisch

#### 3.4.2.2. ESI-qTrap-MS und ESI-qTrap-MS/MS

Die ESI-MS Experimente wurden mit einer Applied Biosystems 4000 QTrap durchgeführt. Für die Proteinanalytik erfolgte die Probenzufuhr über einen statischen Nanospray, während die tryptischen Peptide mit Hilfe einer nano-LC-ESI-QTrap Kopplung untersucht wurden. Die mit Ultrafiltration (MWCO 10 kDa) entsalzten Protein-Fractionen wurden mit 10 % Acetonitril in 0,1%iger Ameisensäurer Lösung 10fach verdünnt und einige µL der Probe mit „GELoader“-Pipettenspitzen in metallbeschichtete Einweg-Borsilicat-Kapillaren pipettiert. An der Kapillare lag eine Hochspannung von 1400 V an. Durch Verwendung einer gasdichten Spritze mit fixierbarem Kolben wurde ein leichter Überdruck auf den statischen nanospray

Kopf ausgeübt, so dass das Sprayverhalten verbessert und ein konstantes Signal erhalten wurde.

Die verwendeten Geräteparameter für die ESI-MS Messungen, die über die verwendete Analyst Software von Applied Biosystems eingestellt wurden, sind in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18:** Parameter für die ESI-MS Messungen in der Analyst Software von Applied Biosystems

**ESI-MS Applied Biosystems 4000 QTrap**

Ionen Quelle	Nanospray
Scan Typ	EMS, positiv
Scan Bereich	1000 - 2800 amu
Spritzenpumpe	10 mL Hamilton Spritze (ID 4,61 mm)
Fluss	10,0 µL/min (max)
Curtain-Gas	10,0 a.u. N <sub>2</sub>
Kollisionsgas	hoch
Spannung Zerstäuberkapillare	1400 V (500 V zum Öffnen der Kapillare)
Gas Ionenquelle I	0,0 a.u. N <sub>2</sub>
Gas Ionenquelle II	0,0 a.u. N <sub>2</sub>
Interface Temperatur	60 °C

Für die ESI-MS/MS Experimente wurde das Massenspektrometer mit einer nano-LC gekoppelt. Zur Auftrennung der tryptischen Peptide wurde eine Dionex PepMap C18 Säule (75 µm x 150 mm), unter Verwendung eines Gradient von 5 - 50 % Acetonitril in 0,1 % Ameisensäure über 40 min, eingesetzt. Als Kollisionsgas für die CID diente Stickstoff.

Die erhaltenen ESI-MS-MS Daten wurden mit der ProteinPilot Software von Applied Biosystems ausgewertet und mit Datenbank Fragmentspektren abgeglichen (Tabelle 19). Zusätzlich wurde eine MS-Blast Analyse der ermittelten Peptidsequenzen mit einem entsprechenden Algorithmus verfügbar über UniProtKB/Swiss-Prot<sup>[3]</sup> durchgeführt.

**Tabelle 19:** Verwendete Suchparameter zum Abgleich der Fragmentspektren der tryptischen Peptide mit Datenbank-Fragmentspektren

Suchparameter	Einstellung
Algorithmus	Paragon
Taxonomie	andere Säugetiere
Datenbank	SwissProt
Enzym	Trypsin
Globale Modifikation	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikation	Oxidation (M), Deaminierung (N/Q)
übergangene Schnittstellen	1
Massentoleranz (Peptide)	50 ppm
Massentoleranz (Fragmente)	0,8 Da
Wert der Massen	MH <sup>+</sup> , monoisotopisch

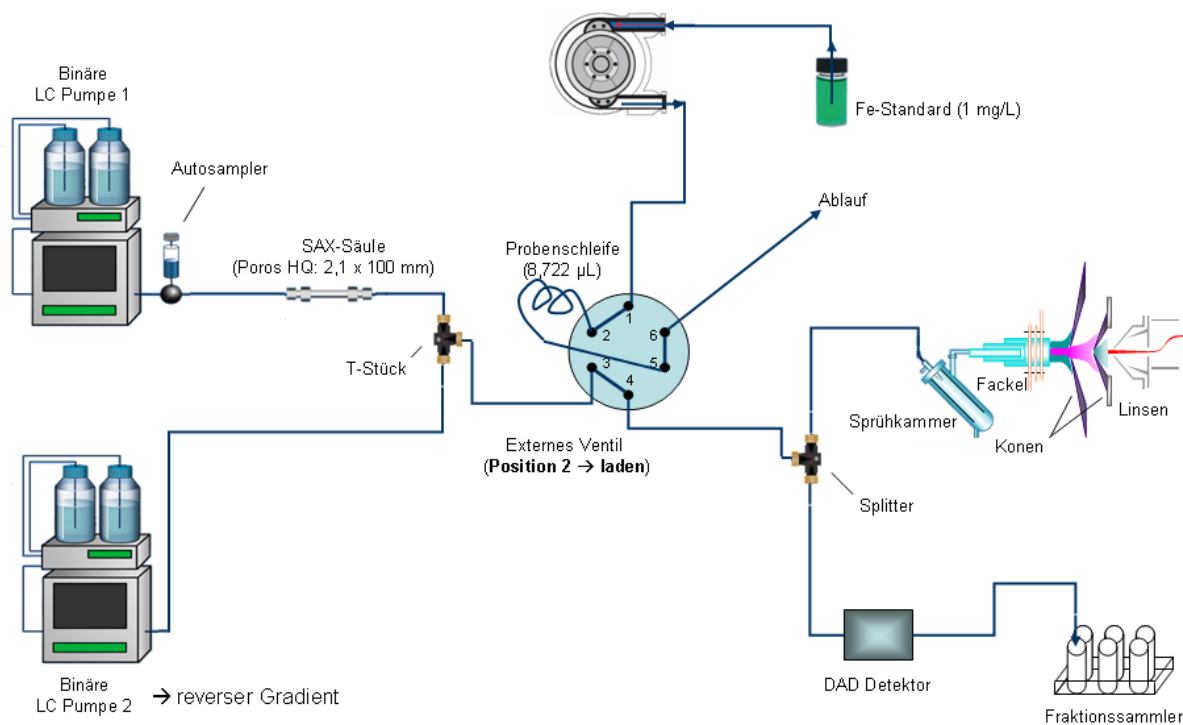
### 3.5. Entwicklung einer Methode zur absoluten Quantifizierung von Transferrin über eine 1-Punkt-Kalibrierung mittels Flussinjektion

Die Quantifizierung von Tf erfolgte über die gebundenen Eisenionen als natürlicher Marker unter Verwendung einer HPLC-ICP-MS Kopplung. Bei der Probenvorbereitung wurde das Tf mit  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen gesättigt, so dass eine stabile Stöchiometrie von zwei Fe pro Tf-Molekül erreicht wurde.

Die Methodik der ICP-MS eignet sich mit ihrem weiten linearen Detektionsbereich sehr gut zur absoluten Quantifizierung mittels 1-Punkt-Kalibrierung über Flussinjektion (*flow injection analysis, FIA*). Der Einsatz von Gradientenbedingungen während der chromatographischen Trennung erfordert die Kompensation von Matrixeffekten, die sich aufgrund der gradientenbedingten Änderungen im Plasma ergeben (siehe auch Kapitel 2.5.1.).

#### 3.5.1. Instrumenteller Aufbau für die absolute Quantifizierung von Transferrin mit FIA unter Verwendung einer Gradienten-Kompensation

Für die absolute Quantifizierung mit 1-Punkt-Kalibrierung über Flussinjektion wurde zusätzlich zu dem genannten Aufbau in Kapitel 3.3.3. eine zweite HPLC-Pumpe eingesetzt, welche nach der Chromatographiesäule in den Fluss eingekoppelt wurde. Sie diente der Erzeugung eines Flusses mit gegenläufigem Gradienten. Der gesamte instrumentelle Aufbau für die Gradienten-Kompensation bei der FIA ist in Abbildung 22 schematisch aufgezeigt.



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung des instrumentellen Aufbaus für die absolute Quantifizierung mit FIA und Gradienten-Kompensation

Zur Erzeugung der Flussinjektion wurde ein externes 6-Kanal-Ventil mit elektronischer Schaltung eingesetzt. Die Steuerung des externen Ventils erfolgte über die HPLC ChemStation, unter Verwendung einer programmierbaren Relaykarte und eignete sich somit für eine automatisierte Analyse. Die Probenschleife bestand aus einer inerten PEEKsil-Kapillare mit einem ID von  $200 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$  und einer Länge von 200 mm. PEEKsil-Kapillaren sind Quarz-Kapillaren mit einer PEEK-Ummantelung, sie kombinieren die chemische Kompatibilität von Quarz mit der mechanischen Stabilität von PEEK.

Die Flussinjektion für die 1-Punkt-Kalibrierung erfolgte mit einem 1 mg/mL Fe-Standard. Über die peristaltische Pumpe des ICP-MS wurde die Probenschleife des externen Ventils kontinuierliche durchspült. Über die Schaltung des Ventils wurde das gesamte Probenschleifenvolumen in den Fluss der HPLC nach der Chromatographiesäule injiziert.

Die verwendeten Gradienten-Einstellungen für die Quantifizierung des humanen Referenzmaterials (ERM<sup>®</sup>-DA470k/IFCC) und für die Seehund-Blutproben sind in Tabelle 20 zusammengefasst, ebenso die entsprechenden Schaltungen des externen Ventils für die Flussinjektionen.

**Tabelle 20:** Gradienten-Bedingungen für die FIA-Quantifizierung und Schaltung des externen Ventils für das humane Referenzmaterial (ERM<sup>®</sup>-DA470k/IFCC) und für Seehund-Blutproben

Einstellungen für das human Referenzserum (ERM <sup>®</sup> -DA470K/IFCC)				
Zeit [min]	Pumpe 1 [%B]	Pumpe 2 [%B]	Zeit [min]	Kontakt externes Ventil
0	0	30		
2	0	30		
22	30	0	21	closed = inject
			22	open = load
			24	closed = inject
			25	open = load
			27	closed = inject
28	30	0	28	open = load
30	100	0		
35	100	0		
40	0	30		
45	0	30		
Einstellungen für Seehund-Blutproben				
Zeit [min]	Pumpe 1 [%B]	Pumpe 2 [%B]	Zeit [min]	Kontakt externes Ventil
0	0	12		
2	0	12		
26	12	0	26	closed = inject
			27	open = load
			29	closed = inject
			30	open = load
			32	closed = inject
33	12	0	33	open = load
35	100	0		
41	100	0		
45	0	12		
50	0	12		

### 3.5.2. Bestimmung des Probenschleifen-Volumens

Als Probenschleife wurde eine PEEKsil-Kapillare ( $200 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m} \times 200 \text{mm}$ ) verwendet. Diese hat nach den genannten Abmessungen ein theoretisches Volumen von  $6,283 \mu\text{L} \pm 0,318 \mu\text{L}$  zuzüglich des Totvolumens aus den Kanälen des externen Ventils. Vorversuche haben gezeigt, dass bei Verwendung des theoretischen Probenschleifen-volumens nur ungenaue quantitative Ergebnisse erreicht werden konnten. Um das exakte Gesamtvolumen zu bestimmen wurde die Probenschleife unter Verwendung einer bei Giusti *et al.* (2005) beschriebenen Vorgehensweise kalibriert.

Es wurde ein zertifizierter und auf ein standardisiertes Referenzmaterial von NIST (*National Institute of Standards and Technology*) rückführbarer Kobalt-Standard (1 g/L) mehrfach über das externe Ventil mit der verwendeten Probenschleife injiziert und der gesamte Flüssigkeitsstrom aufgesammelt. Die insgesamt 19 Proben wurden gewogen, um das jeweilige gesammelte Volumen zu bestimmen. Dann wurde die Co-Konzentration der Proben mit der ICP-MS gegen eine externe Kalibrierung in Dreifachmessung bestimmt. Aus den so ermittelte Co-Konzentrationen der gesammelten Proben multipliziert mit ihren jeweiligen Volumina und dividiert durch die eingesetzte Co-Konzentration von 1 g/L wurde das Volumen der Probenschleife berechnet. Als Laufmittel für die Kalibrierung wurde eine 2%ige  $\text{HNO}_3$ -Lösung verwendet. 5  $\mu\text{L}$  des Co-Standards bzw. der Probe wurde über den Autosampler injiziert.

Die gesamte Kalibrierung wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und alle 19 Einzelwerte dieser drei Kalibrierungen für die Bestimmung des Probenschleifenvolumens gemittelt.

Zur Überprüfung der Stabilität der Methode und zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden verschieden konzentrierte, in 2%iger  $\text{HNO}_3$ -Lösung hergestellte Fe-Standardlösungen für die Flussinjektionen verwendet: 10  $\mu\text{g/L}$ , 20  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , 100  $\mu\text{g/L}$ , 500  $\mu\text{g/L}$ , 1000  $\mu\text{g/L}$ , 5000  $\mu\text{g/L}$  und 10 000  $\mu\text{g/L}$ . Diese wurden in einen normalen Leerproben-Lauf der Methode mit gegenläufigem Gradient injiziert.

### 3.5.3. FIA-Quantifizierung von Seehund-Transferrin und dessen Glykoformen

Zur Quantifizierung von Tf und der Tf-Glykoformen aus Seehund-Blutproben wurden Proben mit dem eisengesättigten Tf über die HPLC-ICP-MS aufgetrennt und das  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotop detektiert. Die Quantifizierung der Proben erfolgte in einer Dreifachbestimmung.

Die Fläche der Tf-Glykoformen-Peaks gemessen auf dem  $^{56}\text{Fe}$ -Isotope wurde integriert und die Fe-Konzentration, bezogen auf die Fläche der drei Peaks der 1-Punkt-Kalibrierung mit einem 1 mg/L Fe-Standard, berechnet. Der verwendete Fe-Standard war ein zertifizierter und auf ein standardisiertes Referenzmaterial von NIST rückführbarer Elementstandard. Die



1-Punkt-Kalibrierung erfolgte über drei Flussinjektionen am Ende des Gradienten nach erfolgter Auftrennung der Tf-Glykoformen.

Die Grundlage der absoluten Quantifizierung von Tf über seinen Eisengehalt ergibt sich aus der bekannten stabilen Stöchiometrie des eisengesättigten Tf-Moleküls, welches zwei Eisenionen bindet:



Alle weiteren Rechnungen in diesem Kapitel lassen sich auf die folgenden elementaren Gleichungen zurückführen:

$$c[\text{g/L}] = m[\text{g}] / V[\text{L}] \quad \text{Gleichung 16}$$

$$\text{und } M[\text{g/mol}] = m[\text{g}] / n[\text{mol}] \quad \text{Gleichung 17}$$

mit der Konzentration  $c$ , der Masse  $m$ , dem Volumen  $V$ , der molaren Masse  $M$  und der Stoffmenge  $n$ .

Die Flussinjektion mit einer Eisenstandardlösung bekannter Konzentration (1 mg/L) liefert für die FIA eine absolute Eisenmenge für die jeweils drei entsprechenden Peaks:

$$m_{\text{Fe-Standard}} = V_{\text{Probenschleife}} * C_{\text{Fe-Standard}} \quad \text{Gleichung 18}$$

In diesem konkreten Fall bedeutet dies:  $1 \text{ mg/L} * 8,722 \text{ } \mu\text{L} = 8,722 \text{ ng}$

Durch Integration der Peaks der Tf-Glykoformen kann aus dem Mittelwert ( $\bar{x}$ ) der Peakflächen (area) die Masse an Eisen, die zum entsprechenden Peak geführt hat, berechnet werden:

$$m_{\text{Fe}} = \frac{m_{\text{Fe-Standard}} * \text{area}_{\text{Peak}}}{\bar{x}(\text{area}_{\text{Fe-Standard}})} \quad \text{Gleichung 19}$$

Und die entsprechende Stoffmenge mit der bekannten molaren Masse von Eisen:

$$n_{\text{Fe}} = \frac{m_{\text{Fe}}}{M_{\text{Fe}}} \quad \text{Gleichung 20}$$

Die Gleichung 15 lässt sich auch wie folgt schreiben:

$$n_{\text{Tf}} = \frac{n_{\text{Fe}}}{2} \quad \text{Gleichung 21}$$

Mit der experimentell bestimmten molaren Masse (Kapitel 4.2.1.) der dominanten Seehund-Tf-Glykoform von 81138 g/mol lässt sich die Masse von Tf berechnen:

$$m_{\text{Tf}} = n_{\text{Tf}} * M_{\text{Tf}} \quad \text{Gleichung 22}$$

Für eine Konzentrationsangabe sind noch das Injektionsvolumen und der Verdünnungsfaktor  $f$  der Probe notwendig:

$$c_{\text{Tf}} = \frac{m_{\text{Tf}} * f}{V_{\text{Inj}}} \quad \text{Gleichung 23}$$

Zur Validierung der Methode wurde das zertifizierte Referenzmaterial ERM®-DA470k/IFCC verwendet.

Die Tf-Konzentration berechnet sich aus der Summe aller Tf-Glykoformen. Die Konzentrationen der Tf-Glykoformen mit wenigen oder ohne endständige Sialinsäuren bzw. gänzlich fehlenden Zuckerketten wurden zusätzlich in einem weiteren Wert zusammengefasst. Die Summe von a-, mono- und disialo-Tf wird als *carbohydrate deficient transferrin* (CDT) bezeichnet.

Die Tf-Konzentrationen der weiblichen und männlichen Seehunde, der juvenilen und adulten Tiere und die der Seehunde von unterschiedlichen Beprobungsstandorten wurden miteinander verglichen. Zum Vergleich zweier Stichproben ( $N_1$ ,  $N_2$ ) mit nicht normalverteilten Werten wurde der parameterfreie zweiseitige Mann-Whitney U-Test (Prüfgröße U) verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurden die Messwerte der beiden Stichproben als signifikant unterschiedlich beurteilt (Lamprecht 1999). Die Berechnung erfolgte mit einem frei verfügbaren Algorithmus<sup>[4]</sup>.

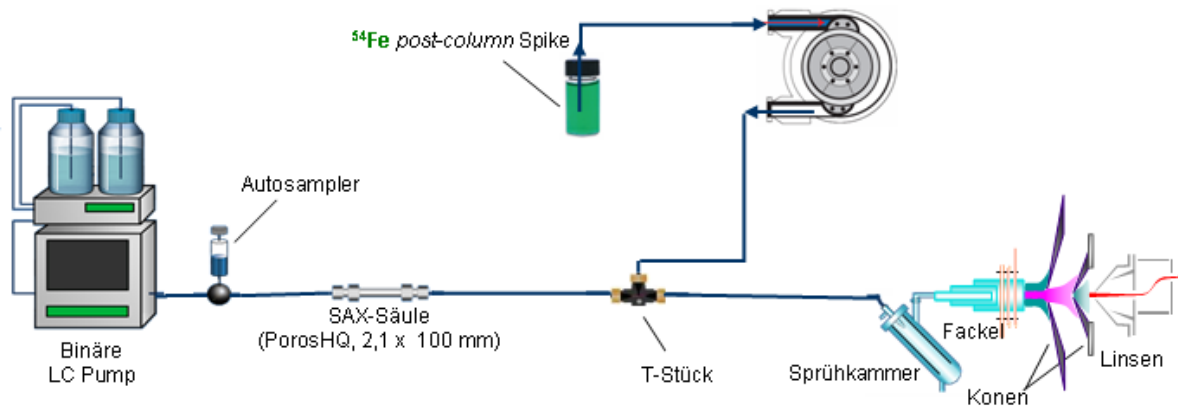
### 3.6. Absolute Tf-Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalytik

Das Prinzip der IDA und die mathematischen Grundlagen zur *post-column* IDA wurden in Kapitel 2.5.2. beschrieben. Zur Quantifizierung von Tf und dessen Glykoformen aus Seehund-Blutproben wurden Serum-Proben mit dem eisengesättigten Tf über die HPLC aufgetrennt und mit der ICP-MS alle Fe-Isotope detektiert. Die Quantifizierung der Proben erfolgte als Dreifachbestimmung.

#### 3.6.1. Instrumenteller Aufbau für die *post-column* IDA

Für die IDA wurde ebenfalls mit einer Kopplung zwischen einer Agilent 1100 HPLC und dem Agilent 7500cs ICP-MS gearbeitet (vgl. Kapitel 3.3.3. und 3.5.1.). Der veränderte instrumentelle Aufbau für die *post-column* IDA und die „erweiterte“ *post-column* IDA sind in Abbildung 23 schematisch dargestellt. Die „erweiterte“ IDA oder auch *double-spiking* IDA wurde erstmals von del Castillo Busto *et al.* (2010) für die Tf-Quantifizierung in humaner Rückenmarksflüssigkeit beschrieben.

Bei diesem Aufbau wurde nur eine HPLC-Pumpe für die Erzeugung des Gradienten für die Chromatographie benötigt. Die interne peristaltische Pumpe des ICP-MS wurde genutzt, um den *post-column* Spike-Fluss über ein T-Stück kontinuierlich in den durch die HPLC generierten Fluss einzuleiten. Der *post-column* Spike wurde in 20 mM Bis-Tris Puffer pH 6,5 verdünnt und mit einem Fluss von etwa 0,1 mL/min zu dem mit 0,75 mL/min von der SAX-Säule kommenden Fluss zugegeben.



**Abbildung 23:** Instrumenteller Aufbau der HPLC-ICP-MS Kopplung für die *post-column* IDA

Eine gravimetrische Bestimmung des exakten *post-column* Spike-Flusses erfolgte vor jeder Messreihe. Dazu wurde Reinstwasser mit 0,03 rps über die peristaltische Pumpe zum Fluss zugegeben und der gesamte Fluss fünfmal für 1 min gesammelt, ebenso wurde der Fluss von der Säule ohne den *post-column* Zufluss von etwa 0,1 mL/min an Reinstwasser fünfmal für 1 min aufgefangen und gewogen. Die Differenz dieser beiden Mittelwerte ist dem exakten *post-column* Fluss über die peristaltische Pumpe gleichzusetzen.

Für den Sprühkammer-Abfluss wurde zusätzlich eine zweite externe peristaltische Pumpe verwendet. Die HPLC-Parameter sind mit den in Tabelle 8 aufgelisteten Parametern identisch. Gleiches gilt für die optimierten ICP-MS-Einstellungen der *post-column* IDA-Quantifizierung, die ebenfalls identisch zu den oben genannten Parametern für die zeitaufgelöste Analyse sind (siehe Tabelle 9).

### 3.6.2. Herstellung und Charakterisierung der isotopisch angereicherten Eisen-Spikes

Das isotopisch angereicherte Eisen wurde als Eisenoxid-Pulver ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) vom Hersteller bezogen. Laut Herstellerangaben betrug die Anreicherung des  $^{54}\text{Fe}$ -Isotops 99,84 %. Für das  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop wurde eine Anreicherung von 95,90 % vom Hersteller spezifiziert. Zu einigen Milligramm des jeweiligen Eisenoxid-Pulvers wurde konzentrierte Salpetersäure zugegeben und für etwa eine Stunde auf einer metallfreien Heizplatte erhitzt. Diese so erhaltenen Stammlösungen wurden durch ICP-MS in Bezug auf ihre Konzentrationen und Isotopenzusammensetzungen charakterisiert, indem verschiedene Gemische der jeweiligen Stammlösung mit einer zertifizierten Fe-Referenzstandardlösung mit natürlichem Isotopenverhältnis ( $\text{Fe}_{\text{nat}}$ ), gemessen wurden. Die Isotopenverteilung natürlichen Eisens setzt sich folgendermaßen zusammen: 5,85 %  $^{54}\text{Fe}$  / 91,75 %  $^{56}\text{Fe}$  / 2,12 %  $^{57}\text{Fe}$  / 0,28 %  $^{58}\text{Fe}$  (Coplen *et al.* 2002).

Für die Bestimmung der Massendiskriminierung (siehe Kapitel 2.5.2.3.) wurde eine Blindprobe aus 2%iger  $\text{HNO}_3$  und eine etwa 10  $\mu\text{g/L}$  Verdünnung (in 2%iger  $\text{HNO}_3$ ) des Fe-

Referenzstandards direkt über die peristaltische Pumpe in die ICP-MS eingebracht. Für die Isotopen-Analyse wurden die drei höchsten Peakpunkte einer Masse mit fünf Wiederholungen detektiert. Die weiteren Einstellungen sind identisch mit den Bedingungen für die zeitaufgelöste Analyse, welche für die Quantifizierung verwendet wurden. Die einzelnen ICP-MS-Parameter für die Isotopen-Analyse sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

**Tabelle 21:** Die ICP-MS-Parameter für die Massendiskriminierung und Spike-Charakterisierung

<b>ICP-MS Agilent 7500cs (Isotopen-Analyse)</b>	
RF Energie	1600 W
Trärgas	0,85 - 0,95 L/min (Argon)
Makeup Gas	0,20 - 0,30 L/min (Argon)
Sprühkammertemperatur	4 °C
Linse: Extrakt 1	4 - 6,5 V
Linse: Extrakt 2	- 180 V
Octopol Bias	- 18 V
Quadrupol Bias	- 16 V
Reaktionsgas	5 mL/min H <sub>2</sub>
Peak-Muster	Full Quant (3)
Integrationszeit	0,5 Sek - 5 Wiederholungen
Gemessene Isotope	Cr        53 m/z
	Fe        54 m/z, 56 m/z, 57 m/z, 58 m/z
	Ni        60 m/z

Für die Charakterisierung der isotopisch angereicherten Spikes (<sup>54</sup>Fe und <sup>57</sup>Fe) wurden zusätzlich die Signale der Massen 53 für Cr und 60 für Ni detektiert. Dadurch konnten mögliche spektrale Interferenzen durch <sup>54</sup>Cr und <sup>58</sup>Ni, die nicht durch den Einsatz der Kollisions/Reaktions-Zelle reduziert werden können, mathematisch korrigiert werden. Die verwendeten mathematischen Beziehungen sind in den Gleichungen 24 und 25 wiedergegeben.

$$I_{54\text{Fe}} = I_{54} - (x_{53\text{Cr}} * I_{53\text{Cr}} / x_{54\text{Cr}})^{k * \Delta M} \quad \text{Gleichung 24}$$

$$I_{58\text{Fe}} = I_{58} - (x_{60\text{Ni}} * I_{60\text{Ni}} / x_{58\text{Ni}})^{k * \Delta M} \quad \text{Gleichung 25}$$

mit Intensität I, Isotopenhäufigkeit x [ $x(^{53}\text{Cr}) = 9,501$  /  $x(^{54}\text{Cr}) = 2,365$  /  $x(^{60}\text{Ni}) = 26,22$  /  $x(^{58}\text{Ni}) = 68,08$ ] (Rosman und Taylor 1998; Coplen *et al.* 2002), Faktor der *mass-bias*-Korrektur k und Massendifferenz  $\Delta M$  der beiden verwendeten Massen [ $\Delta M(^{53}\text{Cr} - ^{54}\text{Fe}) = -1$ ] und [ $\Delta M(^{60}\text{Ni} - ^{58}\text{Fe}) = 2$ ].

Zur Charakterisierung des <sup>54</sup>Fe- und des <sup>57</sup>Fe-Spikes wurden jeweils drei verschiedene Gemische (1+1 / 2+1 / 5+1) aus einer 10 µg/L Fe<sub>nat</sub>-Verdünnung (in 2%iger HNO<sub>3</sub>) und einer etwa 10 µg/L Verdünnung (in 2%iger HNO<sub>3</sub>) des entsprechenden Spikes mit der Isotopen-Analyse-Methode gemessen. Die ermittelten Intensitäten für die einzelnen Isotope wurden für die Massen 54 und 58 um spektrale Interferenzen korrigiert (Gleichung 24 und 25) und für

alle vier Eisenmassen der entsprechende Blindwert subtrahiert. Aus diesen Werten wurde das jeweilige Isotopenverhältnis zum Hauptisotop gebildet, welche dann um den Faktor der Massendiskriminierung berichtigt wurden ( $R^{54/56}$ ,  $R^{56/56}$ ,  $R^{57/56}$ ,  $R^{58/56}$ ). Aus der Differenz des jeweiligen Isotopenverhältnisses zur Summe aller Isotopenverhältnisse wurde die Molar-Fraktion für das entsprechende Isotop des Spikes berechnet. In Gleichung 26 ist beispielhaft die Berechnung für die Molar-Fraktion des  $^{54}\text{Fe}$ -Isotops wiedergegeben.

$$x(^{54}\text{Fe})_{\text{spike}} = \frac{R_{\text{mixture}}^{54/56}}{\left( R_{\text{mixture}}^{54/56} + 1 + R_{\text{mixture}}^{57/56} + R_{\text{mixture}}^{58/56} \right)} * 100 \quad \text{Gleichung 26}$$

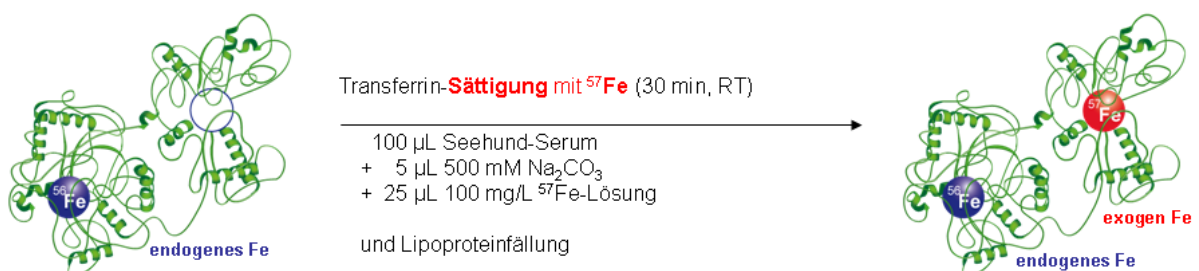
Die Konzentration des jeweiligen Spikes wurde für jedes der drei gemessenen Gemische nach Gleichung 27 berechnet und der Mittelwert gebildet.

$$C_{\text{spike}} = C_{\text{standard}} * \frac{m_{\text{standard}} * A_r^{\text{spike}} * x(^{56}\text{Fe})_{\text{standard}} * \left( 1 - R_{\text{mixture}}^{56/54} * R_{\text{standard}}^{54/56} \right)}{m_{\text{spike}} * A_r^{\text{standard}} * x(^{54}\text{Fe})_{\text{spike}} * \left( R_{\text{mixture}}^{56/54} - R_{\text{standard}}^{56/54} \right)} \quad \text{Gleichung 27}$$

### 3.6.3. Probenvorbereitung für die *double-spiking* IDA

Bei der *double-spiking* IDA wurde das Seehund-Tf mit dem  $^{57}\text{Fe}$ -Spike gesättigt. Die Stammlösung des  $^{57}\text{Fe}$ -Spikes lag in konz.  $\text{HNO}_3$  vor, so dass das in Kapitel 3.3.1.1. beschriebene Prozedere der Tf-Sättigung mit Eisen an den extrem niedrigen pH-Wert der  $^{57}\text{Fe}$ -Stammlösung angepasst werden musste. Die  $^{57}\text{Fe}$ -Stammlösung wurde mit 20 mM Bis-Tris Puffer auf eine Konzentration von 200 mg/L verdünnt. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Verdünnungsschritt mit der 500 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, um den pH-Wert auf pH 9 anzuheben, so dass die finale Konzentration der  $^{57}\text{Fe}$ -Lösung 100 mg/L betrug.

Die eigentliche Tf-Sättigung wurde wie in Kapitel 3.3.1.1. beschrieben durchgeführt, wobei die 5  $\mu\text{L}$  der 25 mM  $^{\text{nat}}\text{FeCl}_3$ -Lösung mit natürlichem Isotopenverhältnis durch 25  $\mu\text{L}$  der 100 mg/L  $^{57}\text{Fe}$ -Lösung ersetzt wurden. Die weitere Durchführung mit der sich anschließenden Inkubationszeiten, der Zentrifugation und der Lipoproteinfällung erfolgte analog zum oben beschriebenen Probenvorbereitungsprotokoll. Zur Verdeutlichung der Tf-Sättigung mit einem isotopisch angereicherten Fe-Spike ist der Prozess in Abbildung 24 schematisch dargestellt.



**Abbildung 24:** Schematische Darstellung der Tf-Sättigung mit einem  $^{57}\text{Fe}$ -Spike

Bei der Sättigung von Seehund-Tf mit dem  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop, kommt zu dem natürlichen endogenen  $^{56}\text{Fe}$ , das exogene  $^{57}\text{Fe}$  hinzu. Dadurch ist eine Unterscheidung von endogenem und exogenem Eisen möglich, so dass die ursprüngliche Eisensättigung von Seehund-Tf berechnet werden kann.

#### 3.6.4. Quantifizierung von Seehund-Transferrin mit *post-column* IDA

Die Quantifizierung mit der *post-column* IDA erfolgt über die Messung des Isotopenverhältnisses der verwendeten Fe-Isotope gemeinsam von Probe und *post-column* Spike. Aus dem gemessenen Isotopenverhältnis wurde anschließend mit Gleichung 1 für die *post-column* IDA der Massenfluss als Funktion in Abhängigkeit von der Zeit berechnet. Es wurden Serum-Proben von Seehunden verwendet.

Für beide *post-column* Methoden wurden die gemessenen Intensitäten der Fe-Isotope zuerst mit einem Savitzky-Golay-Filter geglättet. Der verwendete Algorithmus war ein Polynom 2. Ordnung und wurde mit 15 Datenpunkten betrieben (Gleichung 28 siehe Anhang). Die so geglätteten Intensitäten wurden um den ermittelten Korrekturfaktor der Massendiskriminierung (Gleichung 14) berichtigt und anschließend der Massenfluss berechnet. Die Peakflächen der einzelnen Glykoformen des Massenfluss-Diagramms entsprechen der Masse an Fe in ng, die direkt durch Integration ermittelt wurde.

Die Berechnung der Tf-Konzentration aus dieser Fe-Masse erfolgte analog zur Berechnung, die in Kapitel 3.5.3. ausführlich beschrieben wurde. Aus der oben aufgeführten Gleichung 23 ergibt sich mit Gleichung 22, 21 und 20 die folgende Gleichung 29:

$$c_{\text{Tf}} = \frac{m_{\text{Fe}} * M_{\text{Tf}} * f}{2 * M_{\text{Fe}} * V_{\text{Inj}}} \quad \text{Gleichung 29}$$

Für die *double-spiking* IDA erfolgte die Berechnung der Isotopenzusammensetzung aus den beiden Isotopenverhältnissen für 56/54 und 57/54 mit einem Gleichungssystem (siehe Gleichung 10). Der so berechnete Stoffmengenanteil  $x$  wurde verwendet, um das *mass-flow*-Chromatogramm der Fe-Isotope mit folgenden Gleichungen (Gl. 30, Gl. 31) zu errechnen:

$$\text{MF}_{^{56}\text{Fe}}(t) = c_{\text{spike}} * \text{flow}_{\text{spike}} * \frac{A_r(^{56}\text{Fe})_{\text{spike}} * X_{56}}{A_r(^{54}\text{Fe})_{\text{spike}} * X_{54}} \quad \text{Gleichung 30}$$

$$\text{MF}_{^{57}\text{Fe}}(t) = c_{\text{spike}} * \text{flow}_{\text{spike}} * \frac{A_r(^{57}\text{Fe})_{\text{spike}} * X_{57}}{A_r(^{54}\text{Fe})_{\text{spike}} * X_{54}} \quad \text{Gleichung 31}$$

Aus diesem so erhaltenen Massenfluss-Chromatogramm wurde durch Integration der Peakflächen die Masse der einzelnen Isotope ermittelt und mit dieser Masse die Tf-Konzentration nach Gleichung 29 berechnet. Durch die verschiedenen Isotope wurde zwischen dem endogenen Eisen und dem bei der Sättigung zugefügten exogenen Eisen ( $^{57}\text{Fe}$ ) unterschieden und so die ursprüngliche Sättigung berechnet.

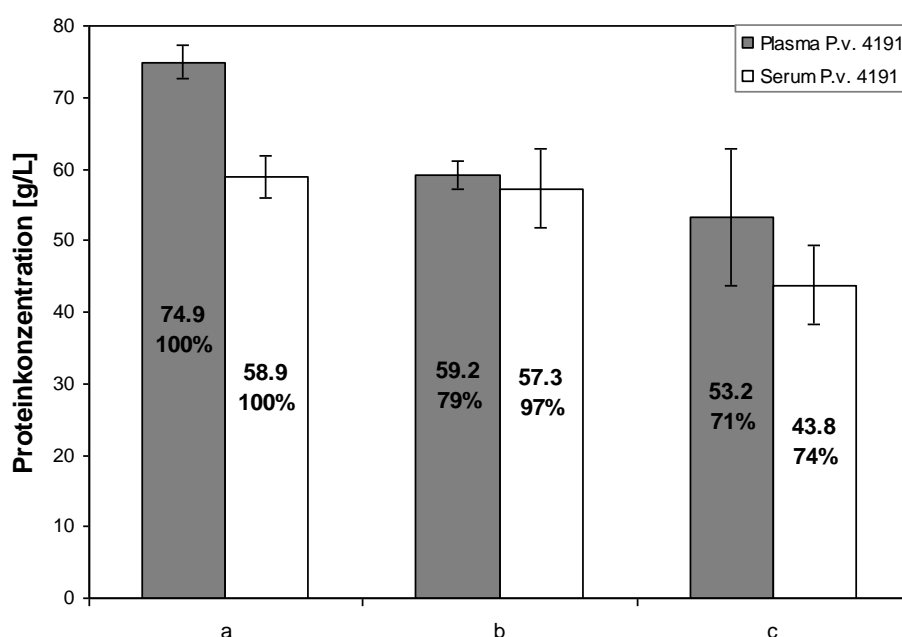
## 4. Ergebnisse und Diskussion

Erstmalig wurde Tf aus Seehund-Blutproben isoliert und das Seehund-Tf wurde im Anschluss mit molekülspezifischen Methoden näher charakterisiert. Die Quantifizierung von Seehund-Tf erfolgte mit elementspezifischer Massenspektrometrie über das stabil gebunden Eisen. Es wurden zwei ICP-MS basierende Quantifizierungs-Methoden, die FIA und IDA eingesetzt und miteinander verglichen. Abschließend wurden die Tf-Konzentrationen zusammen mit anderen APP als Parameter für ein Gesundheitsmonitoring betrachtet.

### 4.1. Isolierung von Transferrin aus Seehund-Blutproben

#### 4.1.1. Optimierung der Probenvorbereitung

Das Säulenmaterial Poly(Styrol-Divinylbenzol) der gewählten PorosHQ-SAX-Säule kann laut Bedienungsanleitung unspezifische Wechselwirkungen mit Lipiden und den Lipoproteinen eingehen. Um die Lebensdauer der Säule zu erhöhen und die effektive chromatographische Trennung der Proteine zu verbessern wurden interferierende Matrixkomponenten entfernt (Jeppsson *et al.* 1993). Durch die für die Chromatographie gewählte Probenvorbereitung wurden die Lipoproteine aus den Serum- und Plasma-Proben ausgefällt. Die hoch abundanten Matrixproteine wurden abgereichert, ohne dass das Tf mit ausgefällt wurde. Die mit dem Bradford-Test gemessene Proteinkonzentration der einzelnen Probenvorbereitungsschritte ist in Abbildung 25 als Mittelwert der Dreifachmessung nach den einzelnen Aufreinigungsschritten in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

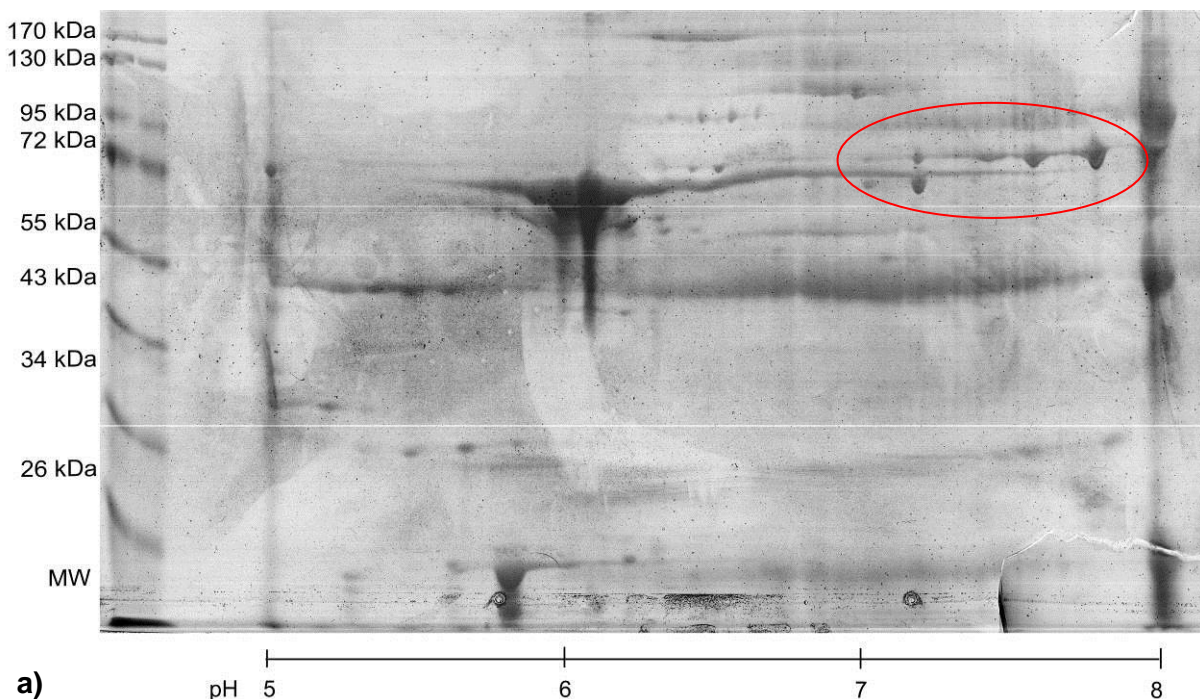


**Abbildung 25:** Mittelwert der Dreifachbestimmung der Proteinkonzentrationen (Bradford-Test) nach den einzelnen Aufreinigungsschritten der Probenvorbereitung für Plasma-Proben (graue Säulen) und Serum-Proben (weiße Säulen) von P.v. 4191. **a)** pures Plasma/Serum **b)** Überstand nach dem ersten Zentrifugieren nach Tf-Sättigung und Lipoproteinfällung **c)** Probe nach der Zentrifugation und der abschließenden Verdünnung mit Laufpuffer

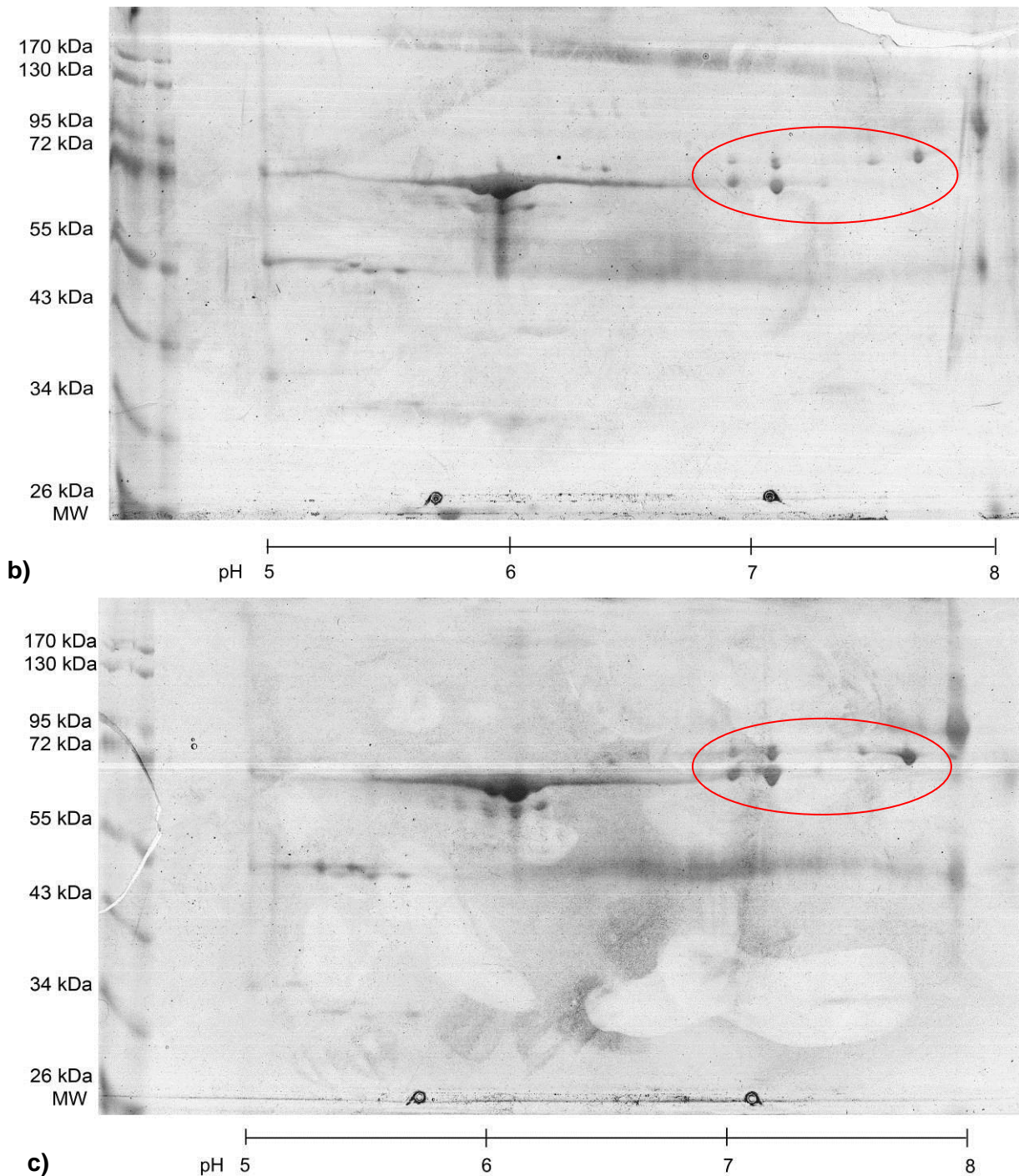
Als Ausgangswert (a) wurden die Proteinkonzentrationen des puren Plasmas und des puren Serums (P.v. 4191) mit einem Bradford-Test bestimmt. Dann wurde die Proteinkonzentration des Überstands nach dem ersten Zentrifugationsschritt, der sich an die Tf-Sättigung und die Lipoproteinfällung anschließt, bestimmt (b). Die dritte Säule (c) des Diagramms stellt den gemessenen Wert der Konzentration nach der Zentrifugation und der abschließenden Verdünnung der Probe mit Laufpuffer dar.

Die zunächst durchgeführte Lipoproteinfällung resultierte in einer Proteinabreicherung von etwa 20 % für die Plasma-Proben verglichen mit einer Proteinabreicherung von nur 3 % für die Serum-Proben. Der pH-Wert wurde für die Tf-Sättigung durch  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in den basischen Bereich gebracht und lag bei etwa pH 11. Durch die Verdünnung mit dem Laufpuffer der einen pH-Wert von 6,5 hatte, wurde der pH-Wert der Probe auf ca. pH 7 - 7,5 angeglichen. Dadurch wurde eine zusätzliche Präzipitation von Proteinen induziert, so dass eine Gesamtprotein-Abreicherung durch die einzelnen Schritte der Probenvorbereitung von 25 - 30 % erreicht wurde.

Die Visualisierung der Proteinabreicherung und der Nachweis des Tf erfolgten zusätzlich durch 2D-Gelelektrophorese. Die Gelbilder zu den drei Stufen der Probenvorbereitung sind in Abbildung 26 dargestellt. Es wurden 11 cm lange IPG-Streifen im pH-Bereich von 5 - 8 und 10%ige Tris-HCl Gele verwendet. Die Abbildung 26a-c zeigen eine Abreicherung an Proteinen durch die Probenvorbereitungsschritte. Einige Proteinspots z.B. im Bereich über 100 kDa verschwanden gänzlich von den Gelbildern. Gleichzeitig nahm die Intensität des hoch abundanten Albuminspots (pI ~6; ~68 kDa), der häufig Gelspots von gering konzentrierten Proteinen überlagert, deutlich ab. Wenn man hingegen die Region bei etwa 80 kDa und einem pH-Wert von 6,5-8 betrachtet, in der die Seehund-Tf-Glykoformen erwartet wurden, schienen die Proteinspots nahezu unbeeinträchtigt.







**Abbildung 26:** 2D-Gelelektrophorese der einzelnen Probenvorbereitungsschritte von einer Plasma-Probe des Tieres P.v. 4191 mit kolloidaler Coomassie-Färbung. Die Region, in der die Seehund-Tf-Glykoformen erwartet wurden, ist mit einer roten Ellipse markiert **a)** Plasma pur, vor der Probenvorbereitung (75 µg Protein) **b)** nach Tf-Sättigung und Lipoprotein-fällung (51 µg Protein) **c)** nach abschließender Verdünnung (92 µg Protein)

Zur Kontrolle wurden die Präzipitate in Rehydrationspuffer resuspendiert und ebenfalls mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Auf diesen Gelen wurden keine Proteinspots detektiert, die im erwarteten pI und Massenbereich von Tf lagen.

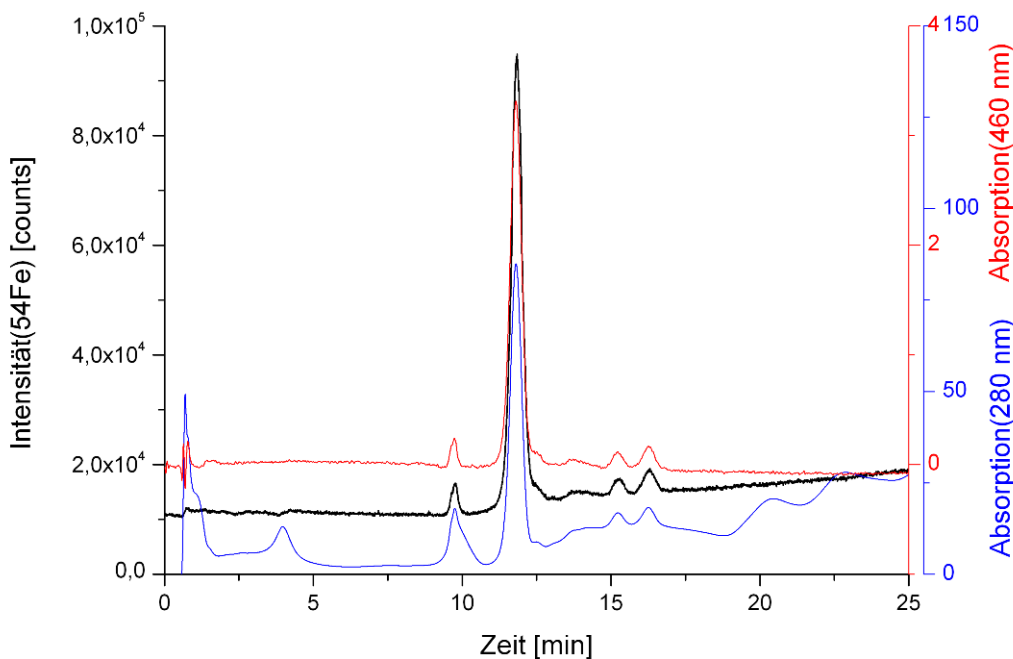
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diese Probenvorbereitung die Lipoproteine effektiv aus den Seehund-Blutproben entfernt werden konnten, ohne dass das Seehund-Tf

mit ausgefällt wurde. Diese Probenvorbereitung ist ideal geeignet für die sich anschließende Anionenaustauschchromatographie mit eisenspezifischer Detektion.

#### 4.1.2. HPLC-ICP-MS gestützte Fraktionierung der Transferrin-Glykoformen aus Serum- und Plasma-Proben von Seehunden

Trotz der Probenvorbereitung, bei der hochabundante Matrixkomponenten ausgefällt wurden, ist in den Plasma- und Serum-Proben weiterhin ein komplexes Proteingemisch vorhanden (siehe Abbildung 26c). Daher wurden die Proben im nächsten Schritt mit HPLC-ICP-MS unter Verwendung einer SAX-Säule aufgetrennt. Über den charakteristischen Eisengehalt des Tfs erfolgte dabei eine hoch spezifische und selektive Detektion mittels ICP-MS. Parallel wurde eine UV-Detektion bei 280 nm (Proteindetektion) und 460 nm (Absorptionsmaximum des Fe-Tf-Komplex) (Bates und Schlabach 1975; Schlabach und Bates 1975; Jeppsson *et al.* 1993; Bortolotti *et al.* 2005; Helander und Bergström 2006) durchgeführt.

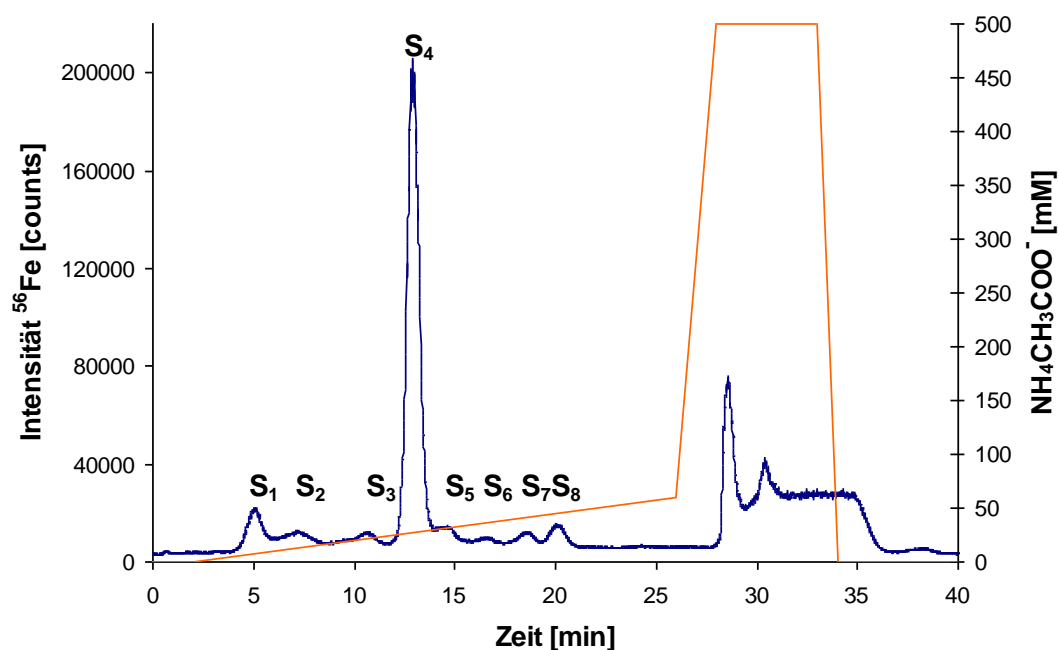
Zu Beginn der Untersuchungen erfolgten Tests mit verschiedenen SAX-Säulen und unterschiedlichen Gradientenbedingungen. Die beste Separation der Tf-Glykoformen wurde mit einer PorosHQ-Säule erzielt. In Abbildung 27 ist ein frühes Chromatogramm einer Plasma-Probe des Tieres P.v. 4190 dargestellt (Gradient: 100 mM Ammoniumacetat in 20 min). In Schwarz ist die Intensität des  $^{54}\text{Fe}$ -Isotops aufgezeigt, in Blau die Absorption der aromatischen Aminosäurereste (Phe, Trp, Tyr) bei 280 nm und in Rot die spezifische Absorption des Fe-Tf-Komplexes bei 460 nm.



**Abbildung 27:** SAX-Chromatogramm (PorosHQ) einer Plasma-Probe (P.v. 4190) während des Optimierungsprozesses (Gradient: 100 mM Ammoniumacetat in 20 min), schwarz:  $^{54}\text{Fe}$ -Intensität, blau: Proteindetektion bei 280 nm, rot: Absorptionsmaximum des Fe-Tf-Komplexes bei 460 nm

Der hier verwendete Gradient mit 0 bis 100 mM Ammoniumacetat innerhalb von 5 bis 25 min lieferte noch keine vollständige Separation der Tf-Glykoformen (Abbildung 27). Die Detektion von Proteinen (280 nm) und des Fe-Tf-Komplexes (460 nm) parallel zur  $^{54}\text{Fe}$ -Intensität, zeigt dass das detektierte Eisen im gesamten Retentionszeitraum von 9 bis 17 min an Tf gebunden ist.

Nach der Optimierung der Methode wurden die besten chromatographischen Ergebnisse mit einer PorosHQ-Säule und einem Gradienten von 0 bis 60 mM Ammoniumacetat in 24 min, mit anschließendem Wasch- und Spülschritt erzielt. Mit diesen Gradientenbedingungen konnten bis zu acht Tf-Glykoformen aus Plasma- und Serum-Proben von Seehunden aufgetrennt werden. Ein typisches Chromatogramm separierter Seehund-Tf-Glykoformen (P.v. 4190, Serum) ist in Abbildung 28 gezeigt. Neben dem dominanten Fe-Peak ( $S_4$ ) treten verschiedene geringer konzentrierte eisenbindende Spezies auf.

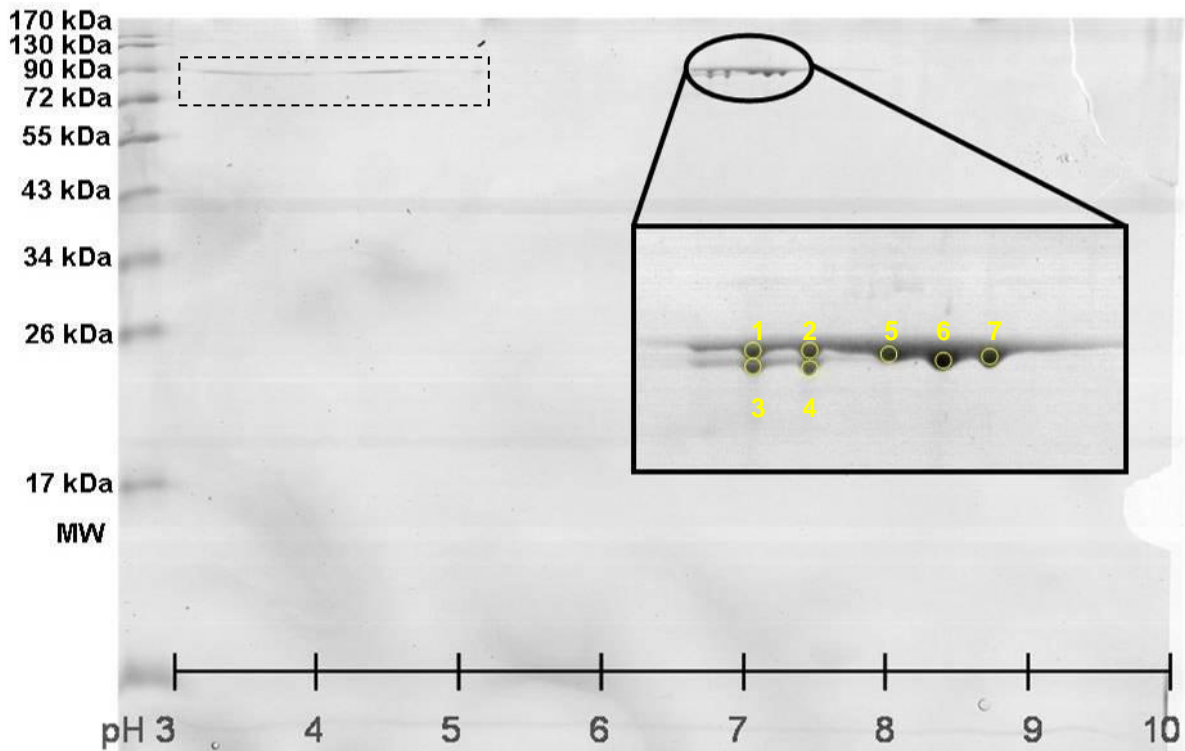


**Abbildung 28:** Charakteristisches SAX-Chromatogramm einer Serum-Probe (P.v. 4190), die  $^{56}\text{Fe}$ -Intensität aufgetragen gegen die Zeit (rote Linie – Ammoniumacetat-Gradient)

Unter den gegebenen Pufferbedingungen zum Startzeitpunkt der Chromatographie gibt es keinen Durchbruchpeak bei der Fe-Detektion, das bei der Sättigung zugegebenen überschüssige Eisen wurde bei 100 % Puffer B (500 mM Ammoniumacetat, ab 27 min) von der PorosHQ-Säule gewaschen.

Zur genaueren Charakterisierung dieser acht Eisen-Spezies, bei denen es sich vermutlich um Tf-Glykoformen handelt, wurde eine Fraktion von 3 - 22 min zusammen gepoolt, aufkonzentriert und dann mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abbildung 29 ist ein

solches 2D-Gel (24 cm, pH 3 - 10, 12%iges Tris-HCl Gel) einer gepoolten Fraktion aller acht Eisen-Spezies einer Plasma-Probe nach der SAX-HPLC dargestellt.



**Abbildung 29:** 2D-Gel der gepoolten Fraktionen der Tf-Glykoformen nach SAX-HPLC einer Plasma-Probe, 24 cm IPG-Streifen, pH 3-10, 12%iges Tris-HCl Gel, Coomassie-Färbung, Ausschnitt mit den Tf-Glykoformen vergrößert dargestellt

Abbildung 29 verdeutlicht, dass die SAX-HPLC mit der Säule PoroshQ das komplexe Proteingemisch effektiv separiert. Im Vergleich zu den Gelbildern aus Abbildung 26 zeigt sich deutlich die Effektivität der SAX-Chromatographie, die die Tf-Glykoformen im erwarteten pH-Bereich separiert. Diese Proteine weisen einen pI von 6,9 - 7,9 auf und liegen in einem Größenbereich unterhalb der 90 kDa Marker-Bande. In der Vergrößerung dieses Bereiches erkennt man die Auftrennung in mindestens sieben unterschiedliche Proteinspots.

Die dünne Linie auf Höhe der Tf-Masse bei einem pH von 3 - 5 (gestrichelter Kasten) ist vermutlich auf Tf ohne Eisen oder auf einen nur teilweise beladenen Tf-Fe-Komplex zurückzuführen. Der Tf-Fe-Komplex dissoziiert bei einem pH < 5,5 (Adams *et al.* 2003; De Domenico *et al.* 2008). Daher ist es empfehlenswert für Tf die IPG-Streifen im pH-Bereich von 5 - 8 zu verwenden.

Wie die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, ist die Isolierung von Seehund-Tf aus beiden Probenmaterialien, Plasma wie auch Serum, möglich. Für die Quantifizierung von Tf in Seehund-Blutproben wurden im Weiteren Serum-Proben verwendet. Dies gewährleistet die Vergleichbarkeit mit anderen Studien, die in der Regel ebenfalls mit Serum arbeiten.

## 4.2. Identifizierung und Charakterisierung des Seehund-Transferrins

Die isolierten eisenhaltigen Proteine zeigen eine für den Fe-Tf-Komplex charakteristische UV-Absorption bei 460 nm auf. Ferner wurden mittels 2D-Gelelektrophorese Proteine mit einer Masse von etwa 80 kDa und einem pI im Bereich von 6,9 bis 7,9 isoliert, welches ebenfalls kennzeichnende Merkmale für Tf sind (MacGillivray *et al.* 1998; Sanz-Nebot *et al.* 2002). Demzufolge kann von der Arbeitshypothese ausgegangen werden, dass es sich um Seehund-Tf-Glykoformen handelt.

Die Identifizierung und nähere Beschreibung der aus Seehund-Blutproben isolierten eisenhaltigen Proteine erfolgte durch den Einsatz von komplementären molekülspezifischen massenspektrometrischen Methoden (Grebe *et al.* 2010). Im Folgenden werden die isolierten eisenhaltigen Proteine entsprechend der Arbeitshypothese bereits als Tf-Glykoformen bezeichnet.

### 4.2.1. Charakterisierung des intakten Proteins mit MALDI-TOF-MS und ESI-MS

Die Transferrine im Blut verschiedener Säugetiere weisen große Homologien auf, sie sind durch eine sehr ähnliche molekulare Masse gekennzeichnet. Die Datenbankeinträge für Serotransferrin verschiedener Säugetierspezies und ihrer Anzahl an Aminosäuren (AS), der molekularen Masse des Proteinrückgrats und der theoretischen pI-Werte sind in Tabelle 22 aufgelistet.

**Tabelle 22:** Datenbankeinträge für die Serotransferrin AS-Sequenzen verschiedener Säugetierspezies mit der Anzahl an AS, molekulare Masse des Proteinrückgrats und der theoretischen pI-Werte

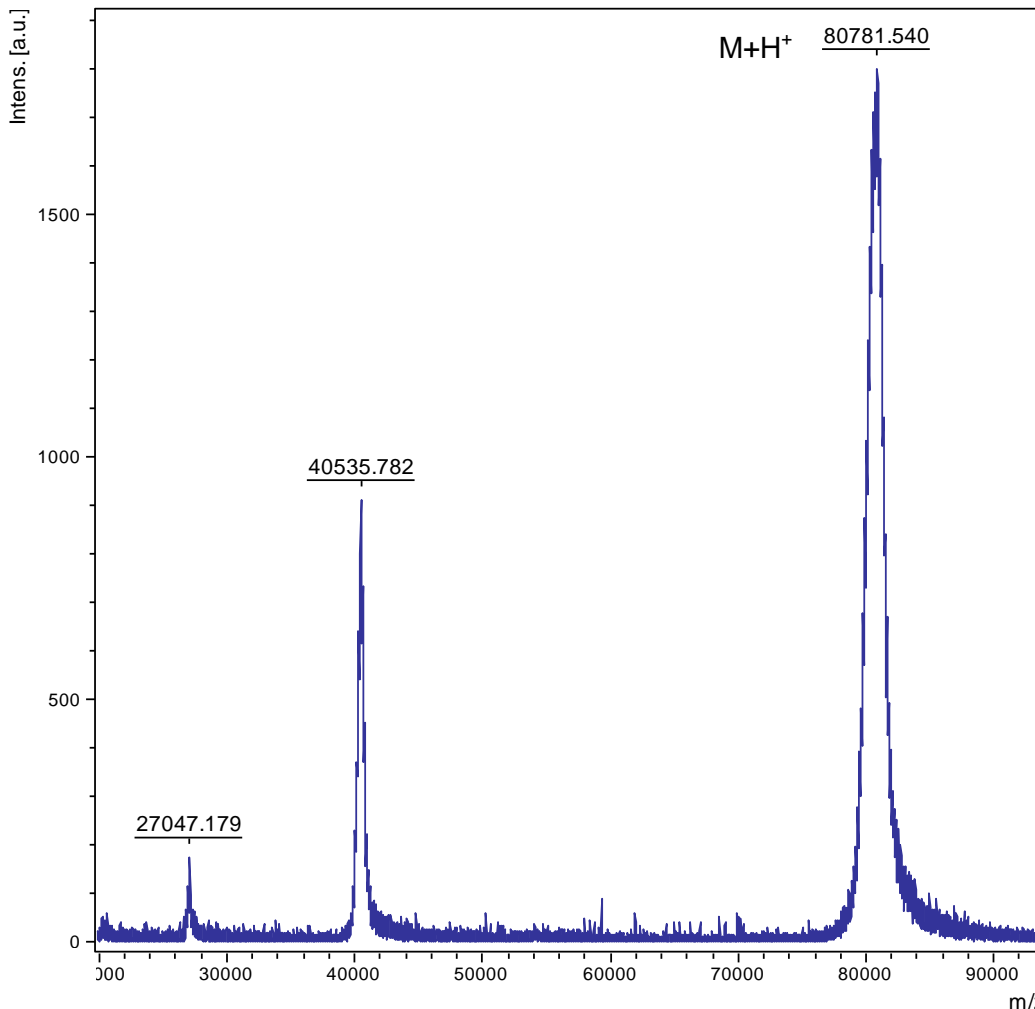
Spezies	SwissProt Nr.	Anzahl AS	Masse [Da]	pI (theor.)
Kaninchen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	P19134	676	74886,1	6,35
Maus ( <i>Mus musculus</i> )	Q92111	678	74881,4	6,81
Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )	P02787	679	75181,4	6,70
Schimpanse ( <i>Pan troglodytes</i> )	A5A616	679	75195,4	7,02
Hund ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	XP_864568.1 (NCBI)*	684	75797,2	8,5
Rind ( <i>Bos taurus</i> )	Q29443	685	75829,6	6,50
Pferd ( <i>Equus caballus</i> )	P27425	687	76141,0	6,61
Schwein ( <i>Sus scrofa</i> )	P09571	696	76967,9	6,93

\*Sequenz Eintrag in NCBI, die Masse und der theoretische pI wurden auf <http://www.enccorbio.com/protocols/Prot-MW.htm> berechnet <sup>[5]</sup>

Unter Berücksichtigung eines Glykananteils von ca. 6 % (Oda *et al.* 1997) ergibt sich aus der Masse der AS-Sequenzen eine molekulare Masse für die Serotransferrine der verschiedenen Spezies von annähernd 80 kDa.

Für eine erste Charakterisierung der eisenhaltigen Proteinfractionen wurde die molekulare Masse des in den ultrafiltrierten Fraktionen enthaltenene Proteins mit MALDI-TOF-MS bestimmt. Ein Beispiel-Spektrum der Fraktion der dominanten Glykoform (vgl. Abbildung 28,

Peak S<sub>4</sub>) des Tieres P.v. 4191 ist in Abbildung 30 gezeigt. Analoge Spektren der Tf-Glykoformen S<sub>7</sub> und S<sub>8</sub> (P.v. 4191, Plasma) sind im Anhang abgebildet (Abbildung A1).



**Abbildung 30:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Sinapinsäure, linearer Modus) der dominanten Glykoform (Peak S<sub>4</sub>) von Tier P.v. 4191 (Plasma)

Spektren von einigen weiteren fraktionierten Glykoformen wurden generiert (Abbildung A1), jedoch waren die Intensitäten mancher Peaks zu gering, als dass eine ausreichende Menge an Protein gesammelt werden konnte, um aussagekräftige Spektren aufnehmen zu können. Bei allen MALDI-MS-Experimenten wurde in sämtlichen eisenhaltigen Fraktionen aus der HPLC-ICP-MS-Fraktionierung ein 80 kDa Protein nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den bekannten Proteinmassen der Serotransferrine anderer Säugetier-Spezies (siehe Tabelle 22).

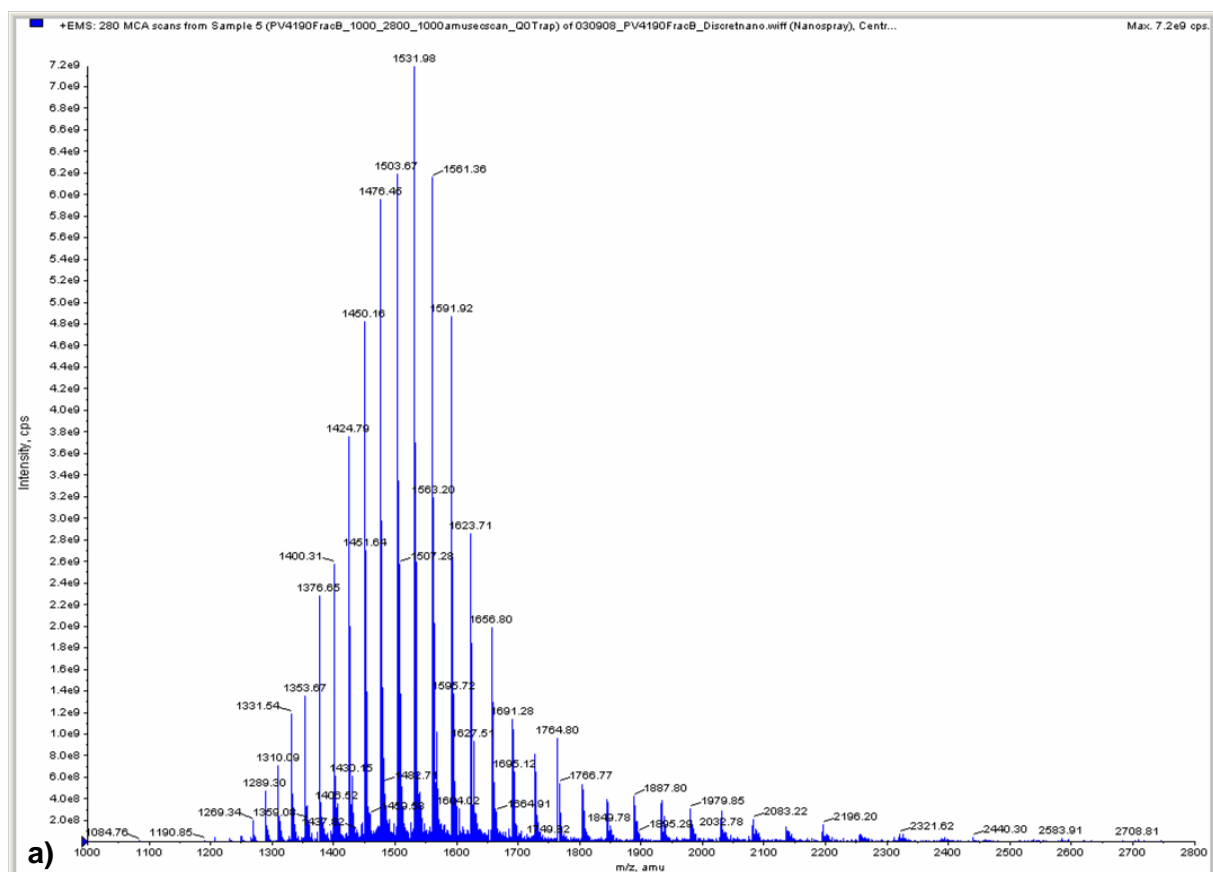
Allerdings ist die Massengenauigkeit der MALDI-MS Spektren limitiert, die Untersuchungen erlaubten nur eine grobe Abschätzung der Molekülmasse.

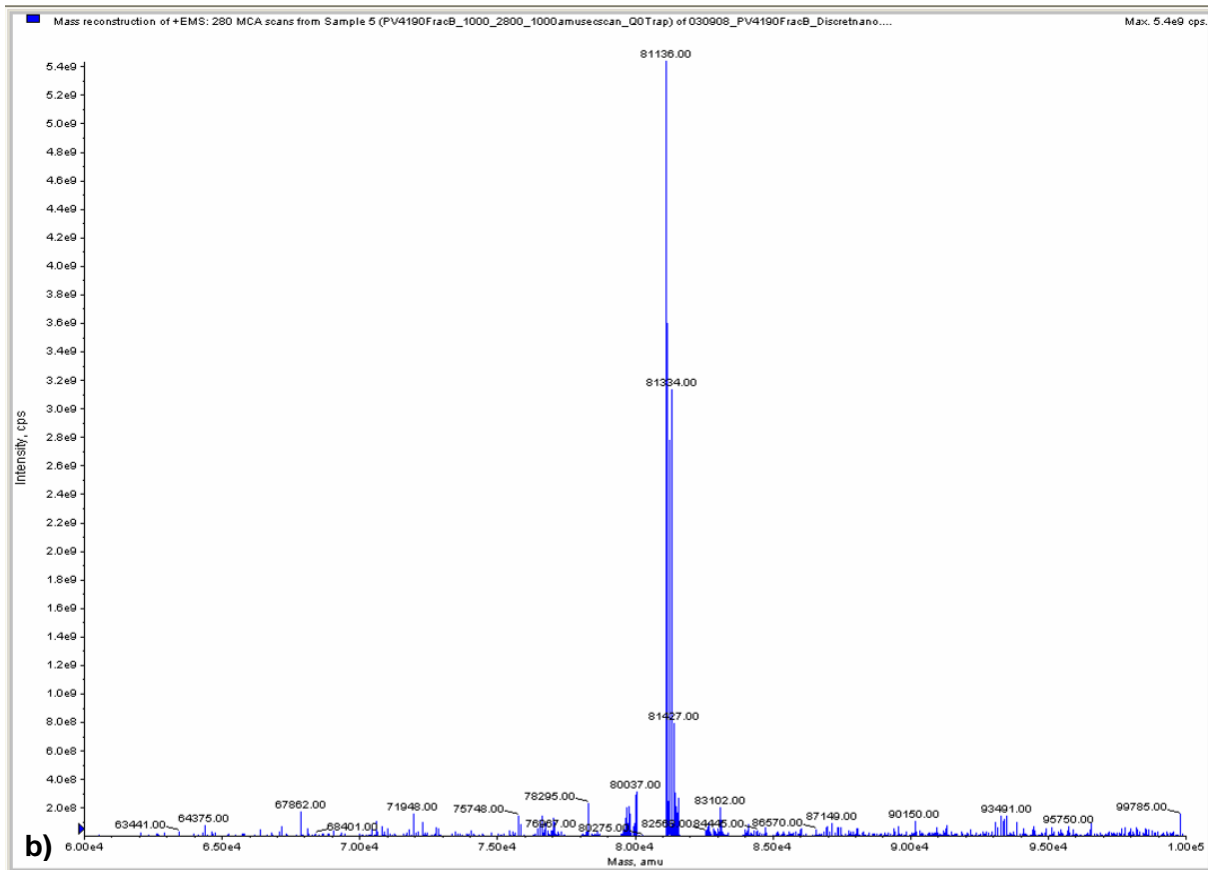
Zum einen sind die Peaks sehr breit. Im obigen Spektrum beträgt die Peak-Breite auf halber Höhe des 80 kDa Peaks etwa 2000-3000 m/z. Diese enorme Peak-Breite lässt sich durch die Heterogenität des Proteins erklären. Der Peak aus der HPLC-ICP-MS Fraktionierung ist nicht

notwendigerweise nur auf ein einziges Protein zurückzuführen, sondern möglicherweise durch teilweise Überlagerung mehrere Glykoformen entstanden. Auch können bei der Ionisierung verschiedene Addukte gebildet worden sein.

Zum anderen ist die Massengenauigkeit in hohen Massenbereichen im linearen Modus generell recht ungenau. Das zeigt sich auch an den Diskrepanzen der Massen zwischen den einzel- und doppelt-geladenen Ionen des Proteins. Des Weiteren sind die Signale nicht geglättet worden. Dies beeinflusst die Peak-Zuordnung ebenso wie die Auswahl der Datenpunkte des Spektrums, die für die Massenberechnung herangezogen wurden.

Um präzisere Massen-Informationen zu dem intakten Protein zu erlangen wurden zusätzliche ESI-MS-Experimente durchgeführt. Für diese massenspektrometrische Technik ist ein größeres Probenvolumen als für die MALDI-MS-Experimente erforderlich, daher wurde dieses Experiment nur mit der HPLC-ICP-MS-Fraktion der dominanten Glykoform durchgeführt. In Abbildung 31a) ist ein Protein-Spektrum (P.v. 4190, Plasma) dargestellt und in Abbildung 31b) ist das zugehörige Ergebnis der Daten-Entfaltung abgebildet.





**Abbildung 31:** ESI-QTrap-MS, statischer Nanospray der dominanten  $S_4$ -Glykoform (P.v. 4190, Plasma) aus der HPLC-ICP-MS Fraktionierung **a)** Protein-Spektrum, Auftragung der Intensität als Zählrate (*counts per second*, cps) des mehrfach geladenen Proteins gegen das  $m/z$  Verhältnis des Proteins **b)** Ergebnis der Daten-Entfaltung aus Spektrum a, Auftragung der Intensität in cps gegen die berechnete Proteinmasse

Das ESI-MS Protein-Spektrum lieferte nach der Daten-Entfaltung unter der Annahme, dass es sich nur um unterschiedliche Ladungszustände desselben Moleküls handelt, die sich in der Zahl der angelagerten  $H^+$ -Ionen unterscheiden und keine weiteren Addukte gebildet wurden, eine präzisere Masse für die dominante Tf-Glykoform. Die experimentell bestimmte Masse von 81,136 kDa für die vorherrschende  $S_4$ -Glykoform wurde im Folgenden bei den Berechnungen zur Quantifizierung des Tf verwendet. Neben der Masse der dominanten Glykoform sind ebenfalls um 1000 - 2000  $m/z$  geringere bzw. erhöhte Massen präsent.

Von einem Pool aller Tf-Glykoformen (P.v. 4190, Plasma) ist das ESI-MS Protein-Spektrum nach der Daten-Entfaltung in Abbildung A2 im Anhang dargestellt. Die Differenzen der Massen der einzelnen Tf-Glykoformen liegen zwischen 1000 und 2000  $m/z$ . Diese Massendifferenz kann durch das Fehlen ganzer Glykanketten erklärt werden.



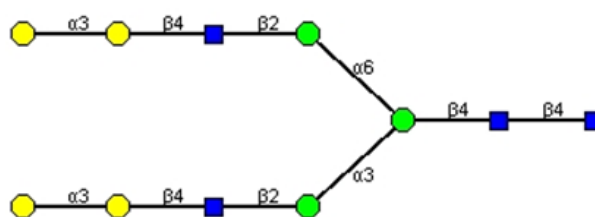
#### 4.2.2. Massendifferenzen der Transferrin-Glykoformen und PNGaseF-Verdau

Die Massendifferenzen zwischen den einzelnen Tf-Glykoformen liegen im Massenbereich von typischen N-Glykanen und für einzelne Massen liegen Strukturvorschläge für mögliche Zuckerstrukturen vor.

Die Massendifferenz von 1966 m/z zwischen der dominanten S<sub>4</sub>-Glykoform und der darüber liegenden Masse aus dem ESI-MS-Protein-Spektrum in Abbildung 31 entspricht der molekularen Masse eines zweiarmigen N-Glykans vom Komplex-Typ. Eine mögliche Struktur, die für die Masse 1965,77 Da vorgeschlagen wurde<sup>[6]</sup> ist in Abbildung 32 abgebildet.

Glycan: carbNlink\_30452\_A

Cartoon Representation

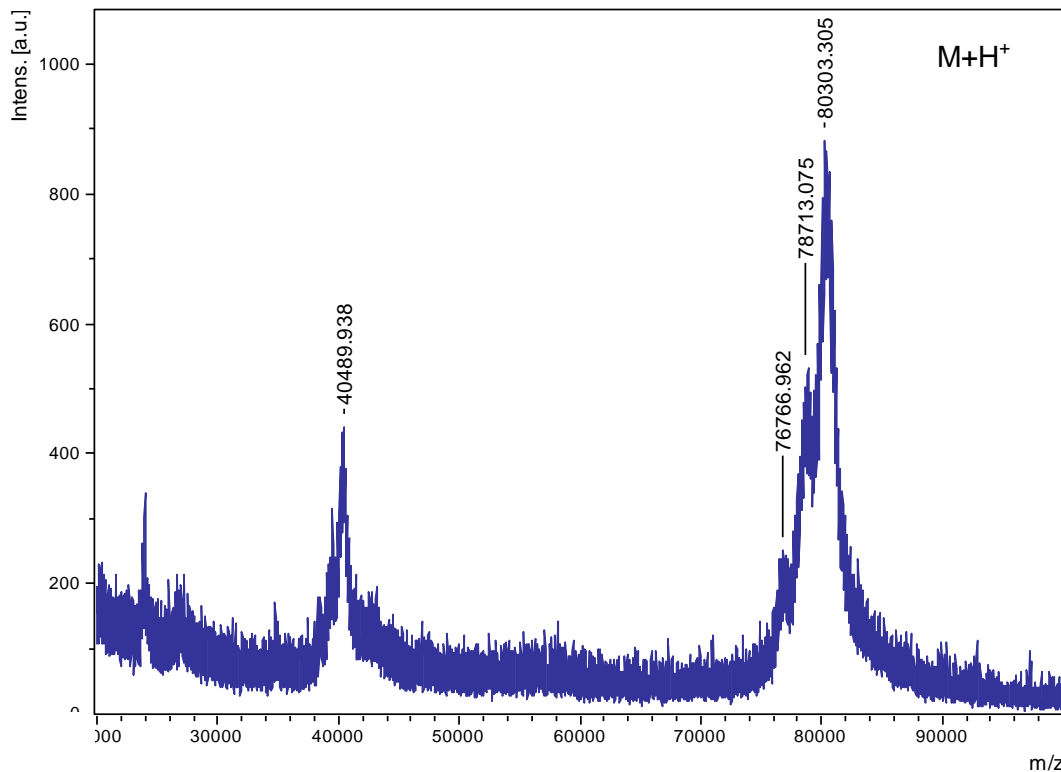


IUPAC 2D Representation

Gal a1—3 Gal b1—4 GlcNAc b1—2 Man a1—6  
Gal a1—3 Gal b1—4 GlcNAc b1—2 Man a1—3 Man b1—4 GlcNAc b1—4 GlcNAc

**Abbildung 32:** Mögliche Struktur für ein N-Glykan des Komplex-Typs der Masse 1965,77 Da, Galactose (Gal, gelber Kreis), N-Acetylglucosamin (GlcNAc, blaues Quadrat), Mannose (Man, grüner Kreis)<sup>[6]</sup>

Zur Bestätigung, dass die Massendifferenz von 1000 - 2000 m/z durch die Glykanstrukturen auf der Proteinoberfläche bedingt werden, wurden die N-Glykane der S<sub>4</sub>-Fraktion (P.v. 4190, Serum) durch das Enzym PNGaseF abgespalten. In Abbildung 33 ist das MALDI-MS-Spektrum eines teilweisen PNGaseF-Verdau der dominanten Glykoform dargestellt. Der Hauptpeak (M+H<sup>+</sup>) zeigt eine Masse von 80 303 m/z und die Massen der beiden durch den Verdau entstanden Peaks sind um 1590 m/z (78 713 m/z) und weiter 1946 m/z (76 767 m/z) verringert.



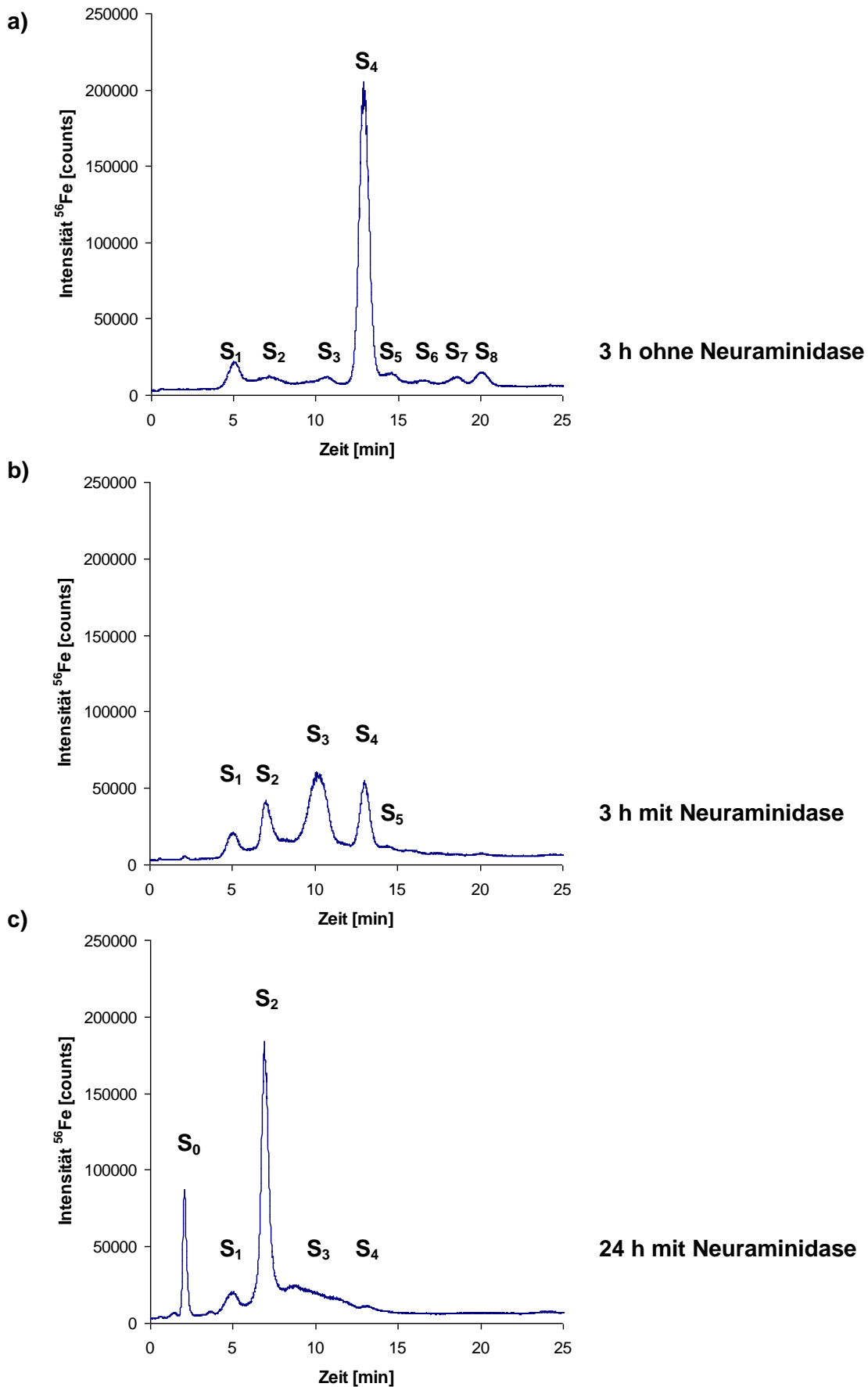
**Abbildung 33:** MALDI-TOF-MS-Spektrum (Sinapinsäure, linearer Modus) der dominanten  $S_4$ -Glykoform (P.v. 4190, Serum) nach einer Inkubation mit PNGaseF

#### 4.2.3. Neuraminidase katalysierte Abspaltung der endständigen Sialinsäure-Reste

Die obigen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass sich die Seehund-Tf-Glykoformen insbesondere durch die Zuckerstrukturen auf der Oberfläche des Proteins unterscheiden, wobei das Proteinrückgrat aller Glykoformen identisch ist.

Aus der Literatur sind die Glykostrukturen von humanem Tf bekannt. So wird für die dominante Tf-Glykoform das Vorhandensein von jeweils einem zweiarmigen N-Glykan an den zwei N-Glykosylierungsstellen beschrieben (Yamashita *et al.* 1993; Oda *et al.* 1997; Sanz-Nebot *et al.* 2002; del Castillo Busto *et al.* 2006; 2009a). An jedem Arm befindet sich endständig eine Sialinsäure, demzufolge wird die dominante Glykoform auch als  $S_4$  bezeichnet. Die Sialinsäure ist der einzige in den N-Glykanen vorkommende Zucker, der eine negative Ladung trägt. Diese negativen Ladungen sind für das chromatographische Verhalten der Tf-Glykoformen auf der SAX-Säule verantwortlich.

Zur weiteren Charakterisierung der Tf-Glykoformen wurde das komplette Serum mit  $\alpha(2\rightarrow3,6,8,9)$ Neuraminidase verdaut. Dieses Enzym spaltet spezifisch endständige Sialinsäurereste von Oligosacchariden ab. In Abbildung 34 und Tabelle 23 sind die SAX-HPLC ICP-MS Chromatogramme und die entsprechenden relativen Peakflächen der einzelnen Tf-Glykoformen [a) 3 h ohne Neuraminidase, b) 3 h mit Neuraminidase, c) 24 h mit Neuraminidase] dargestellt, welche im Anschluss an den Neuraminidase-Verdau von einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4190 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten aufgenommen wurden.



**Abbildung 34:** Enzymatischer Verdau des Glykoproteins Tf mit  $\alpha(2\rightarrow3,6,8,9)$ Neuraminidase im Serum (P.v. 4190) mit anschließender SAX-Chromatographie und ICP-MS Detektion des  $^{56}\text{Fe}$ -Isotops **a)** Inkubation bei 37 °C für 3 h ohne Zugabe von Neuraminidase **b)** Inkubation bei 37 °C für 3 h mit Neuraminidase **c)** Inkubation bei 37 °C für 24 h mit Neuraminidase

**Tabelle 23:** Retentionszeiten ( $t_R$ ) und relativen Peakflächen (area) der Tf-Glykoformen, der SAX-HPLC ICP-MS Chromatogramme (P.v. 4190, Serum) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Enzym Neuraminidase bei 37 °C **a)** 3 h ohne Zugabe von Neuraminidase **b)** 3 h mit Neuraminidase **c)** 24 h mit Neuraminidase

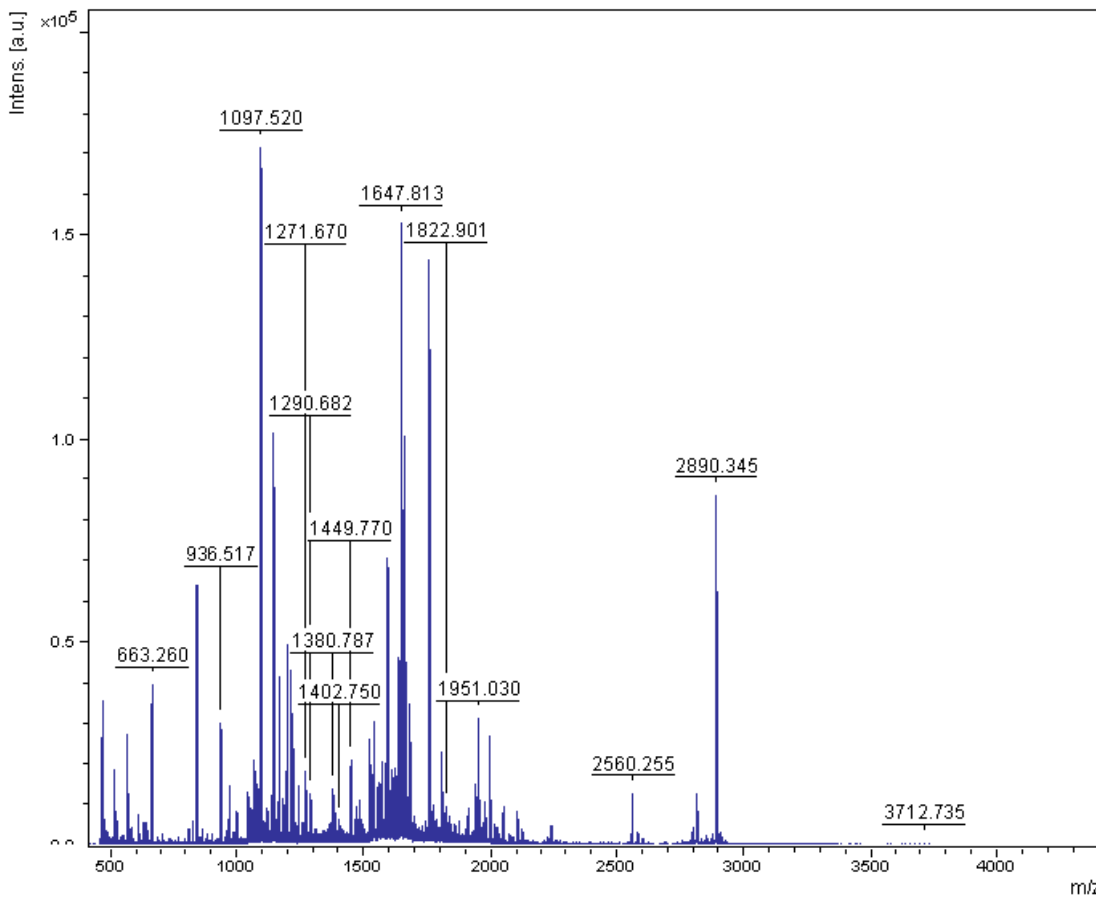
P.v. 4190		a) 3 h ohne	b) 3 h mit	c) 24 h mit
Peak	$t_R$ [min]	area [%]		
<b>S<sub>0</sub></b>	2,1			17,1
<b>S<sub>1</sub></b>	5,0	6,9	9,3	7,3
<b>S<sub>2</sub></b>	7,2	2,7	16,5	69,2
<b>S<sub>3</sub></b>	10,7	2,9	47,3	0,0
<b>S<sub>4</sub></b>	12,9	76,5	23,8	1,3
<b>S<sub>5</sub></b>	14,6	3,9	0,7	
<b>S<sub>6</sub></b>	16,6	1,2	0,9	
<b>S<sub>7</sub></b>	18,5	2,1	0,0	
<b>S<sub>8</sub></b>	20,0	4,0	0,8	

In Abbildung 34a ist die Auftrennung der Tf-Glykoformen nach einer Inkubationszeit von 3 h ohne Zugabe von Neuraminidase dargestellt. Die SAX-Chromatographie ermöglicht unter den optimierten Bedingungen die Auftrennung von acht Tf-Glykoformen aus dem Serum von Seehunden. Die Elution der Proteine ist durch die Anzahl der negativen Ladungen der Proteine definiert, die am geringsten negativ geladenen Proteine eluieren zu Beginn. Je mehr negative Ladungen das Protein aufweist, desto später eluiert es von der SAX-Säule. Dies bedeutet, die Tf-Glykoformen eluieren umso früher, je weniger Sialinsäuren ihre N-Glykanen enthalten. Die Chromatogramme in Abbildung 34b und 34c zeigen die Auftrennung der Serum-Probe nach einer Inkubation mit Neuraminidase für 3 bzw. 24 h bei 37 °C. Der Anteil der spät eluierenden Glykoformen mit einem hohen Anteil an Sialinsäuren (S<sub>4</sub> - S<sub>8</sub>) nimmt dabei stetig ab, während die Konzentration der geringer sialinierten Glykoformen (S<sub>1</sub> - S<sub>3</sub>) zunimmt. Die enzymatische Spaltung mit Neuraminidase bedingt einen fortschreitenden Verlust von endständigen Sialinsäuren der Tf-Glykoformen, wodurch sich deren chromatographische Eigenschaften im Hinblick auf ihre Retentionszeiten ändern. Der enzymatische Abbau dauert so lange an, bis eine zusätzliche Glykoform ohne Sialinsäure an ihren N-Glykanen entsteht, die S<sub>0</sub>-Glykoform (Abbildung 34c). Das typische Tf-Glykoformen-Muster aus Abbildung 34a mit der dominanten Glykoform (76,5 %) verschwindet und ändert sich zu einem Tf-Glykoformen-Muster mit geringer sialinierten Tf-Glykoformen bis hin zu S<sub>0</sub>. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich die verschiedenen Tf-Glykoformen in der Anzahl an Sialinsäuren unterscheiden. Ähnliche Ergebnisse wurden für humanes Tf aufgezeigt (del Castillo Busto *et al.* 2006).

#### 4.2.4. Interspezies-Protein-Identifizierung über tryptische Peptide

In der vorliegenden Arbeit konnten die Analogie der isolierten eisenhaltigen Proteine zu Tf-Glykoformen anderer Säugetiere bestätigt werden. Die größten Übereinstimmungen wurden zu Serotransferrin des Pferdes (*Equus caballus*) gefunden.

Ein Peptidmassenfingerabdruck (*peptide mass fingerprint*, PMF) ist ein wirkungsvolles Werkzeug, um schnell ein einzelnes Protein zu identifizieren, welches aus einem komplexen Proben-Gemisch isoliert wurde. Entsprechende PMF-Daten wurden für eine Interspezies-Protein-Identifizierung verwendet, wobei die Peptidmassen mit den Proteinsequenzen anderer Säugetierspezies verglichen wurden. Eine Interspezies-Protein-Identifizierung ist insbesondere möglich, wenn es sich um konservierte Proteine mit einer Sequenzhomologie von mehr als 70 % handelt. Aufgrund der teilweise identischen Protein-Sequenz besteht eine hohe statistische Wahrscheinlichkeit von vollständigen Sequenzübereinstimmungen einiger Peptide (Lester und Hubbard 2002). Tf erfüllt die grundlegenden Funktionen der Eisenbindung und des Eisentransports im Blut aller Säugetiere. Aufgrund dieser zentralen Funktionen ist auch die strukturegebende AS-Sequenz konserviert. Bei einem Vergleich der Tf verschiedener Säugetiere ergab sich eine Sequenzhomologie von mehr als 80 %. Der Sequenzabgleich von verschiedenen Säugetier-Transferrinen wurde mit einem frei verfügbaren Serviceprogramm<sup>[7]</sup> und mit der Align-Funktion der Swiss-Prot/UniProtKB-Datenbank<sup>[3]</sup> durchgeführt. Die verwendeten Proteinsequenzen sind in der Swiss-Prot/UniProtKB-Datenbank und der NCBI-Datenbank hinterlegt. Der Sequenzvergleich von verschiedenen Serotransferrinen (Rind, Schwein, Pferd, Mensch) wurde mit dem Algorithmus „clustalW“ auf SwissProt/UniProtKB<sup>[3]</sup> durchgeführt und ist in Abbildung A3 beigefügt. Für die Serotransferrine dieser vier Säugetier-Spezies ergaben sich 397 identische AS und 178 ähnliche AS, damit liegt die Sequenzhomologie dieser vier Sequenzen bei 82 %. In Abbildung 35 ist ein MALDI-TOF PMF-Spektrum (P.v. 4191, Spots 5 aus Abbildung 29) der tryptischen Peptide des Seehund-Tfs gezeigt.



**Abbildung 35:** MALDI-TOF PMF-Spektrum von Spot 5 (vgl. Abbildung 29) des Tieres P.v. 4191 nach der Abspaltung der N-Glykane mit PNGaseF und anschließendem Trypsin-Verdau

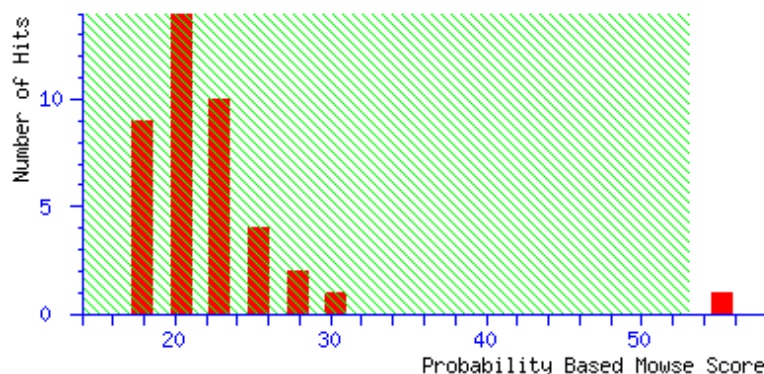
Für den tryptischen Verdau kam methyliertes Trypsin zum Einsatz. Durch die Methylierung des Trypsins erhöht sich die Enzymaktivität und die Autolysereaktionen werden reduziert, wobei die enzymatische Selbstspaltung nicht dauerhaft verhindert werden kann. Die Autolysepeaks von Trypsin mit den Massen 842,5  $m/z$ , 1045,6  $m/z$ , 2211,1  $m/z$  und 2225,1  $m/z$  wurden aus dem Datensatz eliminiert, ebenso wie die Masse 832,0  $m/z$ , die auf den verwendeten Coomassiefarbstoff zurückzuführen ist. Die restlichen Peptidmassen wurden in die Datenbanksuche für die Interspezies-Protein-Identifizierung eingelesen und mit den dort hinterlegten *in silico* Verdauen der Proteine andere Säugetiere verglichen. In Abbildung 36 ist das Ergebnis der Mascot-Suche nach Übereinstimmungen der PMF-Daten mit bekannten Proteinsequenzen abgebildet.

## **MASCOT** Mascot Search Results

User : Grebe  
 Email : mechthild.grebe@gkss.de  
 Search title : Transferrin  
 Database : SwissProt 55.4 (385721 sequences; 138434015 residues)  
 Taxonomy : Other mammalia (11968 sequences)  
 Timestamp : 28 May 2008 at 12:01:17 GMT  
 Top Score : 55 for **TRFE\_HORSE**, Serotransferrin precursor - Equus caballus (Horse)

### Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 53 are significant ( $p < 0.05$ ).



1. [TRFE\\_HORSE](#) Mass: 80268 Score: **55** Expect: 0.036 Queries matched: 9  
 Serotransferrin precursor - Equus caballus (Horse)

Number of mass values matched: 9  
 Sequence Coverage: 17%

Matched peptides shown in **Bold Red**

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss Sequence
133 - 140	887.4290	886.4217	886.4079	16	0 K.SCHTGLGR.S
165 - 180	1757.8004	1756.7932	1756.7661	15	0 K.AVSNFFAGSCVPCADR.T
198 - 214	1994.8770	1993.8697	1993.8087	31	0 K.CACSNHEPYFGYSGAFK.C
215 - 241	2912.3328	2911.3255	2911.4134	-30	1 K.CLADGAGDVAFVKHSTVLENLPQEADR.D
300 - 312	1486.7167	1485.7094	1485.7365	-18	1 K.SKDFHLFSSPHGK.D
302 - 312	1271.6701	1270.6628	1270.6095	42	0 K.DFHLFSSPHGK.D
541 - 549	1097.5202	1096.5130	1096.4978	14	0 R.YGYTGAFRC.C
660 - 681	2560.2551	2559.2478	2559.2163	12	1 R.DDTQCLANLQPTTTYKTYLGEK.Y
697 - 705	1146.5919	1145.5846	1145.5652	17	0 R.LLEACTFHR.V

```

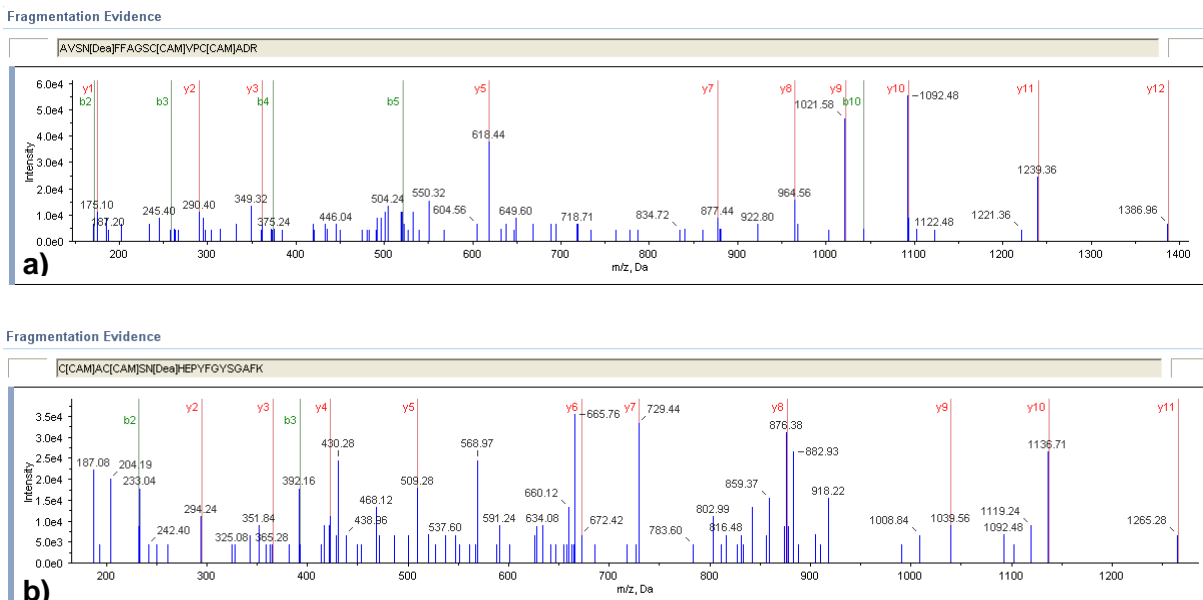
1  MRLAIRALLA  CAVLGLCLAE  QTVRWCTVSN  HEVSKCASFR  DSMKSIVPAP
51  PLVACVKRTS  YLECIKAIAD  NEADAVTLDA  GLVFEAGLSP  YNLKPVVAEF
101 YGSKTEPQTH  YYAVAVVKKN  SNFQLNQLQG  KKSCHTGLGR  SAGWNIPIGL
151 LYWQLPEPRE  SLQKAVSNFF  AGSCVPCADR  TAVPNLCQLC  VGKGTDKCAC
201 SNHEPYFGYS  GAFKCLADGA  GDVAFVKHST  VLENLPQEAD  RDEYQLLCDR
251 NTRKSVDEYK  DCYLASIPSH  AVVARSVDGK  EDLIWGLLNQ  AQEHFGTEKS
301 KDFHLFSSPH  GKDLLFKDSA  LGFLRIPPAM  DTWLYLGYEY  VTAIRNLRED
351 IRPEVPKDEC  KKVKWCAlGH  HEKVKCDEWS  VNSGGNIECE  SAQSTEDCIA
401 KIVKGEADAM  SLDGGFIYIA  GKCGLVPVLA  ENYETRSGSA  CVDTPPEEGYH
451 AVAVVKSSSD  PDLTWNLSKG  KKSCHTGVDV  TAGWNIPIGL  LYSEIKHCEF
501 DKFFREGCAP  GYRRNSTLCN  LCIGSASGPG  RECEPNNHER  YGYTGAFRC
551 LVEKGVAVFV  KHQTVEQNTD  GRNPDDWAKD  LKSENFKLLC  PDGTRKSVTE
601 FKSCYLARAP  NHAVVSRKEK  AACVCQELHN  QQASYGKNGS  HCPDKFCLFQ
651 SATKDLLFRD  DTQCLANLQP  TTYKTYLGE  KYLTAVANLR  QCSTRILLEA
701 CTFHRV

```

**Abbildung 36:** Mascot Ergebnisse der Interspezies-Protein-Identifizierung über die PMF-Spektrum-Daten für die tryptischen Peptide von Spot 5 (vgl. Abbildung 29) des Tieres P.v. 4191

Die Ergebnisse der Interspezies-Protein-Identifizierung über die PMF-Spektrum-Daten für die tryptischen Peptide lieferte eine Liste mit Proteinen, deren Sequenzübereinstimmung mit dem Mascot-Algorithmus berechnet wurde (Abbildung 36). Die größte statistisch signifikante Übereinstimmung der experimentell bestimmten Peptidmassen (P.v. 4191) wurde zum Serotransferrin des Pferdes gefunden. Neun Peptidmassen aus den PMF-Daten sind identisch zu Peptiden des Tf von Pferden. Damit ergibt sich eine Sequenzabdeckung von 17 %.

Zur Verifizierung der Interspezies-Protein-Identifizierung über die PMF-Sequenz-Daten wurden nano-HPLC-ESI-MS/MS Experimente der tryptischen Peptide durchgeführt (P.v. 4191). In Abbildung 37a und Abbildung 37b sind beispielhaft zwei Fragmentspektren für Spot 1 (vgl. Abbildung 29) abgebildet, die entsprechenden y- und b-Ionenserien der fragmentierten Peptide sind im Anhang (Tabelle A2) beigefügt. Für weitere Spots der anderen Tf-Glykoformen wurden analoge Ergebnisse erzielt.



**Abbildung 37:** Zwei Fragmentspektren **a)** 1756,98  $m/z$  und **b)** 1994,17  $m/z$  aus nano-HPLC-ESI-MS/MS-Experimenten der tryptischen Peptide von Spot 1 (vgl. Abbildung 29) des Tieres P.v. 4191

Diese beiden Fragmentspektren wurden mit einer Verlässlichkeit von 99 % angegeben (siehe Tabelle A2). Die y- und b-Ionenserien dieser beiden und eines weiteren Fragmentspektrums mit einer Verlässlichkeit von 99 % sind im Anhang beigefügt. Die so experimentell ermittelten Aminosäuresequenzen der drei Peptide decken sich mit denen durch den Mascot-Algorithmus aufgrund der PMF-Daten vorgeschlagenen Sequenzen. Diese Peptidsequenzen wurden ebenfalls für weitere als Tf-Glykoformen zugeordneten 2D-Gelspots erhalten.

Ferner wurde für die durch die ESI-MS/MS-Experimente ermittelten Peptidsequenzen ein MS-Blast (*basic local alignment search tool*)-Suche durchgeführt. Dazu wurden die massen-



spektrometrisch ermittelten Peptidsequenzen mit den Sequenzen einer Proteindatenbank (SwissProt/UniProtKB<sup>[3]</sup>) abgeglichen.

Als Resultat der Suche wurden ausschließlich Proteine der Transferrinfamilie ausgegeben, diese drei Peptide [AVSNFFAGSCVPCADR (1757,98 *m/z*), CACSNHEPYFGYSGAFK (1994,17 *m/z*) und YGYTGAFR (1096,61)] sind proteotypisch für Proteine der Tf-Familie, wie Serotransferrin und Lactoferrin.

Die Ergebnisse der Interspezies-Protein-Identifizierung über die tryptischen Peptide von Tf (P.v. 4191) sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

**Tabelle 24:** Zusammenfassung der Identifizierung durch den Interspezies-Vergleich der tryptischen Peptide des Seehund-Tfs (P.v. 4191)

<i>m/z</i>	Sequenz	Organismus	MS/MS Daten	MS Blast der Peptidsequenz
887,429	SCHTGLGR	Pferd		
1757,8004	AVSNFFAGSCVPCADR	Pferd	ja	nur Transferrin Familie
1994,877	CACSNHEPYFGYSGAFK	Pferd	ja	nur Transferrin Familie
2912,3328	CLADGAGDDVAFVKHSTVLENLPQEADR	Pferd		
1486,7167	SKDFHLFSSPHGK	Pferd		
1271,6701	DFHLFSSPHGK	Pferd		
1097,5202	YGYTGAFR	Pferd	ja	Transferrin
2560,2551	DDTQCLANLQPTTTYKTYLGEK	Pferd		
1146,5919	LLEACTFHR	Pferd		

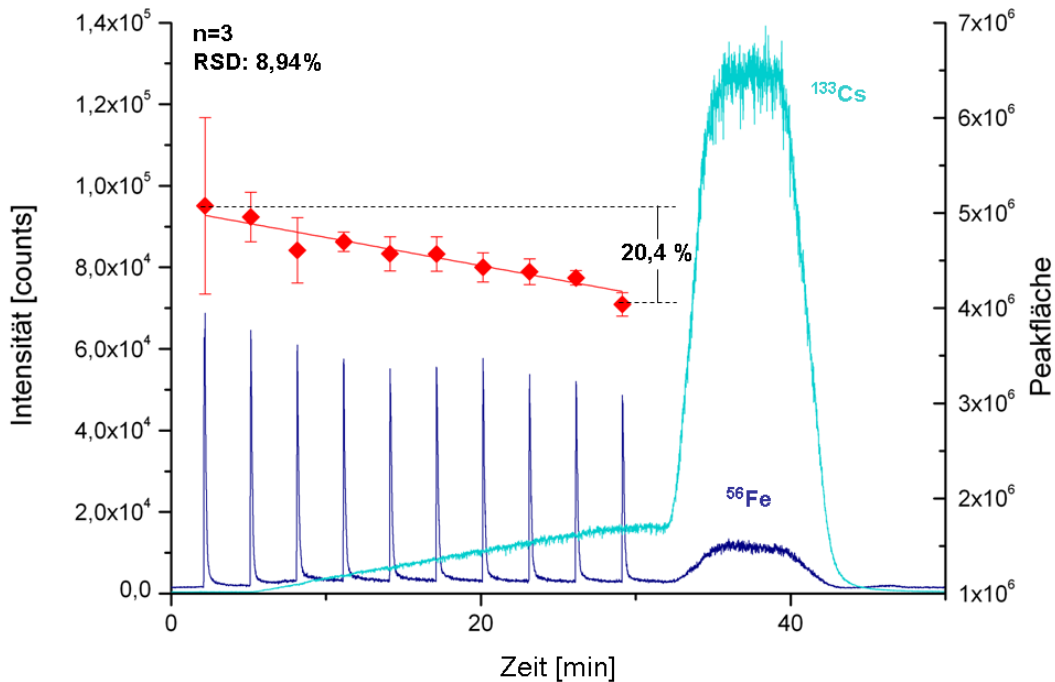
Analoge Ergebnisse wurden auch für die tryptischen Peptide des Tieres P.v. 4190 gefunden. Für die isolierten eisenhaltigen Proteine wurden durch die Kombination von Teilsequenzierung und anschließendem Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit in Datenbanken hinterlegten Proteinsequenzen eine Homologie zu den Tf-Glykoformen anderer Säugetier bestätigt. Die Summe, der mit den molekülspezifischen Methoden erhaltenen Ergebnisse erlaubt insgesamt eine Identifizierung der eisenhaltigen Proteine als Seehund-Tf. Die Übereinstimmungen waren für das Serotransferrin des Pferdes am größten.

### 4.3. Absolute Quantifizierung der Transferrin-Glykoformen mit HPLC-FIA-ICP-MS

#### 4.3.1. Kompensation der gradientenbedingten Matrixeffekte für die ICP-MS-Detektion von Eisen

Die Elution der Proteine von einer SAX-Säule erfolgt durch steigende Salzkonzentration, welche in das Plasma des ICP-MS eingetragen wird. Um dadurch verursachte mögliche Matrixeffekte bei der Fe-Detektion zu erkennen, wurden wiederholte Flussinjektionen mit einem 1 mg/L Fe-Standard über den Verlauf des verwendeten Gradienten injiziert.

In Abbildung 38 ist das daraus resultierende Chromatogramm dargestellt. Die Intensitäten von  $^{56}\text{Fe}$  und  $^{133}\text{Cs}$  wurden detektiert, auf der Sekundärachse sind die Mittelwerte der Peakflächen der Flussinjektionen (drei Wiederholungen mit Standardabweichung) in Rot aufgetragen.

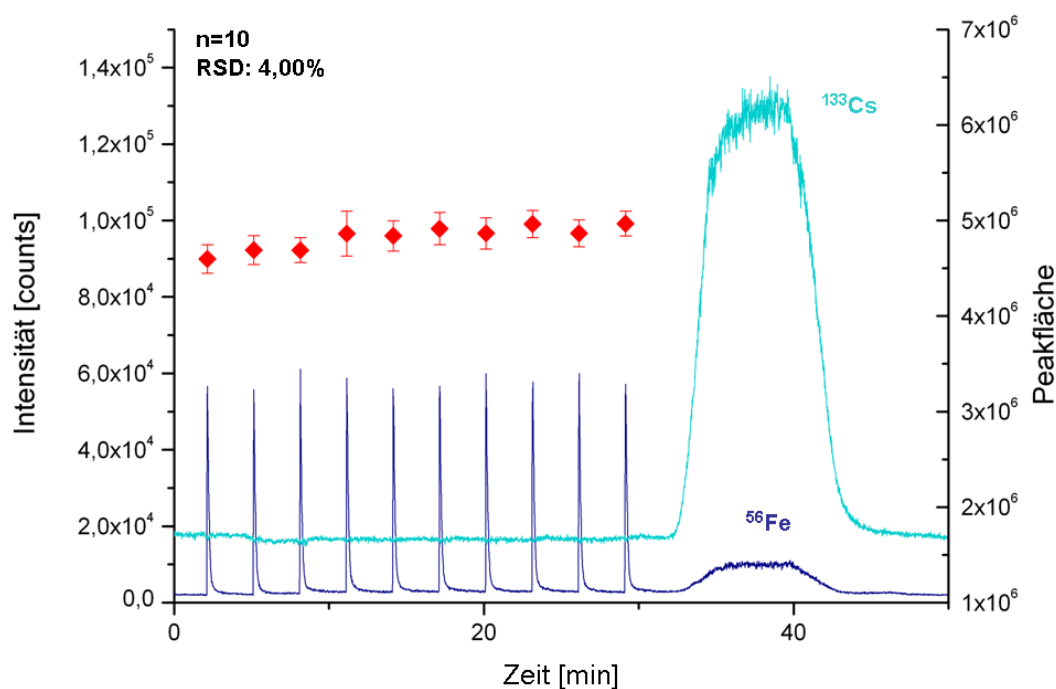


**Abbildung 38:** Einfluss des Ammoniumacetat-Gradienten auf die ICP-MS Eisen-Detektion, illustriert durch wiederholte Flussinjektionen mit einem Fe-Standard im Verlauf des Gradienten. Die roten Punkte sind die Mittelwerte der Peakflächen ( $n=3$ , RSD 8,94 %) der  $^{56}\text{Fe}$  Intensität (Grebe *et al.* 2011).

Abbildung 38 zeigt einen starken Effekt auf die ICP-MS Detektion des Eisens, bedingt durch den erhöhten Salz-Eintrags ins Plasma, wie durch die Mittelwerte der Peakfläche von drei Wiederholungsmessungen verdeutlicht wird. Die gemessenen Peakflächen werden mit zunehmender Salz-Konzentration geringer. Die maximale Salzfracht bei 12 % des Elutionspuffers, die in das Plasma eingebracht wurde, betrug 60 mM Ammoniumacetat. Diese Matrix-Unterschiede führten zu einer relativen Standardabweichung (*relative standard deviation*, RSD) aller Peakflächen von 8,94 %. Dadurch wurde eine präzise Quantifizierung stark beeinträchtigt. Vergleicht man die Peakflächen der ersten (0 mM Ammoniumacetat) und der letzten Flussinjektion (60 mM Ammoniumacetat), so resultiert der Salz-Eintrag in einem Verlust von 20,4 % der gemittelten Peakflächen.

Der für die Chromatographie notwendigen Salzgradienten verursacht Matrixeffekte, die für akkurate quantitative Messungen kompensiert werden müssen. Dazu wurde der Gradient durch einen nach der Chromatographie hinzugefügten gegenläufigen Gradienten ausgeglichen. Durch den verwendeten instrumentellen Aufbau (siehe Abbildung 22) kann die chromatographische Auftrennung der Tf-Glykoformen unter Gradientenbedingungen erfolgen, während die elementspezifische Detektion unter isokratischen Bedingungen

abläuft. Die finale Konzentration an Ammoniumacetat, die ins Plasma gelangt, wurde durch den reversen Gradienten auf konstante 30 mM Ammoniumacetat reduziert. In Abbildung 39 ist das Chromatogramm dargestellt, welches unter Verwendung des Gradientenausgleichs während der zehn Flussinjektionen entstanden ist. Zur Überwachung des Anteils an Elutionspuffers im Plasma wurde das als interner Standard verwendete Cs detektiert. In Rot sind die Mittelwerte der Peakflächen der drei Wiederholungen mit Standardabweichung aufgetragen.



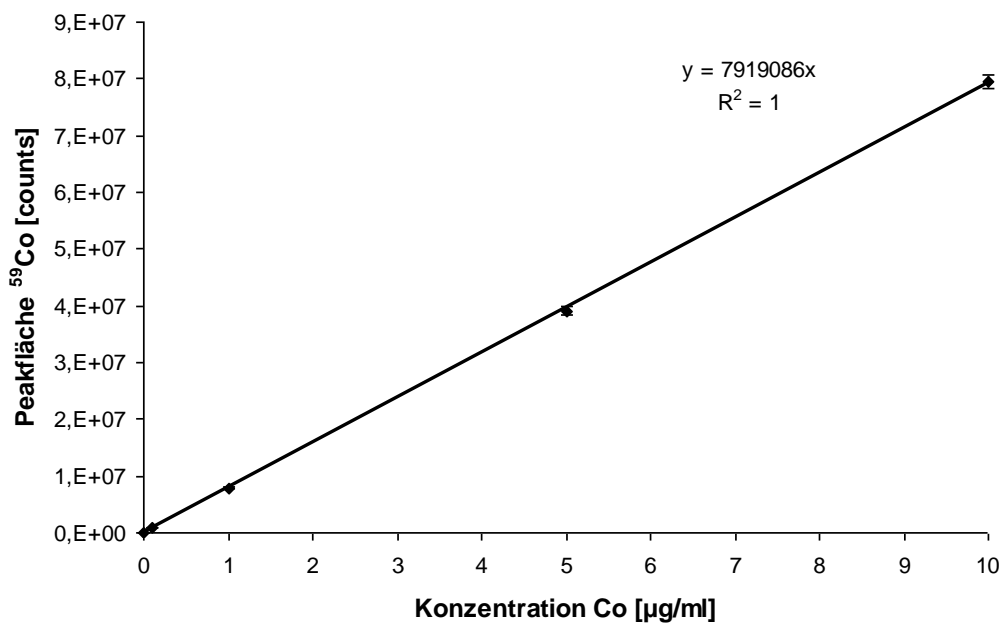
**Abbildung 39:** Kompensation der Matrixeffekte auf die ICP-MS Eisen-Detektion durch Verwendung des gegenläufigen Gradienten, illustriert durch wiederholte Flussinjektionen mit einem Fe-Standard im Verlauf des Gradienten. Die roten Punkte sind die Mittelwerte der Peakflächen ( $n=10$ , RSD 4,00 %) der  $^{56}\text{Fe}$  Intensität (Grebe *et al.* 2011).

In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass der Einfluss der gradientenbedingten Matrixeffekte auf die Detektion von Eisen minimiert wurde. Durch den Einsatz der Pumpe 2 zur Erzeugung des gegenläufigen Gradienten erfolgte ein Ausgleich der Salzkonzentration, so dass konstantere Peakflächen während der Flussinjektionen des Eisenstandards detektiert wurden. Die relative Standardabweichung der 30 einzelnen Flussinjektionen über den Gradienten der drei Wiederholungsmessungen beträgt bei diesem Aufbau lediglich 4 %.

Das stabile  $^{133}\text{Cs}$ -Signal über den Zeitraum des Gradientenverlaufs zeigt die Präzision der Zusammenarbeit der beiden Pumpen. Die unterschiedlichen Längen der Kapillaren von Pumpe 1 und Pumpe 2, zusätzlich zum Totvolumen der verwendeten Säule, wurden durch die Zeitverzögerung von 0,5 min der Gradienteneinstellungen von Pumpe 2 ausgeglichen.

### 4.3.2. Bestimmung des Probenschleifen-Volumens

Zur absoluten Quantifizierung mittels FIA basierter Kalibrierung ist die Kenntnis des exakten Probenschleifen-Volumens für die Berechnungen notwendig (vgl. Kapitel 3.5.2.). Die Kalibrierung der PEEKsil Probenschleife mit dem Totvolumen des externen Ventils wurde nach Giusti *et al.* (2005) mit einem 1 g/L Co-Standard dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. In Tabelle 25 sind die Werte für eine der drei Kalibrierkurven aufgelistet und in Abbildung 40 diese entsprechend graphisch dargestellt.



**Abbildung 40:** Kalibrierkurve:  $^{59}\text{Co}$ -Intensität (Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken) aufgetragen gegen die Co-Konzentration, mit der daraus resultierenden Geradengleichung  $y = 7919086 x$ , 5  $\mu\text{L}$  Injektionsvolumen, isokratisch 2%  $\text{HNO}_3$  0,5 mL/min.

**Tabelle 25:** Kobalt Konzentrationen und  $^{59}\text{Co}$ -Intensitäten mit Mittelwert ( $\bar{x}$ ), SD und RSD für eine der drei externen Kalibrierungen

Co [ $\mu\text{g/ml}$ ]	area(1)	area(2)	area(3)	$\bar{x}_{\text{area}}$	$\text{SD}_{\text{area}}$	$\text{RSD}_{\text{area}}$ [%]
0,1	811278	816964	806844	811695	5073	0,62
1	8010391	7931105	7677138	7872878	174090	2,21
5	39926628	39066603	38303826	39099019	811886	2,08
10	79174170	78489765	80666526	79443487	1113091	1,40

Zur Berechnung des Volumens der Probenschleife wurde die Geradengleichung der externen Kalibrierung nach  $x$  aufgelöst. Dies ist für die Geradengleichung der oben gezeigten Kalibrierkurve im Folgenden beispielhaft gezeigt.

$$x = y/7919086$$

**Gleichung 32**

Mit Gleichung 32 wurde die entsprechende Co-Konzentration in der jeweiligen Probe und nachfolgend auch die absolute Menge an Co in der Probe berechnet. Für  $y$  wird der jeweilige Mittelwert der Peakflächen der dreimaligen Injektion der aufgesammelten Co-Lösung

eingesetzt. Der berechnete Wert  $x$  entspricht der Co-Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$ . Multipliziert mit dem Volumen der aufgesammelten Probe und dividiert durch die eingesetzte Co-Konzentration von 1 g/L ergibt sich das Probenschleifenvolumen in  $\mu\text{L}$ . In Tabelle 26 ist für alle 19 Proben die Berechnung und die daraus resultierenden Werte für das Probenschleifenvolumen erfasst.

**Tabelle 26:** Volumen der Proben,  $^{59}\text{Co}$ -Intensitäten, Mittelwert und Standardabweichung der Kalibrierung der Probenschleife für die Flussinjektion mit einem Co-Standard und Berechnung des Probenschleifenvolumens

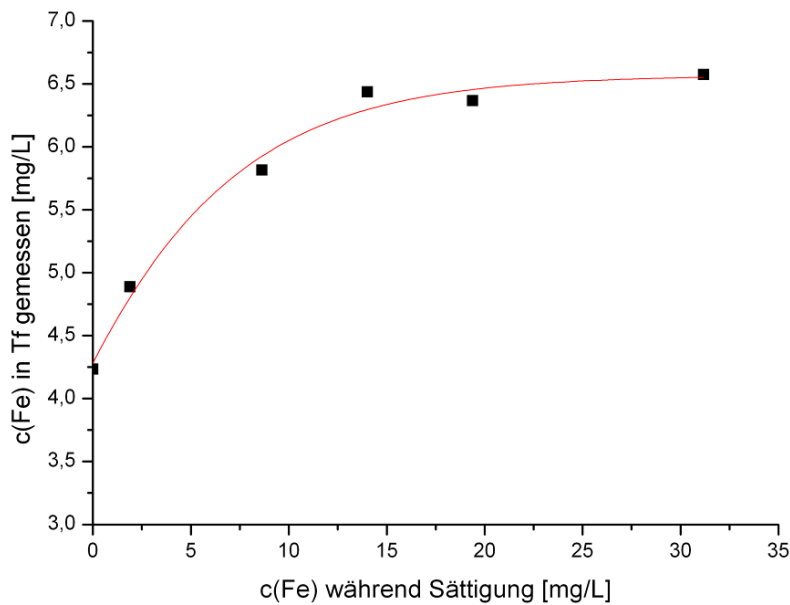
Probe	Volumen [mL]	Peakfläche			Mittelwert	SD	Konzentration Co [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Co [ $\mu\text{g}$ ]
		1	2	3				
1	1,0327	67820821	68628409	67316814	67922015	661627	8,577	8,857
2	1,0506	64731722	66228118	66500065	65819968	952207	8,312	8,732
3	1,0572	65635872	66205681	63608337	65149963	1365148	8,227	8,698
4	0,9945	70331534	70123038	71311812	70588795	634770	8,914	8,865
5	1,0194	67437810	66837566	68135500	67470292	649576	8,520	8,685
6	1,0346	66930072	68501084	67019996	67483717	882212	8,522	8,817
7	1,0123	68316116	69339565	66815152	68156944	1269711	8,607	8,713
8	1,0264	68249086	67973801	66571740	67598209	899541	8,536	8,761
9	1,0663	63320308	68209765	67819748	66449940	2717347	8,087	8,624
10	1,1254	64439557	63144093	64289466	63957705	708594	7,784	8,760
11	1,0405	68761131	67800949	69366724	68642935	789551	8,354	8,693
12	1,0383	67969236	67937892	68001319	67969482	31714	8,272	8,589
13	1,0967	65018970	67875560	64244144	65712891	1912574	7,998	8,771
14	1,0252	70496145	69607721	70246769	70116878	458234	8,534	8,749
15	1,08	67019299	66112205	65127069	66086191	946383	8,043	8,687
16	1,0408	48656232	50348230	50182903	49729122	932820	8,296	8,634
17	1,0444	48505889	51585733	49614880	49902167	1559891	8,325	8,694
18	1,0559	50946952	49028898	47546753	49174201	1704750	8,203	8,662
19	1,0538	49089972	49658965	50181024	49643320	545694	8,281	8,727
							<b>Mittelwert [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>8,722</b>
							<b>SD</b>	<b>0,074</b>
							<b>RSD [%]</b>	<b>0,84</b>

Das experimentell ermittelte Probenschleifenvolumen beträgt  $8,722 \mu\text{L} \pm 0,074 \mu\text{L}$ . Dieses exakte Probenschleifenvolumen wurde im Weiteren für die entsprechenden Berechnungen bei der Quantifizierung genutzt.

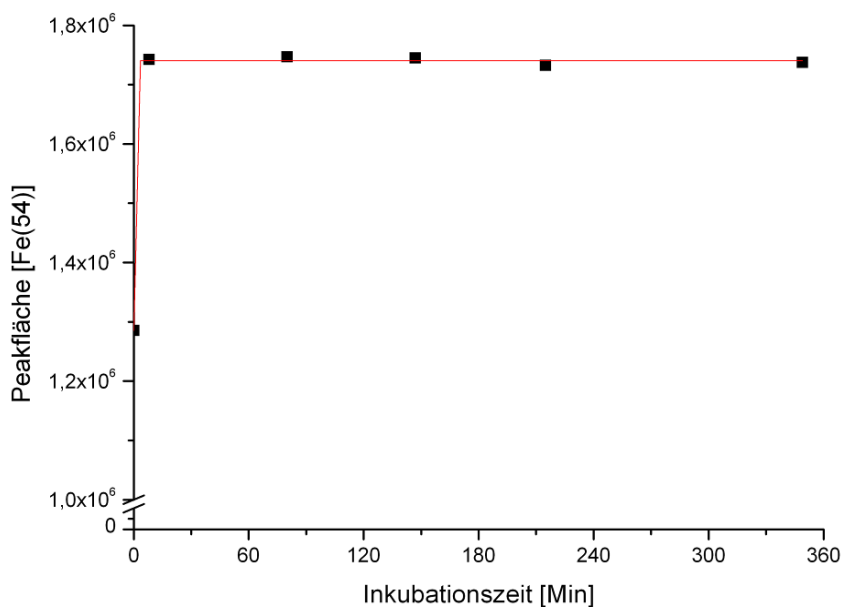
#### 4.3.3. Untersuchung zur Eisensättigung von Transferrin aus Seehundblut

Die absolute Quantifizierung von Tf beruht auf der bekannten Stöchiometrie des mit Eisen gesättigten Fe-Tf-Komplexes. Um die optimale Konzentration an Eisen während der Sättigung zu ermitteln, die notwendig ist, um eine vollständige Absättigung mit Eisen zu erreichen, wurden während der Sättigung von Tf mit Eisen verschiedene Eisenkonzentrationen verwendet und im Anschluss die Fe-Konzentration mit SAX-HPLC-ICP-MS quantifiziert. In Abbildung 41 ist diese konzentrationsabhängige Sättigungskurve für die Bildung des Fe-Tf-Komplexes am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4190 gezeigt.

In Abbildung 42 ist die zeitabhängige Sättigungskurve dargestellt. Am Beispiel eines nur teilweise gesättigten humanen Tf-Standards wurde die Bildung des Fe-Tf-Komplexes nach der SEC-Auftrennung mit ICP-MS detektiert. Für beide Sättigungskurven wurden keine Standardabweichungen berechnet, da bei den Wiederholungsmessungen nicht die exakt gleiche Fe-Konzentrationen eingesetzt bzw. zu den exakt gleichen Zeitpunkten gemessen werden konnte.



**Abbildung 41:** Konzentrationsabhängige Sättigungskurve für die Bildung des Fe-Tf-Komplexes am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4190 nach der SAX-HPLC-ICP-MS Detektion



**Abbildung 42:** Zeitabhängige Sättigungskurve für die Bildung des Fe-Tf-Komplexes am Beispiel eines teilweise gesättigten humanen Tf-Standards nach der SEC-HPLC-ICP-MS Detektion.

Die Abbildung 41 zeigt, dass ab einer Fe-Konzentration von wenigstens 15 mg/L in dem Probengemisch während der Sättigung ein konstanter Tf-Fe-Level erreicht wurde. Auch bei höheren Fe-Konzentrationen wurde keine weitere Verbesserung des Sättigungsgrades von Seehund-Tf erreicht. Um die überschüssige Fe-Konzentration während der Chromatographie gering zu halten, wurde im Weiteren mit einer Fe-Konzentration von 40 mg/L gearbeitet. Diese Konzentration entspricht einem 6fachen Überschuss an Eisen in Bezug auf eine zu erwartende Tf-Konzentration von 2,8 g/L.

In Abbildung 42 ist die zeitabhängige Sättigungskurve für die Bildung des Fe-Tf-Komplexes am Beispiel eines teilweise gesättigten humanen Tf-Standards nach der SEC-HPLC ICP-MS Detektion dargestellt. Der Sättigungsprozess weist eine hohe Reaktionskinetik auf, so dass bereits nach 8 min eine vollständige Sättigung des Tfs mit Eisen beobachtet wurde. Eine zusätzliche Verlängerung der Inkubationszeit führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der gemessenen Peakflächen. Alle weiteren Experimente wurden im Folgenden mit einer 30minütigen Inkubation für die Sättigung und weiteren 30 min Inkubationszeit für die Lipoproteinfällung durchgeführt.

#### **4.3.4. Validierung der analytischen Methode zur Quantifizierung von Transferrin**

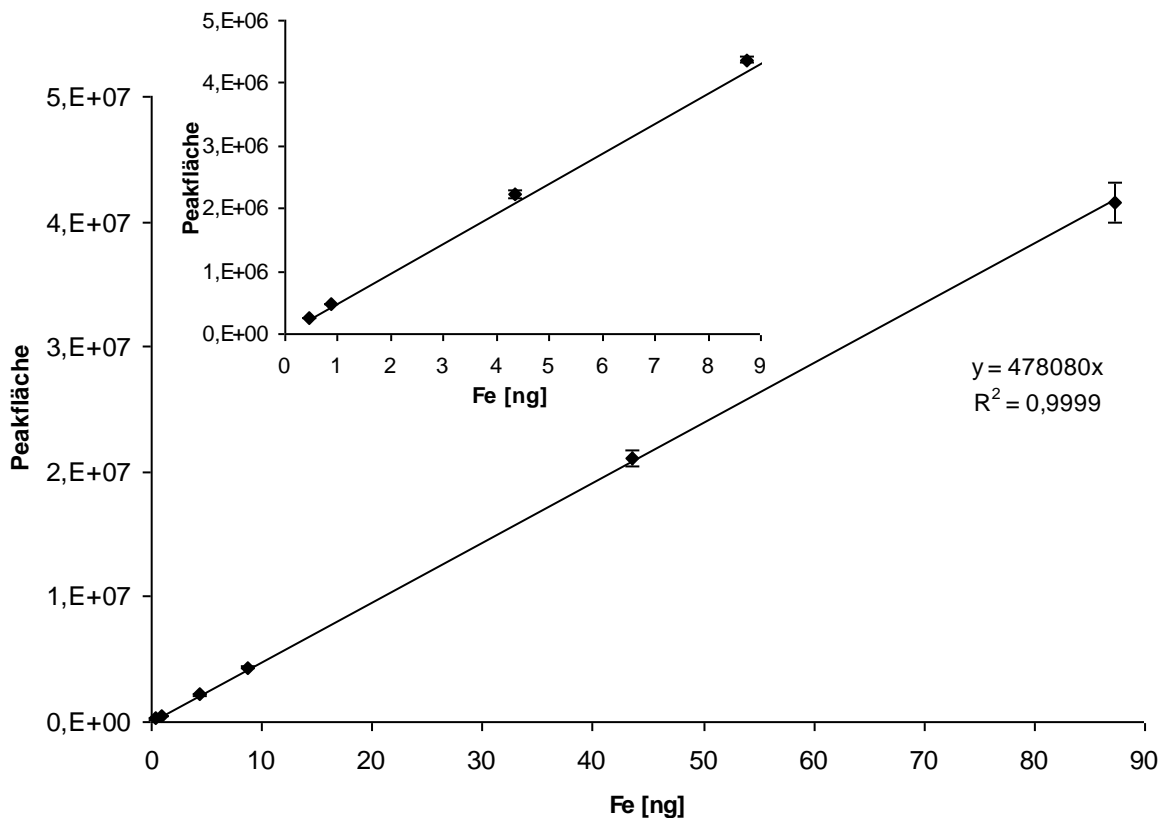
##### **4.3.4.1. Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze**

Zur Feststellung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*signal-noise-ratio*, S/N) der Peakflächen des Fe-Standards zu dem Untergrundrauschen des  $^{56}\text{Fe}$ -Signals nach Gleichung 33 (siehe Anhang) bestimmt. Bei einem S/N-Verhältnis von  $\geq 3$  wurde die Nachweisgrenze festgesetzt und bei einem S/N-Verhältnis von  $\geq 10$  liegt die Bestimmungsgrenze. Die Flussinjektionen wurden unter den oben genannten chromatographischen Bedingungen für die FIA mit gegenläufigem Gradienten mit unterschiedlich konzentrierten Fe-Standardlösungen durchgeführt. In Tabelle 27 sind jeweils die Mittelwerte  $\bar{x}$  der ermittelten Peakflächen der drei Flussinjektionen mit den zugehörigen SD und den eingesetzten Eisenkonzentrationen sowie die entsprechenden injizierten absoluten Fe-Mengen aufgelistet.

Die Kalibrierkurve (n=3) weist eine hohe Linearität auf, auch im unteren Konzentrationsbereich, mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9999$  (Abbildung 43).

**Tabelle 27:** Die jeweils injizierten Eisenkonzentrationen und entsprechende absolute Eisenmenge einer Flussinjektion (8,722  $\mu\text{L}$  über die Probenschleife), der Mittelwert der Peakfläche ( $\bar{X}_{\text{area}}$ ) mit SD und RSD. Mobile Phase A: 20 mM Bis-Tris, und B: 20 mM Bis-Tris + 500 mM Ammoniumacetat, mit Gradientenkompensation bei einem Fluss von 0,75 mL/min beider Pumpen

n	Fe [ $\mu\text{g/L}$ ]	Fe [ $\text{pg}/\mu\text{L}$ ]	Fe [ $\text{pg}$ ]	Fe [ $\text{ng}$ ]	$\bar{X}_{\text{area}}$	$\text{SD}_{\text{area}}$	$\text{RSD}_{\text{area}}$ [%]
3	10	10	87,22	0,08722			
3	20	20	174,44	<b>0,17444</b>			<b>S/N <math>\geq 3</math></b>
3	50	50	436,1	<b>0,4361</b>	249386	10246	4,11
3	100	100	872,2	0,8722	467391	4744	1,01
3	500	500	4361	4,361	2221835	66714	3,00
3	1000	1000	8722	8,722	4369976	50247	1,15
3	5000	5000	43610	43,61	21112844	677292	3,21
2	10000	10000	87220	87,22	41538691	1567061	3,77



**Abbildung 43:** Kalibrierkurve:  $^{56}\text{Fe}$ -Intensität (Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken) aufgetragen gegen die jeweils injizierten Eisenmengen, mit der daraus resultierenden Geradengleichung  $y = 478080x$ ,  $n=3$ , 8,722  $\mu\text{L}$  Injektionsvolumen über die Probenschleife, 0,75 mL/min mit beiden Pumpen, Puffer A und B mit teilweise gegenläufigem Gradient. Vergrößerung des Konzentrationsbereichs von 0 – 9 ng Fe

Die Flussinjektion für die 1-Punkt-Kalibrierung soll mit einer geeigneten Eisenkonzentration erfolgen, so dass die Peakfläche im Bereich der zu erwartenden Flächen der einzelnen Tf-Glykoformen-Peaks liegt. Die Tf-Glykoformen liegen in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor, daher wurde eine mittlere Fe-Konzentration für die Flussinjektionen gewählt. Im Folgenden wurden die Flussinjektionen zur Quantifizierung mit einer 1 mg/L Fe-Standardlösung durchgeführt.



Bei der Injektion (n=3) mit einer Fe-Standardlösung der Konzentration von 20 µg/L lag das S/N-Verhältnis bei  $\geq 3$  und bei einer Konzentration von 50 µg/L wurde  $S/N \geq 10$  berechnet. Damit liegt die Nachweisgrenze bei einer absoluten Eisenmenge von 174,4 pg Fe (126,7 ng Seehund-Tf) und die Bestimmungsgrenze bei 436,1 pg Fe (316,8 ng Seehund-Tf). Dies entspricht einer Konzentration an Seehund-Tf von 14,53 mg/L bzw. 36,32 mg/L.

Die Nachweisgrenze ist durch den relativ hohen Eisenuntergrund limitiert. Die Minimierung des Eiseneintrags durch die Pufferchemikalien kann diese verbessern.

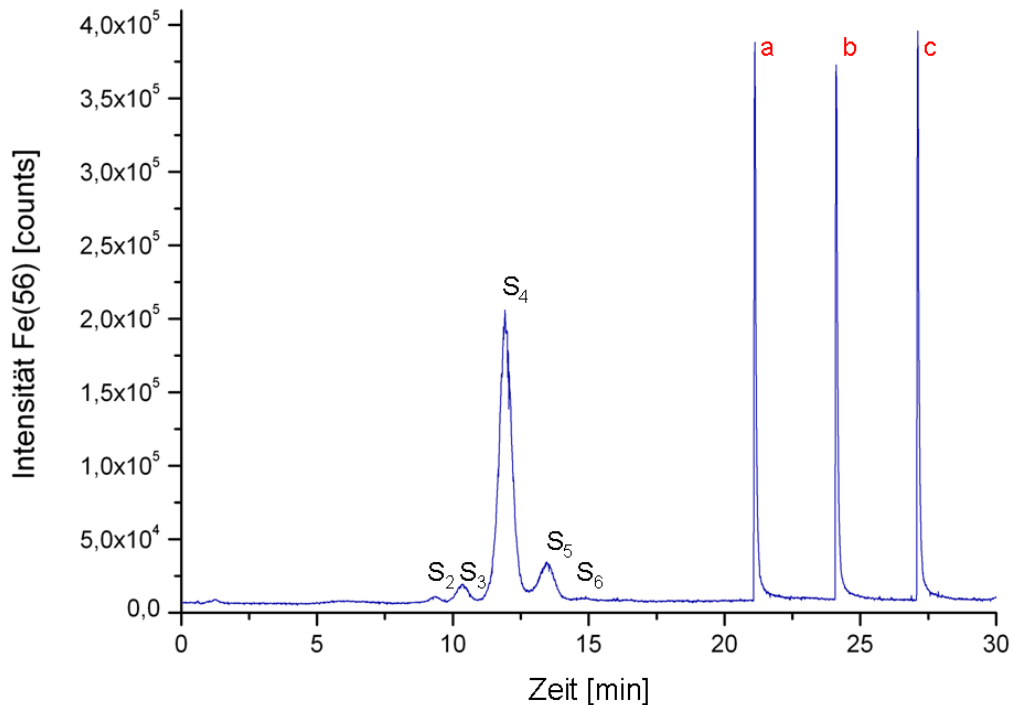
Die Nachweisgrenzen von antikörperbasierten Methoden liegen um ein vielfaches niedriger. Beispielsweise wurde bei dem getesteten ELISA für die Quantifizierung von Hunde-Tf 6,25 µg/L Tf als geringste Konzentration in der Kalibrierung eingesetzt. Allerdings war in diesem Fall die Anwendbarkeit für Seehund-Tf nicht gegeben. Aber auch für die vorgesehene Spezies birgt der Test Variabilitäten, innerhalb einer Abweichung von 20 % wird der Test laut Herstellerangaben als treffend angesehen. Des Weiteren können unspezifische Wechselwirkungen den Test beeinflussen, z.B. durch die Verwendung von polyklonalen Antikörpern, die gegen mehrere verschiedenen Epitope eines Antigens gerichtet sind.

So sind Spezies-unabhängige Methoden den verschiedenen Immuno-Verfahren vorzuziehen, z.B. die, in der humanen Diagnostik, routinemäßig eingesetzte HPLC-UV/Vis Detektion der einzelnen Glykoformen über die spezifische Absorption des Fe-Tf-Komplexes bei 460 nm. Die Nachweisgrenze bei der UV/Vis-Detektion wird für die einzelnen humanen Tf-Glykoformen mit 4,8 - 12,0 mg/L angegeben (del Castillo Busto *et al.* 2009b). Dagegen werden mit der eisenspezifischen ICP-MS-Detektion des humanen Tfs Nachweisgrenzen von 1,6 - 3,2 mg/L erreicht (del Castillo Busto *et al.* 2009b).

Für reale Serum-Proben von Seehunden liegen die Nachweisgrenzen für die verschiedenen ICP-MS basierten Methoden höher. Die Nachweisgrenzen für die einzelnen in dieser Arbeit entwickelten ICP-MS basierten Quantifizierungsmethoden werden zum Vergleich in den entsprechenden Kapiteln (4.3.5. / 4.4.2. / 4.4.3. / 4.4.5. / 4.4.6.) für jeweils die dominante Glykoform S<sub>4</sub> des Tieres P.v. 4191 angegeben.

#### **4.3.4.2. Präzision der absoluten Transferrin-Quantifizierung**

Da für Seehund-Tf kein Referenzmaterial zur Verfügung steht, wurde ein zertifiziertes Referenzmaterial für humanes Serum (ERM-DA470k/IFCC) zur Validierung der analytischen Methode verwendet. Diese beinhaltet die Tf-Sättigung mit Eisen, die Lipoproteinfällung und die FIA-basierte Kalibrierung bzw. Quantifizierung nach der SAX-HPLC-ICP-MS. In Abbildung 44 ist ein typisches Chromatogramm des humanen Referenzserums abgebildet, detektiert wurde das <sup>56</sup>Fe-Hauptisotops für die Bestimmung der Tf-Glykoformen.



**Abbildung 44:** Ein typisches SAX-HPLC-ICP-MS Chromatogramm des zertifizierten humanen Referenzserums (ERM-DA470k/IFCC), mit drei Flussinjektionen (a, b, c) mit einem 1 mg/L Fe-Standard, detektiert wurde das  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotops.

Die Auftrennung der Tf-Glykoformen mit der verwendeten SAX-Säule PoroshQ liefert unter den genannten chromatographischen Bedingungen basislinien-getrennte Peaks für die Glykoformen  $S_2$ ,  $S_3$ , die Hauptglykoformen  $S_4$ ,  $S_5$  und andeutungsweise für  $S_6$ . Dieses Glykoformen-Muster für humanes Tf ist aus der Literatur bekannt, ebenso wie die Zuordnung der einzelnen humanen Tf-Glykoformen anhand ihres Sialinsäuregehaltes (del Castillo Busto *et al.* 2005; 2006; Helander und Bergström 2006).

Nach der Chromatographie wurden die einzelnen Glykoformen über die bekannte Eisenstöchiometrie mittels FIA quantifiziert. Es wurde eine Tf-Konzentration von  $2,33 \pm 0,03$  g/L aus der Summe alle Tf-Glykoformen berechnet. Diese gemessene Konzentration stimmt im Rahmen der Messungenauigkeit mit der für das Referenzserum zertifizierten Gesamt-Tf-Konzentration von  $2,35 \pm 0,08$  g/L überein (Tabelle 28).

**Tabelle 28:** Zusammenstellung der experimentell bestimmten Tf- und CDT-Konzentration sowie die zertifizierte Tf-Konzentration für das humane Referenzserum ERM-DA470k/IFCC

ERM-DA470k/IFCC n=3	experimentell bestimmt			zertifiziert Tf (g/L)
	Tf (g/L)	CDT(g/L)	CDT/Tf	
a	2,35	0,03	0,0140	
b	2,30	0,04	0,0169	
c	2,33	0,05	0,0207	
Mittelwert	<b>2,33</b>	0,04	0,0172	<b>2,35</b>
SD	0,03	0,01	0,0034	0,08

#### 4.3.4.3. Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung der Tf-Glykoformen

Für die präzise Quantifizierung ist ebenfalls eine reproduzierbare Chromatographie notwendig. In Tabelle 29 sind die Mittelwerte der Retentionszeiten  $\bar{x}(t_R)$  mit den zugehörigen RSD und den RSD der Peakflächen für die Tf-Glykoformen des zertifizierten humanen Referenzserums (ERM-DA470k/IFCC) aufgeführt. Tabelle 30 gibt einen Überblick über die für die Trennung der Tf-Glykoformen aus Seehund-Serum geltenden chromatographischen Kenngrößen.

**Tabelle 29:** Zusammenstellung der Mittelwerte der Retentionszeiten  $\bar{x}(t_R)$  mit zugehöriger relativen Standardabweichung (RSD) und der relativen Standardabweichung der Peakflächen für die Tf-Glykoformen des zertifizierten humanen Referenzserums (ERM-DA470k/IFCC, n=3).

Peak	$\bar{x}(t_R)$ [min]	RSD( $t_R$ ) [%]	RSD <sub>Peakfläche</sub> [%]
S <sub>2</sub>	9,36	0,24	5,59
S <sub>3</sub>	10,37	0,17	1,35
S <sub>4</sub>	11,94	0,24	1,84
S <sub>5</sub>	13,44	0,18	5,23
S <sub>6</sub>	14,93	0,50	0,48

**Tabelle 30:** Zusammenstellung der Mittelwerte der Retentionszeit  $\bar{x}(t_R)$  mit zugehörigen RSD und die RSD der Peakflächen der Tf-Glykoformen einer Serum-Probe von P.v. 4190 (n=3) nach der SAX-Chromatographie mit HPLC-ICP-MS.

Peak	$\bar{x}(t_R)$ [min]	RSD( $t_R$ ) [%]	RSD <sub>Peakfläche</sub> [%]
S <sub>1</sub>	4,97	0,87	8,83
S <sub>2</sub>	7,11	1,39	9,32
S <sub>3</sub>	10,62	0,87	6,08
S <sub>4</sub>	12,92	0,27	2,42
S <sub>5</sub>	14,57	0,16	8,61
S <sub>6</sub>	16,50	0,32	2,79
S <sub>7</sub>	18,55	0,29	4,56
S <sub>8</sub>	19,99	0,19	3,46

Bei der Verwendung des Gradientenausgleichs durch die zweite HPLC-Pumpe wurden reproduzierbare Auftrennungen der Tf-Glykoformen im Hinblick auf die Retentionszeit und die aus der Peakfläche berechnete Tf-Konzentration erhalten.

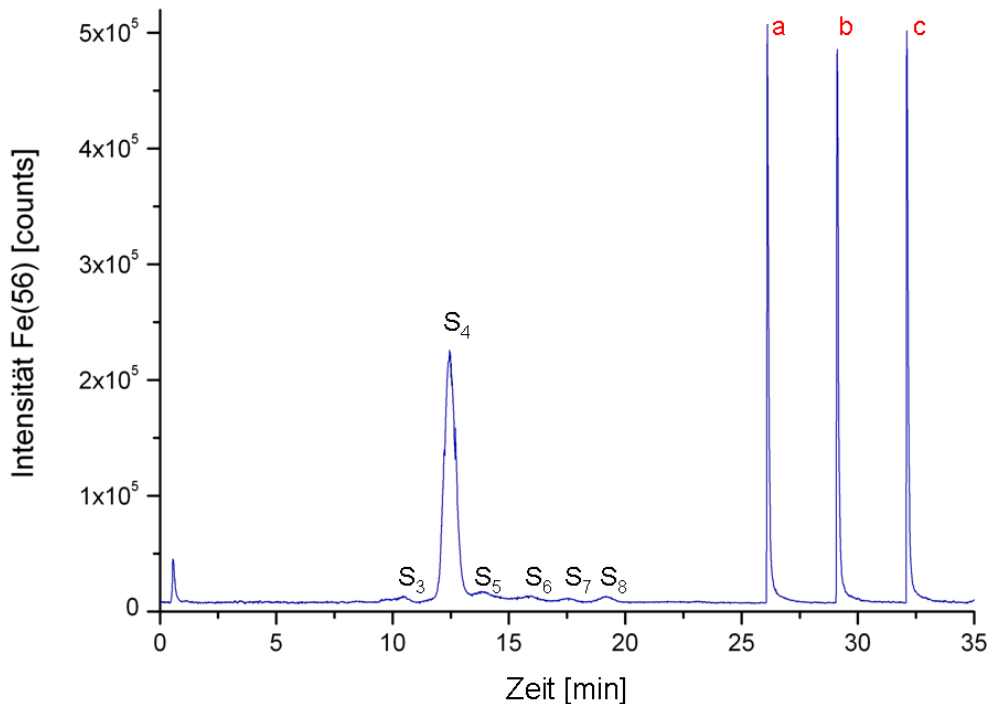
Die RSD der  $t_R$  für eine Dreifachmessung von Seehund-Tf-Glykoformen einer Serum-Probe von P.v. 4190 ist kleiner als 1,5 % und die RSD für die Peakflächen kleiner als 10 %.

Für das humane Referenzserum wurden RSDs von  $\leq 0,5$  % für die  $t_R$  und von  $< 5,6$  % für die Tf-Konzentration berechnet. Diese geringen Abweichungen demonstrieren ebenfalls das präzise Zusammenspiel der beiden verwendeten Pumpen, welches grundlegend für die Genauigkeit der Quantifizierung mit FIA unter Verwendung der Gradientenkompensation ist.

#### 4.3.5. Absolute Quantifizierung von Seehund-Tf und dessen Glykoformen mit FIA

Mit den optimierten chromatographischen Bedingungen war es möglich, in Abhängigkeit der Probe, innerhalb von 30 min bis zu neun Seehund Tf-Glykoformen aufzutrennen.

In Abbildung 45 ist ein typisches SAX-HPLC-ICP-MS Chromatogramm am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4116 dargestellt. Detektiert wurde das  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotop. Die einzelnen Glykoformen, hier  $S_3$  -  $S_8$ , wurden auf Grundlage einer FIA basierten Kalibrierung (a-c) quantifiziert.



**Abbildung 45:** Das SAX-HPLC-ICP-MS Chromatogramm einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4116, mit drei Flussinjektionen (a, b, c) von 1 mg/L Fe-Standard, detektiert wurde die Intensität des  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotops.

Dieses typische Glykoformen-Muster von Seehund-Tf ist dem Glykoformen-Muster menschlichen Tfs ähnlich (vgl. Abbildung 44). Das Muster wird von der höchst konzentrierten Glykoform  $S_4$  dominiert, welche von verschiedenen geringer konzentrierten Glykoformen unterschiedlicher Sialinierungsgrade flankiert ist.

Die Konzentration für Tf berechnet sich aus der ermittelten Gesamt-Fe-Konzentration, des Eisens, welches an die Summe der Tf-Glykoformen gebunden ist (*total iron binding capacity*, TIBC). Die TIBC für diese Probe (P.v. 4116, Serum) beträgt  $48,76 \pm 0,79 \mu\text{mol/L}$  und damit berechnet sich eine Tf-Konzentration von  $1,98 \pm 0,03 \text{ g/L}$ .

Für die Tiere P.v. 4190 und P.v. 4191 wurde eine Tf-Konzentration von  $2,78 \pm 0,05 \text{ g/L}$  bzw.  $2,42 \pm 0,08 \text{ g/L}$  quantifiziert. Die RSD der Dreifachmessungen liegen unter 3,4 % (siehe Tabelle 31). Die in Serum-Proben von Seehunden quantifizierten Tf-Konzentrationen sind in Tabelle 35 (Kapitel 4.5.2.) aufgeführt. Zum Vergleich der Methoden wurde die Nachweis- ( $S/N \geq 3$ ) und Bestimmungsgrenze ( $S/N \geq 10$ ) jeweils für die dominante Glykoform  $S_4$  einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4191 ermittelt. Für die FIA basierte absolute Quantifizierung

beträgt die Nachweisgrenze 55,21 mg/L Tf für das  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotop und die Bestimmungsgrenze 184,04 mg/L Tf ( $S_4$ , P.v. 4191).

#### 4.4. Isotopenverdünnungsanalytik

Um die Leistungsfähigkeit der entwickelten Methodik zu überprüfen, wurde mit der IDA ein weiteres präzises Verfahren zur Quantifizierung von Elementen und Elementspezies eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte über einen isotopisch angereicherten *post-column* Spike des Eisens mit bekannter Konzentration, Menge und Isotopenhäufigkeit. Das Isotopenverhältnis des Gemisches des natürlich vorkommenden Hauptisotops aus der Probe und des Isotops im Spike wurde jeweils mit ICP-MS bestimmt. Aus diesem gemessenen Isotopenverhältnis wurde dann die Konzentration an natürlich vorkommenden Eisens berechnet.

Eine Erweiterung der *post-column* IDA wurde mit der *double-spiking* IDA umgesetzt. Durch diese Methode konnten weitere diagnostisch relevante Parameter zum Eisenstatus, wie das Serum-Eisen, und die daraus folgende Tf-Sättigung mit einer einzigen Messung bestimmt werden.

##### 4.4.1. Charakterisierung der isotopisch angereicherten Eisen-Spikes

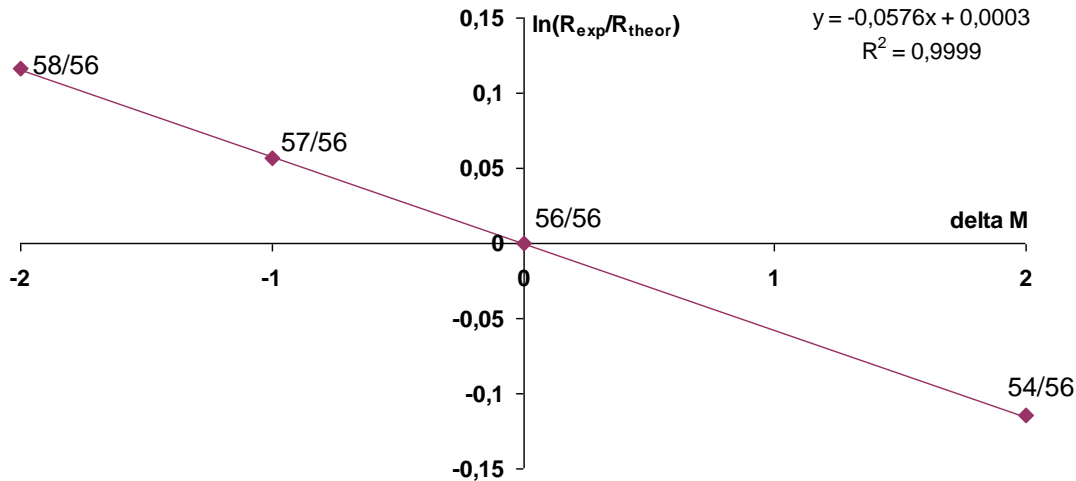
Die Grundlage der IDA ist die genaue Kenntnis der Konzentration und der Isotopenhäufigkeit der verwendeten Spikes. Dazu wurden die hergestellten Spikes, im Vergleich zu einem zertifizierten und auf ein standardisiertes Referenzmaterial von NIST rückführbaren Elementstandard, charakterisiert.

Die Stammlösung des für den *post-column* Spike verwendeten  $^{54}\text{Fe}$ -Spikes hatte eine Konzentration von 3355,315 mg/L mit den Isotopenhäufigkeiten 99,775 %  $^{54}\text{Fe}$  / 0,217 %  $^{56}\text{Fe}$  / 0,006 %  $^{57}\text{Fe}$  / 0,003 %  $^{58}\text{Fe}$ .

Die Stammlösung des  $^{57}\text{Fe}$ -Spikes, welcher für die Sättigung des Tfs bei der „erweiterten“ IDA verwendet wurde, hatte eine Konzentration von 4957,834 mg/L mit den Isotopenhäufigkeiten 0,020 %  $^{54}\text{Fe}$  / 3,647 %  $^{56}\text{Fe}$  / 95,568 %  $^{57}\text{Fe}$  / 0,766 %  $^{58}\text{Fe}$ .

Für die Massendiskriminierung wurden die Isotopenhäufigkeiten eines zertifizierten Fe-Standards, rückführbar auf ein SRM von NIST, mit ICP-MS bestimmt. Nach Gleichung 14 wurde das Verhältnis der theoretischen Isotopenhäufigkeiten ( $R_{\text{theor}}$ ) angegeben nach IUPAC, durch das Verhältnis der experimentell ermittelten Isotopenhäufigkeiten ( $R_{\text{exp}}$ ) dividiert und der natürliche Logarithmus dieses Wertes gegen die entsprechende Massendifferenz aufgetragen (Abbildung 44).

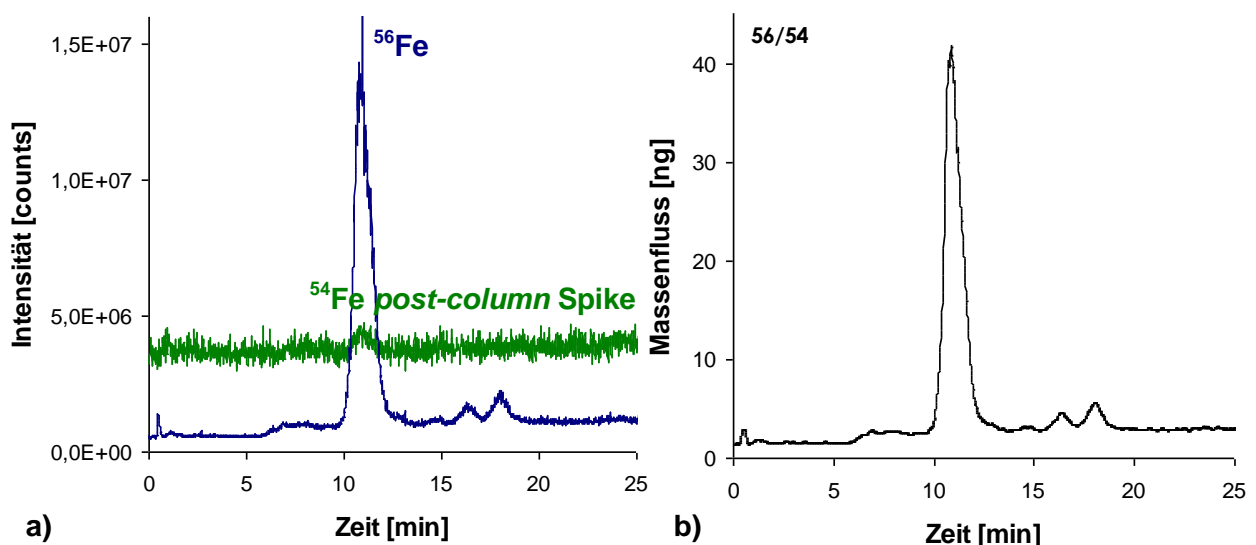
Aus den Werten für diese Geradengleichung wurde die Steigung der Geradengleichung errechnet. Diese Steigung ist der Faktor  $k$  der für die Korrektur der Massendiskriminierung verwendet wurde. In diesem Beispiel errechnet sich der Korrekturfaktor zu  $k = -0,057633348$ .



**Abbildung 46:** Ermittlung eines Korrekturfaktors für die Massendiskriminierung, der natürliche Logarithmus von  $R_{\text{exp}}/R_{\text{theor}}$  wurde gegen die Massendifferenz der Eisenisotope in Bezug auf das Hauptisotop mit der Masse 56 aufgetragen.

#### 4.4.2. Quantifizierung von Seehund-Tf und Tf-Glykoformen mit *post-column* IDA

Bei der absoluten Quantifizierung über einen isotopisch angereicherten *post-column* Spike wurde die Fe-Konzentration aus der Probe in Bezug auf einen nach der Chromatographie mit konstantem Fluss zudosierten isotopisch angereicherten Fe-Standards berechnet. Es wurde ein  $^{54}\text{Fe}$ -Spike zur *post-column* Quantifizierung verwendet. In Abbildung 47a ist das erhaltene Chromatogramm für eine Serum-Probe des Tieres P.v. 4191 dargestellt, in Grün ist die Intensität der Masse 54 und in Blau die Masse 56 aufgezeigt. In Abbildung 47b ist das aus dem Isotopenverhältnis von 56/54 resultierende Massenfluss-Chromatogramm gezeigt.



**Abbildung 47:** a) Chromatogramm einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4191 b) aus a) resultierendes Massenfluss-Chromatogramm für das Isotopenverhältnis von 56/54

Zu den Massen beider gemessener Eisen-Isotope ( $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ) trägt zu einem gewissen Anteil sowohl die Probe als auch der Spike bei. Die Zusammensetzung der einzelnen Massen lässt sich über die durch die Spike-Charakterisierung bekannten Stoffmengenanteile und dem ebenfalls bekannten Stoffmengenanteil des natürlichen Eisens ihrem Ursprung zuordnen. Aus dem gemessenen Isotopenverhältnis von 56/54 wurde mit Gleichung 1 das Massenfluss-Chromatogramm berechnet. Durch Integration der Peakflächen erhält man direkt die Masse an Fe. Mit Gleichung 29 wurde daraus die Tf-Konzentration berechnet.

Bei der *post-column* IDA Quantifizierung beträgt die Nachweisgrenze ( $S/N \geq 3$ ) 100,63 mg/L Tf für das  $^{56}\text{Fe}$ -Hauptisotop und die Bestimmungsgrenze ( $S/N \geq 10$ ) 335,42 mg/L Tf für die dominante Glykoform  $S_4$  einer Serum-Probe des Tieres P.v. 4191.

#### 4.4.3. Vergleich der Tf-Quantifizierung mit FIA und *post-column* IDA

Die absolute Quantifizierung von Seehund-Tf durch FIA sowie *post-column* IDA lieferte in beiden Fällen präzise und akkurate quantitative Ergebnisse bezüglich der im Serum enthaltenen Tf-Konzentrationen. Die ermittelten Tf-Konzentrationen durch die FIA (Kapitel 4.3.5.) und die *post-column* IDA (Kapitel 4.4.2.) sind in Tabelle 31 für zwei Seehunde im Vergleich aufgeführt.

**Tabelle 31:** Tf-Konzentration zweier Seehunde quantifiziert mit FIA und *post-column* IDA

	FIA			IDA			Differenz
	Tf [g/L]	SD [g/L]	RSD [%]	Tf [g/L]	SD [g/L]	RSD [%]	Tf [g/L]
P.v. 4190	2,78	0,05	1,80	2,87	0,05	1,84	0,09
P.v. 4191	2,42	0,08	3,31	2,50	0,01	0,44	0,08

Die Quantifizierung mit *post-column* IDA erbrachte vergleichbare Tf-Konzentrationen in Serum-Proben von Seehunden wie die absolute Quantifizierung mit FIA. Die Differenz der jeweils quantifizierten Tf-Konzentrationen ist in beiden Fällen geringer als die Summe der Standardabweichungen. Bei beiden quantifizierten Serum-Proben ist die Differenz geringer als 0,10 g/L.

Beide verwendeten Methoden erlauben die genaue und präzise Quantifizierung von Seehund-Tf über die elementspezifische Detektion des gebundenen Eisens. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die FIA basierte Quantifizierung liegt um etwa die Hälfte niedriger als die für die *post-column* IDA Quantifizierung. Die schlechteren Nachweis- und Bestimmungsgrenze der *post-column* IDA Methode sind vermutlich besonders auf den unruhigeren Laufmittelfluss durch den Eintrag des *post-column* Spikes mittels der peristaltischen Pumpe zurückzuführen. Durch Erzeugung eines stabileren *post-column* Spikes können besser Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht werden.

Bei der FIA wird ein einfacher zertifizierter und auf NIST rückführbarer Elementstandard zur Quantifizierung verwendet. Ist das Volumen der verwendeten Probenschleife einmal bestimmt, kann mit diesem Wert so lange gearbeitet werden, wie der instrumentelle Aufbau aus Probenschleife und externem Ventil nicht verändert wird. Es sind keine aufwendigen wiederkehrenden Kalibrierungen durchzuführen. Ein weiterer Vorteil der FIA ist, dass diese Quantifizierungsmethode auch für monoisotopische Elemente eingesetzt werden kann.

Einziger Nachteil der Methode ist der komplexere instrumentelle Aufbau, welcher die Verwendung einer zweiten HPLC-Pumpe notwendig macht. Die Steuerung dieser zweiten Pumpe ist bei der verwendeten Agilent Pumpe mit der entsprechenden ChemStation Software jedoch unproblematisch. Der Verdünnungseffekt, bedingt durch den gegenläufigen Gradienten mit einem Fluss von 0,75 mL/min kann durch Reduzierung des verwendeten Säulendurchmessers in den Bereich der Kapillar-LC (ID 0,3 mm) bei gleichzeitiger Verwendung eines Mikrozerstäubers (*total consumption nebuliser*) entgegengewirkt werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten PFA Mikrozerstäubers (100 µL) sind etwa 90 % des Aerosols für die Detektion verloren, da es aufgrund der Tröpfchengröße direkt an der Sprühkammer als Kondensat abgeschieden wird. Dieses Kondensat wird aus der Sprühkammer abgepumpt, so dass nur weniger als 10 % des generierten Aerosols ins Plasma gelangen.

Der Vorteile der *post-column* IDA besteht darin, dass hier der Analyt nicht durch einen gegenläufigen Gradient mit hoher Flussrate verdünnt wird. Es wird lediglich ein *post-column* Fluss von 0,1 mL/min zudosiert. Die erwarteten besseren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen konnten aus dem oben vermuteten Grund nicht bestätigt werden. Die Bestimmungsgrenze ist im Vergleich zur FIA höher, so dass die Quantifizierung der geringer konzentrierten Tf-Glykoformen unsicherer durchzuführen ist.

Ein Nachteil sind die zeitaufwendigen täglichen Messungen, die notwendig sind, um eine akkurate Quantifizierung zu ermöglichen. Die Charakterisierung des Spikes muss zeitnah zur eigentlichen Messung erfolgen. Ebenso ist die Ermittlung des Korrekturfaktors für die Massendiskriminierung und die Bestimmung des aktuellen Spike-Flusses täglich erforderlich. Durch diese wiederkehrenden Messungen mit ihren sich anschließenden komplexen Berechnungen ist die *post-column* IDA insgesamt eine deutlich zeitaufwendigere Methode als die Tf-Quantifizierung mit FIA.

#### 4.4.4. Absolute Quantifizierung von Tf mit *double-spiking* IDA

Bei der „erweiterten“ *post-column* IDA oder *double-spiking* IDA wurden zwei isotopisch angereicherte Spikes verwendet. Der  $^{54}\text{Fe}$ -Spike wurde wie zuvor als *post-column* Spike zur Quantifizierung genutzt. Der zweite Spike, der  $^{57}\text{Fe}$ -Spike, wurde zur Sättigung des



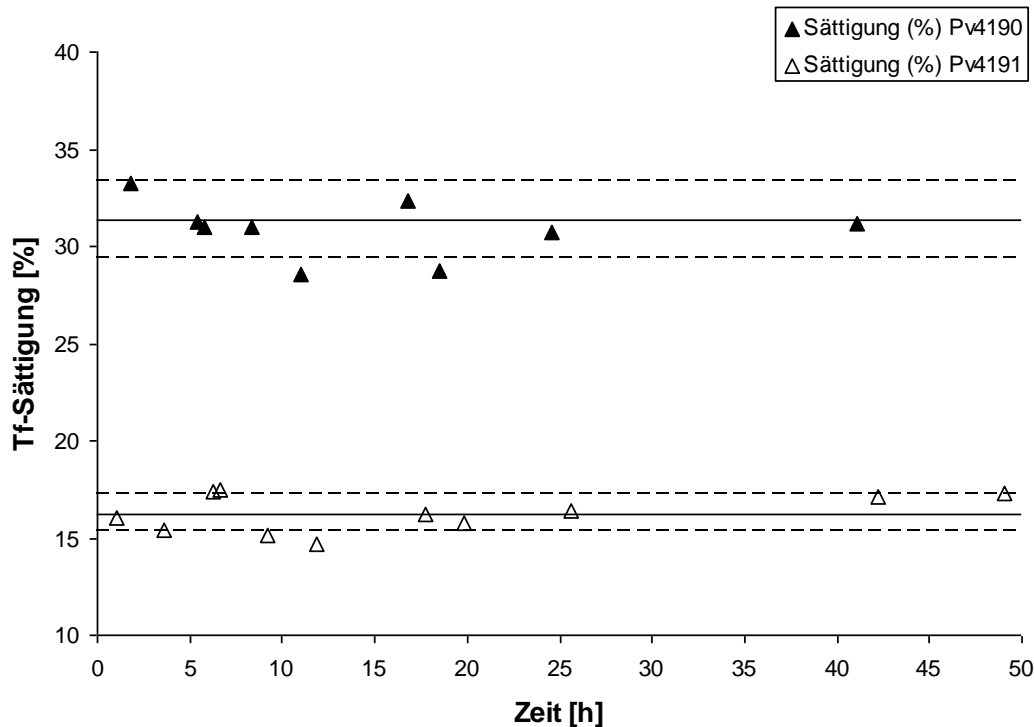
Seehund-Tfs eingesetzt. Durch diesen zweiten Spike oder *Tracer* war es möglich, zwischen dem natürlichen endogenen Fe, welches bereits an Tf gebunden war, und dem durch die Sättigung zugeführten exogenen Eisen zu unterscheiden.

Der Vorteil einer direkten Messung der Tf-Sättigung mit der *double-spiking* IDA liegt unter anderem darin dass die Hämolyse der Blutprobe keine Auswirkungen hat. Bei Routinemessungen, wie sie normalerweise in klinischen Labors zur Bestimmung der Tf-Sättigung gemacht werden, sind die Konzentrationsbestimmung des Gesamt-Tfs im Serum und die Bestimmung des Eisengehalts des Serums notwendig. Aus diesen beiden Werten wird die Tf-Sättigung errechnet. Der Eisengehalt wird durch die Tf-Konzentration dividiert und so errechnet sich die Tf-Sättigung, da per Definition das Eisen im Serum komplett an Tf gebunden ist. Liegt aber nun Fe in Form von Hämoglobin in hämolytischen Seren vor, wird das Ergebnis der Bestimmung der Tf-Sättigung verfälscht, denn es wird eine zu hohe Sättigung berechnet.

#### **4.4.4.1. Evaluierung der Sättigung von Seehund-Transferrin mit isotopisch angereichertem Eisen**

Bei der Sättigung von Tf mit Eisen entsteht ein sehr stabiler Fe-Tf-Komplex, in dem die zwei Fe-Ionen durch vier Aminosäure-Reste und dem kooperativ gebundenen  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ion komplexiert sind (MacGillivray *et al.* 1998). Ob ein möglicher Isotopenaustausch nach der Sättigung mit  $^{57}\text{Fe}$  erfolgt, muss für jedes spezielle System getestet werden. Würde ein Austausch bei dem mit  $^{57}\text{Fe}$ -gesättigten Tf stattfinden, würde die Bestimmung der natürlichen Sättigung beeinflusst werden.

Für die Sättigung von Seehund-Tf mit dem  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop wurde kein Isotopenaustausch festgestellt, der Tf-Fe-Komplex ist über einen Zeitraum von mehr als 48 h stabil. Es ist daher problemlos möglich auch längere Messreihen mit den entwickelten Verfahren durchzuführen. Zur Überprüfung der Stabilität des Fe-Tf-Komplexes wurden die Proben von zwei Tieren mit  $^{57}\text{Fe}$  gesättigt und über den Zeitraum von etwa zwei Tagen wiederholt vermessen. In Abbildung 48 ist die Zeitreihe für die Tf-Sättigung von Serum-Proben der Tiere P.v. 4190 und P.v. 4191 aufgetragen. Der Mittelwert der Wiederholungsmessungen ist als Linie dargestellt. Die gestrichelten Linien sind der Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung. Zusätzlich sind die Zeitreihen der Tf-Konzentration und des CDT-Levels zu diesem Experiment in Anhang (Abbildung A4) beigefügt.



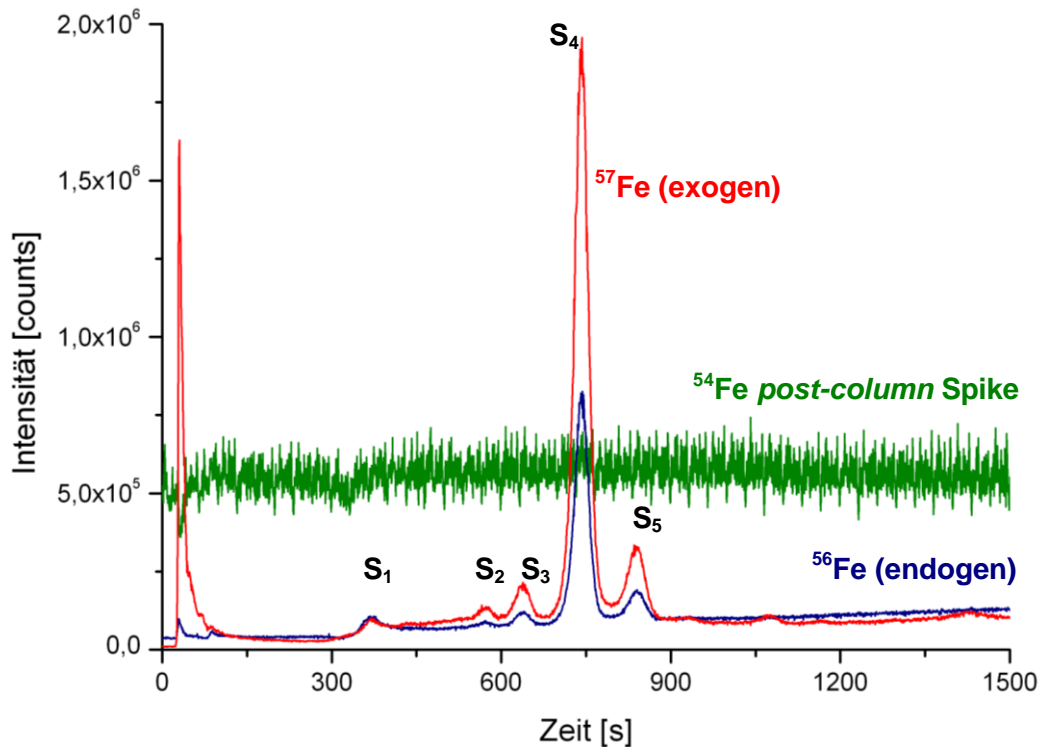
**Abbildung 48:** Tf-Sättigung für Serum-Proben der Tiere P.v. 4190 und P.v. 4191 über einen Zeitraum von etwa zwei Tagen mit wiederholten IDA-Messungen

Die gemessene Sättigung des  $^{57}\text{Fe}$ -gesättigten Seehund-Tfs blieb über einen Zeitraum von mehr als 48 h, mit leichten Schwankungen um den Mittelwert herum, konstant. Dies wurde als Beweis gewertet, dass kein Isotopenaustausch innerhalb des untersuchten Zeitraums zwischen dem endogen vorhandenen  $\text{Fe}_{\text{nat}}$  und dem exogenen  $^{57}\text{Fe}$  stattfindet und dies trotz eines Überschusses an  $^{57}\text{Fe}$  in der Probe, welches für die Sättigung zugegeben wurde.

Die gemessene Tf-Konzentration blieb wie erwartet auch über den gesamten Zeitraum, mit Schwankungen um den Mittelwert herum, konstant. Auffällig ist nur der CDT-Level bei der Serum-Probe des Tieres P.v. 4190 mit einem erhöhten CDT-Level, welches sich über die Zeit verändert. Bei den ersten drei Messungen innerhalb der ersten fünf Stunden liegt das CDT-Level unter 10 %, wohingegen ab etwa sechs Stunden nach der Probenvorbereitung die Werte um 15 % schwanken. Daher ist es für die Bewertung der CDT-Konzentration notwendig, die Proben möglichst gleich nach der Aufarbeitung zu analysieren. Dieser Befund könnte ein Hinweis sein, dass der CDT-Level nicht nur auf die fehlerhafte Synthese des Glykoproteins Tf begründet ist, sondern durch eine erhöhte Aktivität deglykolisierender Enzyme, wie Neuraminidase. Die Sättigung von Seehund-Tf mit isotopisch angereicherter Eisen war sehr beständig, es erfolgte kein Isotopenaustausch im beobachteten Zeitfenster von 48h.

#### 4.4.4.2. Präzision der absoluten Tf-Quantifizierung mit *double-spiking* IDA

Die Präzision der *double-spiking* IDA für die Tf-Quantifizierung wurde ebenfalls mit dem zertifizierten humanen Referenzserum ERM-DA470k/IFCC überprüft. In Abbildung 49 ist ein Chromatogramm des Referenzserums dargestellt.



**Abbildung 49:** Chromatogramm für das zertifizierte humane Referenzserum ERM-DA470k/IFCC mit *double-spiking* IDA

In Grün ist die Intensität der Masse 54 aufgetragen, die sich hauptsächlich aus dem  $^{54}\text{Fe}$  *post-column* Spike zusammensetzt. In Blau ist die Intensität des  $^{56}\text{Fe}$ , welches hauptsächlich aus dem natürlichen, bereits vor der Sättigung vorhandenen Eisen herrührt, dargestellt. Die roten Peaks sind auf das  $^{57}\text{Fe}$  zurückzuführen, welches zur Tf-Sättigung verwendet wurde.

Aus den Intensitäten der einzelnen Eisenisotope wurde mit Gleichung 30 und 31 das Massenfluss-Chromatogramm für das  $^{56}\text{Fe}$  und das  $^{57}\text{Fe}$  berechnet. Die Zuordnung des Einzelbeitrags der verschiedenen Spikes zu den gemessenen Intensitäten der einzelnen Isotope wurde durch Verwendung zweier Spikes komplexer. Die Stoffmengenanteile der einzelnen Spikes wurden über die IPD mit der Matrix aus Gleichung 10 erhalten.

Wie bei der *post-column* IDA wurde durch Integration der Peakflächen aus dem so berechneten Massenfluss-Chromatogramm die jeweilige Fe-Masse erhalten, aus der mit Gleichung 29 die Konzentration für Tf berechnet wurde. Aus der Summe der Glykoformen des humanen Tfs für  $^{56}\text{Fe}$  und  $^{57}\text{Fe}$  wurde die Tf-Konzentration berechnet. Die Quantifizierung des Tfs erfolgte in einer Dreifachbestimmung. In Tabelle 32 sind die Konzentrationen für die drei Messungen mit Mittelwert und Standardabweichung aufgeführt.

Im Vergleich zu den experimentell bestimmten Tf-Konzentrationen ist auch die zertifizierte Konzentration für das Tf des verwendeten humanen Referenzmaterials angegeben.

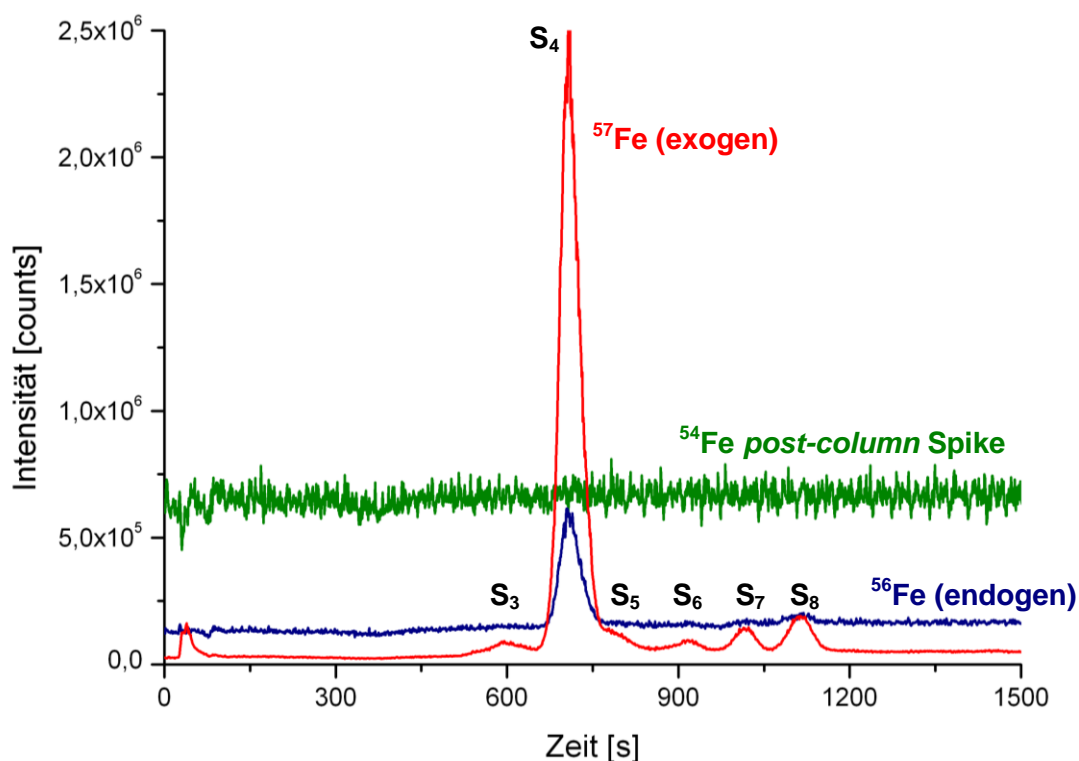
**Tabelle 32:** Mit *double-spiking* IDA quantifizierte Tf-Konzentration des zertifizierten humanen Referenzserums ERM-DA470k/IFCC und die entsprechende zertifizierte Konzentrationsangabe.

n=3	Tf [g/L]	
	gemessen (IDA)	zertifiziert
	2,36	
	2,31	
	2,37	
<b>Mittelwert</b>	<b>2,35</b>	<b>2,36</b>
SD	0,03	<b>0,08</b>
RSD [%]	1,34	

Die experimentell ermittelte Tf-Konzentration als Summe der Konzentrationen aller Tf-Glykoformen beträgt  $2,35 \pm 0,03$  g/L. Dieser quantifizierte Wert weist im Rahmen der Messungenauigkeit eine sehr gute Übereinstimmung zu dem zertifizierten Wert von  $2,36 \pm 0,08$  g/L auf.

#### 4.4.5. Absolute Quantifizierung von Seehund-Tf mit *double-spiking* IDA

Das Seehund-Tf wurde ebenfalls mit  $^{57}\text{Fe}$  gesättigt und mit *double-spiking* IDA quantifiziert. Aus dieser einen erfolgten Messung können neben der Konzentration für die einzelnen Tf-Glykoformen, weitere diagnostisch relevante Parameter, wie der Gehalt an Serum-Eisen und die Tf-Sättigung bestimmt werden. In Abbildung 50 ist als Beispiel ein Chromatogramm des Tieres P.v. 4191 dargestellt.



**Abbildung 50:** Chromatogramm für eine Serum-Probe des Tieres P.v. 4191 mit *double-spiking* IDA

In Grün ist die Intensität der Masse 54 aufgetragen, die sich hauptsächlich aus dem  $^{54}\text{Fe}$  *post-column* Spike zusammensetzt. In Blau ist die Intensität des  $^{56}\text{Fe}$ , welches überwiegend aus dem natürlicherweise vorhandenen, bereits an das Tf gebundenen Eisen herrührt, dargestellt. Die roten Peaks sind auf das  $^{57}\text{Fe}$  zurückzuführen, welches zur Tf-Sättigung verwendet wurde. Aus der durch Integration des Massenfluss-Chromatogramms bestimmten  $^{56}\text{Fe}$ -Masse wurde die Konzentration an Serum-Eisen, also dem natürlich vorkommenden endogenen Fe, berechnet. Die Masse an  $^{57}\text{Fe}$ , dem bei der Sättigung zugefügten exogenen Eisen, liefert die Konzentration an Eisen, welches das Tf zusätzlich zu binden in der Lage ist (*unsaturated iron binding capacity*, UIBC). Die Summe dieser beiden Konzentrationen ( $^{56}\text{Fe} + ^{57}\text{Fe}$ ) ist die Gesamtkapazität der Eisenbindung des vorhandenen Tfs (*total iron binding capacity*, TIBC), aus der über die Beziehung aus Gleichung 21 die Tf-Konzentration berechnet wurde. Die Tf-Sättigung ist das Verhältnis des endogenen  $^{56}\text{Fe}$  zu der TIBC. Die berechneten Parameter als Mittelwert der entsprechenden Dreifachbestimmung sind für 15 untersuchte Seehunde und das humane Referenzserum in Tabelle 33 aufgeführt.

**Tabelle 33:** Zusammenstellung der erhaltenen Informationen aus den *double-spiking* IDA-Messungen, Serum-Eisen, *unsaturated iron binding capacity* (UIBC), *total iron binding capacity* (TIBC), Tf-Konzentration und Tf-Sättigung für das humane Referenzserum und Seehund-Serumproben. Die getöteten Tiere sind mit einem \* gekennzeichnet.

Probe	Serum-Eisen [ $\mu\text{mol/L}$ ]	UIBC [ $\mu\text{mol/L}$ ]	TIBC [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Tf [g/L]	Tf-Sättigung [%]
Tiernummer	$^{56}\text{Fe}$ (endogen)	$^{57}\text{Fe}$ (exogen)	$^{56}\text{Fe} + ^{57}\text{Fe}$		$^{56}\text{Fe}/\text{TIBC} \cdot 100$
ERM-DA470k	14,05	43,82	57,88	2,35	24,28
P.v. 4112	14,57	28,62	43,19	1,75	33,74
P.v. 4115	11,60	31,13	42,73	1,73	27,14
P.v. 4116	21,08	28,50	49,57	2,01	42,52
P.v. 4117	26,96	38,15	65,11	2,64	41,41
P.v. 4118	20,12	37,84	57,96	2,35	34,71
W01/08Pv	22,51	25,41	47,92	1,94	46,97
W02/08Pv	26,78	134,28	161,06	6,53	16,63
W03/08Pv	15,74	27,25	42,99	1,74	36,58
W04/08Pv	18,88	76,19	95,07	3,86	19,92
W05/08Pv	20,90	37,57	58,46	2,37	35,74
P.v. 4144*	16,56	112,94	129,50	5,25	12,79
P.v. 4145*	18,56	40,78	59,34	2,41	31,28
P.v. 4190*	22,50	45,21	67,72	2,75	33,25
P.v. 4191*	9,30	47,87	57,17	2,32	16,28
P.v. 4195*	10,22	52,49	62,71	2,54	16,30

Die Nachweis- ( $S/N \geq 3$ ) und Bestimmungsgrenze ( $S/N \geq 10$ ) für die Quantifizierung mittels *double-spiking* IDA beträgt 88,61 mg/L Tf bzw. 295,36 mg/L Tf für das  $^{56}\text{Fe}$ -Isotop und 17,16 mg/L Tf bzw. 57,21 mg/L Tf für das  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop ( $S_4$ -Glykoform, P.v. 4191). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind für das  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop um mehr als das 5fache geringer als für das in natürlichem Eisen zu 91,75 % vertretene Hauptisotop. Da  $^{57}\text{Fe}$

natürlicherweise nur zu 2,119 % vorkommt, ist der Untergrund auf dieser Masse deutlich geringer wodurch diese bessere Nachweisgrenze erreicht werden kann.

Durch die hohe Komplexbildungskonstante von etwa  $10^{20} \text{ M}^{-1}$  für den Fe-Tf-Komplex ist das gesamte Fe im Serum an Tf gebunden (del Castillo Busto *et al.* 2009b). Aus dem natürlich an Tf gebundenen endogenen  $^{56}\text{Fe}$  wurde die Konzentration an Serum-Eisen berechnet. Für humanes Serum liegt die Konzentration von Serum-Eisen für gesunde Individuen bei etwa  $0,9 \mu\text{g/mL}$  ( $16,1 \mu\text{mol/L}$ ) und die Tf-Sättigung bei 25 - 30 % (del Castillo Busto *et al.* 2006; De Domenico *et al.* 2008; del Castillo Busto *et al.* 2009b; 2010).

Bei der Quantifizierung des zertifizierten humanen Referenzserums wurde eine Serum-Eisen Konzentration von  $14,05 \mu\text{mol/L}$  und eine Tf-Sättigung von 24,28 % ermittelt. Allerdings ist das Referenzserum nur für die Gesamt-Tf-Konzentration zertifiziert. Die ermittelten Werte für Serum-Eisen und Tf-Sättigung liegen geringfügig unterhalb des in der Literatur genannten Mittelwerts, jedoch im Rahmen der breiten Streuung der Messwerte einzelner Individuen bei der Analyse von biologischen Proben.

#### 4.4.6. Vergleich der beiden Quantifizierungsmethoden für Seehund-Tf

Die Tf-Konzentrationen der 15 Tiere, welche mit der *double-spiking* IDA quantifiziert wurden (Tabelle 33), sind zuvor ebenfalls mit der FIA quantifiziert worden (Tabelle 34, 38, 40). Beide Methoden lieferten präzise und akkurate Tf-Konzentrationen, allerdings gab es eine große Abweichung bei den Serum-Proben der Tiere mit erhöhtem CDT-Level. In Tabelle 34 sind die Tf- und CDT-Konzentrationen sowie die Konzentration der dominanten Tf-Glykoform  $\text{S}_4$  mit den jeweiligen SD für beide Methoden aufgeführt. Für die *double-spiking* IDA sind zusätzliche Informationen zur Sättigung von Tf und  $\text{S}_4$  beigefügt.

**Tabelle 34:** Vergleich der FIA und *double-spiking* IDA anhand von Tf-, CDT- und  $\text{S}_4$ -Konzentration, Differenzen der Tf- und CDT-Konzentrationen  $\geq 0,3 \text{ g/L}$  sind in roter Schrift hervorgehoben

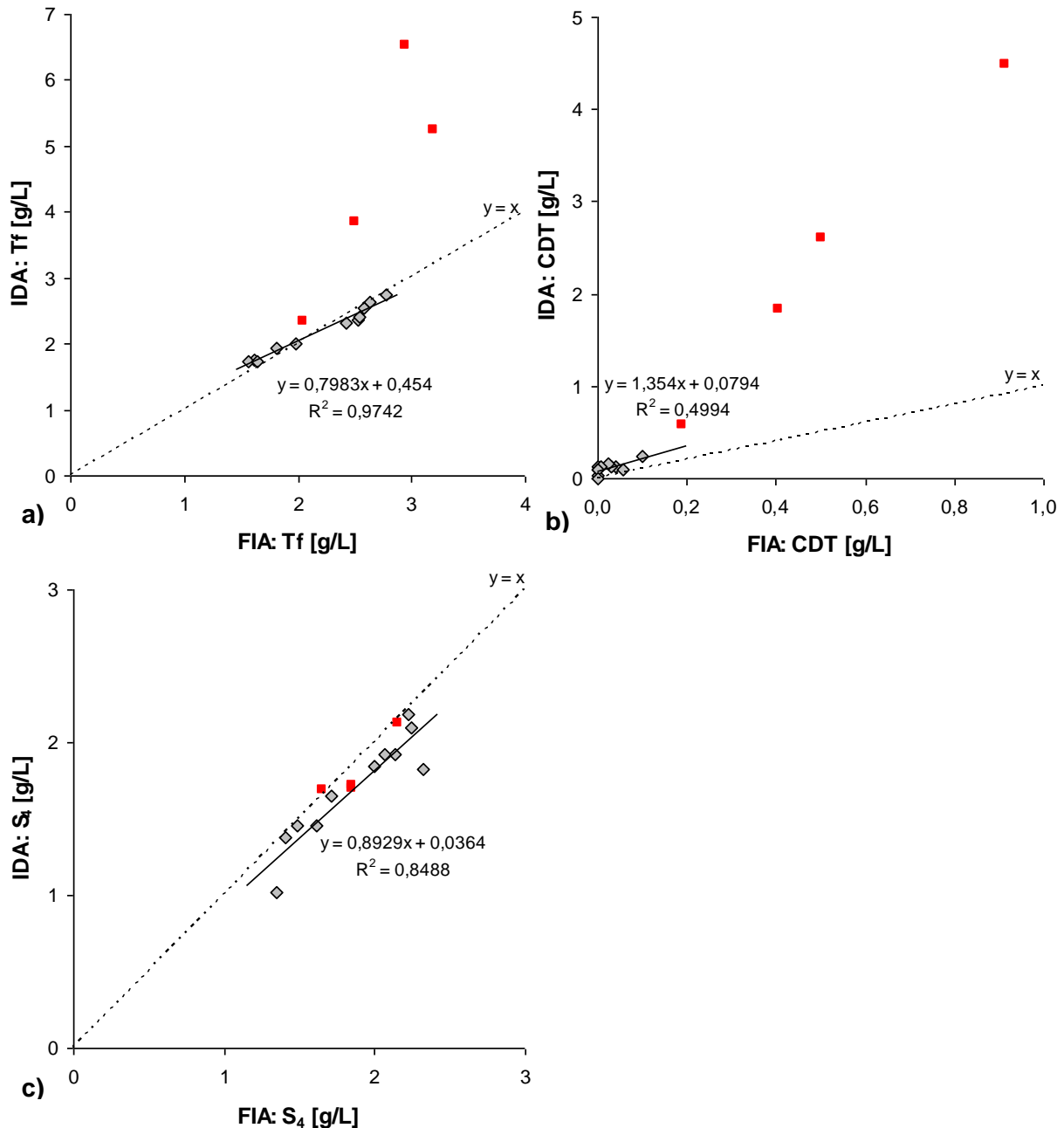
Probe	IDA								
	Tf [g/L]	$\text{SD}_{\text{Tf}}$ [g/L]	Tf-Sät.	CDT [g/L]	$\text{SD}_{\text{CDT}}$ [g/L]	CDT [%]	$\text{S}_4$ [g/L]	$\text{SD}_{\text{S}_4}$ [g/L]	$\text{S}_4$ -Sät. [%]
P.v. 4112	1,75	0,02	33,74	<b>0,12</b>	0,01	7,06	<b>1,38</b>	0,02	35,61
P.v. 4115	1,73	0,01	27,14	<b>0,09</b>	0,01	5,37	<b>1,02</b>	0,12	27,28
P.v. 4116	2,01	0,02	42,52	<b>0,13</b>	0,01	6,26	<b>1,65</b>	0,00	44,81
P.v. 4117	2,64	0,13	41,41	<b>0,13</b>	0,01	4,94	<b>1,83</b>	0,03	42,95
P.v. 4118	2,35	-	34,71	<b>0,58</b>	-	<b>24,57</b>	<b>1,69</b>	-	50,78
W01/08Pv	1,94	0,02	46,97	<b>0,16</b>	0,01	7,99	<b>1,45</b>	0,01	49,13
W02/08Pv	6,53	0,07	16,63	<b>4,49</b>	0,08	<b>68,68</b>	<b>1,72</b>	0,02	45,05
W03/08Pv	1,74	0,12	36,58	<b>0,13</b>	0,04	7,16	<b>1,45</b>	0,03	38,16
W04/08Pv	3,86	0,14	19,92	<b>1,83</b>	0,18	<b>47,47</b>	<b>1,70</b>	0,02	30,43
W05/08Pv	2,37	0,03	35,74	<b>0,09</b>	0,03	3,74	<b>1,92</b>	0,01	36,96
P.v. 4144*	5,25	0,08	12,79	<b>2,61</b>	0,03	<b>49,69</b>	<b>2,13</b>	0,04	18,70
P.v. 4145*	2,41	0,03	31,28	<b>0,04</b>	0,01	1,59	<b>1,92</b>	0,05	29,37
P.v. 4190*	2,75	0,07	33,25	<b>0,24</b>	0,05	8,68	<b>2,10</b>	0,01	33,56
P.v. 4191*	2,32	0,03	16,28	<b>0,10</b>	0,01	4,18	<b>1,84</b>	0,03	11,19
P.v. 4195*	2,54	0,04	16,30	<b>0,00</b>	0,00	0,00	<b>2,19</b>	0,03	15,46

**Tabelle 34 (Fortsetzung):** Vergleich der FIA und *double-spiking* IDA anhand von Tf-, CDT- und S<sub>4</sub>-Konzentration, Differenzen der Tf- und CDT-Konzentrationen  $\geq 0,3$  g/L sind in roter Schrift hervorgehoben

Probe	FIA							Differenz(IDA-FIA)		
	Tf [g/L]	SD <sub>Tf</sub> [g/L]	CDT [g/L]	SD <sub>CDT</sub> [g/L]	CDT [%]	S <sub>4</sub> [g/L]	SD <sub>S<sub>4</sub></sub> [g/L]	Tf [g/L]	CDT [g/L]	S <sub>4</sub> [g/L]
P.v. 4112	1,62	0,01	<b>0,00</b>	0,00	0,00	1,41	0,03	0,13	0,12	0,03
P.v. 4115	1,56	0,04	<b>0,00</b>	0,00	0,00	1,35	0,07	0,17	0,09	0,33
P.v. 4116	1,98	0,03	<b>0,04</b>	0,03	1,96	1,71	0,02	0,03	0,09	0,06
P.v. 4117	2,63	0,11	<b>0,03</b>	0,01	1,14	2,32	0,11	0,01	0,10	0,49
P.v. 4118	2,05	0,07	<b>0,19</b>	0,03	<b>9,27</b>	1,65	0,05	0,30	0,39	0,04
W01/08Pv	1,81	0,09	<b>0,02</b>	0,02	1,31	1,61	0,04	0,13	0,13	0,16
W02/08Pv	2,94	0,09	<b>0,91</b>	0,13	<b>31,06</b>	1,85	0,04	3,59	3,57	0,13
W03/08Pv	1,65	0,07	<b>0,01</b>	0,01	0,37	1,49	0,03	0,10	0,12	0,04
W04/08Pv	2,50	0,01	<b>0,40</b>	0,03	<b>16,15</b>	1,85	0,02	1,35	1,43	0,15
W05/08Pv	2,52	0,08	<b>0,06</b>	0,02	2,23	2,13	0,01	0,15	0,03	0,21
P.v. 4144*	3,19	0,09	<b>0,50</b>	0,07	<b>15,67</b>	2,15	0,04	2,06	2,11	0,02
P.v. 4145*	2,54	0,06	<b>0,00</b>	0,00	0,00	2,07	0,03	0,13	0,04	0,15
P.v. 4190*	2,78	0,05	<b>0,10</b>	0,01	3,60	2,24	0,05	0,03	0,14	0,14
P.v. 4191*	2,42	0,08	<b>0,00</b>	0,00	0,00	2,00	0,04	0,10	0,10	0,16
P.v. 4195*	2,58	0,09	<b>0,00</b>	0,00	0,00	2,22	0,07	0,04	0,00	0,03

Für die Tiere P.v. 4118, W02/08Pv, W04/08Pv und P.v. 4144 wurden deutliche Differenzen für die Tf-Konzentrationen zwischen beiden Quantifizierungsmethoden bestimmt. Auffällig ist, dass diese vier Tiere ein erhöhtes CDT-Level (FIA: 9,3 % / 31,1 % / 16,2 % / 15,7 %) aufwiesen. Die Differenz der Tf-Konzentration betrug 0,3 - 3,6 g/L. Dieser Unterschied besteht gänzlich aus dem Abstand der CDT-Konzentrationen beider Methoden, wohingegen die Konzentration der dominanten Tf-Glykoform S<sub>4</sub> bei diesen Tieren für beide Quantifizierungsmethoden nahezu gleich ist (siehe Abbildung 51). Daher ist es ausgeschlossen, dass die CDT-Glykoformen durch die Abspaltung der endständigen Sialinsäurereste aus den höher sialinierten Glykoformen entstanden sind, denn dann wäre gleichzeitig die Konzentration der S<sub>4</sub> bei diesen Proben vermindert.

Die Proben der Tiere P.v. 4115 und P.v. 4117 weisen Differenzen in der Konzentration der S<sub>4</sub>-Glykoformen auf, diese beruhen auf der nicht vollständigen Trennung von S<sub>4</sub> und S<sub>5</sub> und der damit verbundenen schwierigen Abgrenzung der einzelnen Glykoformen-Peaks bei der manuellen Integration. Die Abweichung der Gesamt-Tf-Konzentration dieser beiden Tiere lag unter 0,2 g/L.



**Abbildung 51:** Korrelation der a) Tf-, b) CDT- und c) S<sub>4</sub>-Konzentrationen aus Serum-Proben von 15 Seehunden quantifiziert mit der FIA und IDA im Vergleich. Die gestrichelte Gerade stellt die Diagonale  $y = x$  dar. Die grauen Rauten sind die Tiere mit normalem Tf-Glykoformen-Muster und die roten Quadrate die Tiere mit erhöhtem CDT-Level. Die Regressionsgerade für die Tiere mit normalem Tf-Glykoformen-Muster wurde berechnet (durchgezogene Linie) und die Gleichung mit Bestimmtheitsmaß  $R^2$  in der Grafik dargestellt

Für 11 der insgesamt 15 Proben, in denen die Konzentration der Tf-Glykoformen mit beiden Methoden bestimmt wurde, sind die quantifizierten Tf-Glykoformen im Rahmen der Messungengenauigkeit bis auf kleine Abweichungen identisch. Über den Ursprung der Abweichungen der vier Proben mit erhöhtem CDT-Level wurden verschiedene Ursachen vermutet, welche im Folgenden widerlegt werden.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der Unterschiede wäre die verschiedene Affinität der CDT-Glykoformen zu dem <sup>57</sup>Fe-Isotop, welches für die Sättigung bei der *double-spiking* IDA



verwendet wurde. Eine geringfügig verschiedene Affinität von biologischen Systemen für die einzelnen Fe-Isotope ist zwar bekannt (Walczyk und von Blanckenburg 2002), jedoch würde diese nicht einen solch großen Unterschied in der Bevorzugung des  $^{57}\text{Fe}$ -Isotops gegenüber dem  $^{56}\text{Fe}$ -Isotop durch die CDT-Glykoformen erklären. Des Weiteren wurde dargestellt, dass die Anzahl der Sialinsäurereste der N-Glykane von Tf nahezu keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von Fe haben (Hamano Nagaoka und Maitani 2009), also die Komplexbildungskonstante für die einzelnen Glykoformen nicht derart variiert, dass sich dieser deutliche Unterschied in der Sättigung der CDT-Glykoformen mit  $^{57}\text{Fe}$  erklären würde. Eine vergleichende Studie zweier unterschiedlicher IDA-Methoden wurde von del Castillo Busto *et al.* (2006) durchgeführt. Für die einzelnen Tf-Sialoformen aus vier humanen Serum-Proben wurde die *post-column* IDA (vgl. Kapitel 3.6.1. und Kapitel 4.4.2.) mit einer spezies-spezifischen IDA verglichen. Bei der spezies-spezifischen IDA wurde ein  $^{57}\text{Fe}$  gesättigter humaner Tf-Standard hergestellt und zur Quantifizierung herangezogen. Zwischen den Konzentrationen für diese vier Proben und diese von del Castillo Busto *et al.* verwendeten Methoden wurden keine Differenzen ermittelt. Allerdings wurde der Vergleich nur für humane Serum-Proben mit normalem Tf-Glykoformen-Muster durchgeführt, nicht jedoch für Proben mit erhöhtem CDT-Level. Diese Studie von del Castillo Busto *et al.* (2006) liefert ebenfalls keine Hinweise auf ein unterschiedliches Verhalten von den Tf-Glykoformen gegenüber den verwendeten Fe-Isotopen.

Eine weitere mögliche Ursache kann bei dem minimal unterschiedlichen Sättigungs-prozedere für die Methoden liegen. Bei der *double-spiking* IDA wurde der  $^{57}\text{Fe}$ -Spike in konzentrierter  $\text{HNO}_3$  gelöst. Daher wurde zur Pufferung eine Lösung aus dem  $^{57}\text{Fe}$ -Spike, 20 mM Bis-Tris-Puffer und 500 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung hergestellt, die zur Sättigung verwendet wurde. Durch diese Anpassung lag eine höhere  $\text{CO}_3^{2-}$ -Konzentration während der Sättigung mit  $^{57}\text{Fe}$  vor. Um auszuschließen, dass eine unvollständige Sättigung durch eine zu geringe Konzentration des synergetisch bindenden Anions  $\text{CO}_3^{2-}$  vorlag, wurden einige Proben unter Verwendung einer höheren  $\text{CO}_3^{2-}$ -Konzentration erneut mit der FIA analysiert. Bei Verdopplung der  $\text{CO}_3^{2-}$ -Konzentration durch Zugabe von 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung für die Sättigung mit  $^{nat}\text{Fe}$  und anschließender FIA-ICP-MS Tf-Quantifizierung ergab sich eine identische Tf-Konzentration wie bei Zugabe der 500 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung.

Eine dritte Möglichkeit sind andere  $^{57}\text{Fe}$ -Spezies, die durch die geringfügig veränderten Sättigungs-Bedingungen gleichzeitig mit den CDT-Glykoformen eluieren. Bei der Chromatographie der Proben, gesättigt mit  $^{57}\text{Fe}$ , wurde ein Durchbruch an freiem  $^{57}\text{Fe}$  beobachtet (vgl. Abbildung 49), wohingegen bei der Chromatographie von Proben, die mit  $^{nat}\text{Fe}$  gesättigt wurden, kein Durchbruchpeak auftrat. Allerdings würden diese Fe-Spezies, die durch die geringfügig anderen Bedingungen früher eluierende oder neu entstanden sind, auch bei den Proben mit normalem Tf-Glykoformen-Muster eluieren (vgl. Abbildung 50) und

zu einem falsch positiven erhöhtem CDT-Level führen. Die Tf-Quantifizierung der Proben mit normalem Tf-Glykoformen-Muster lieferten jedoch identische Tf-Konzentrationen für beide Methoden. Eine vierte Möglichkeit sind gleichzeitig mit den CDT-Glykoformen eluierten Cd-Spezies, die als Cd<sup>++</sup>-Ionen (<sup>114</sup>Cd 28,73 %) auf der Masse 57 interferieren. Daher wurde der <sup>57</sup>Fe-Spike mit der ICP-MS auf eine Cd-Verunreinigung überprüft. In dem <sup>57</sup>Fe-Spike wurde kein Cd detektiert.

Die aufgestellten Vermutungen zur Herkunft der Konzentrationsunterschiede bei der Tf-Quantifizierung wurden experimentell widerlegt. Die Ursache der Differenzen beider Methoden für die vier Tiere mit erhöhtem CDT-Level konnte abschließend nicht zufrieden stellend geklärt werden.

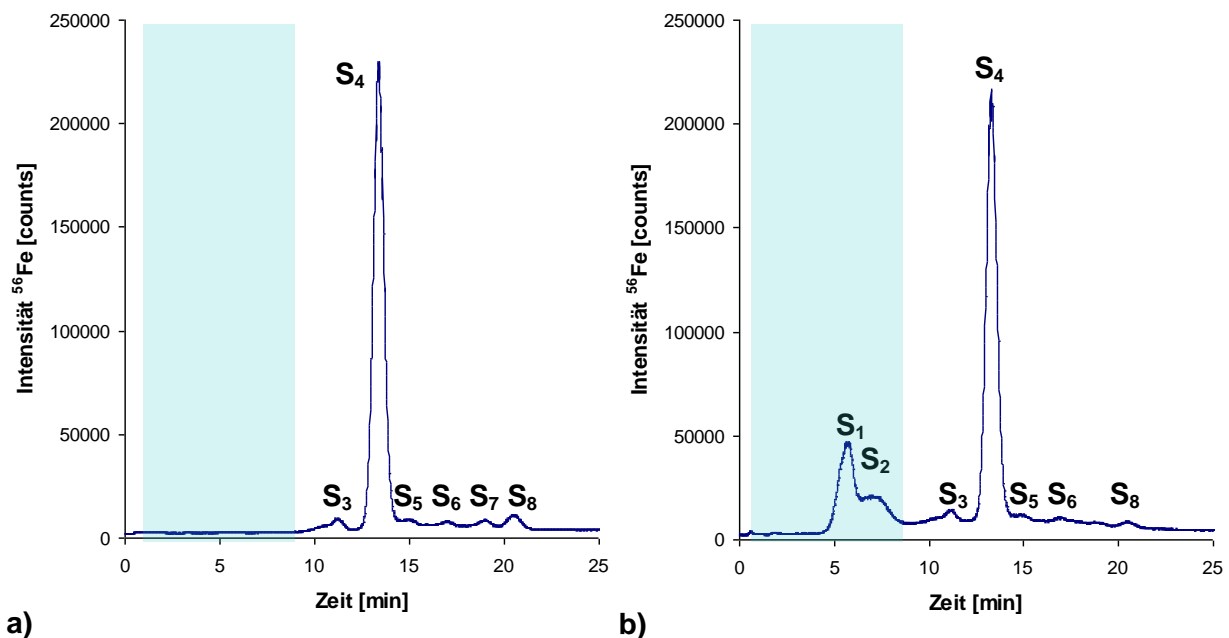
#### **4.5. Biologische Diskussion der Ergebnisse zur Tf-Quantifizierung**

##### **4.5.1. Absolute Quantifizierung von Seehund-Tf und dessen Glykoformen mit FIA**

Variationen im Tf-Glykoformen-Muster werden in der Humanmedizin als Biomarker für Leberschädigungen genutzt (Murawaki *et al.* 1997; Arndt 2001; Helander *et al.* 2001a). Ähnlich der humanen Diagnostik können auch Seehund-Tf-Konzentrationen bzw. die zugehörigen Glykoformen-Muster als potentielle Biomarker für die Bewertung des Gesundheitszustandes von Seehunden verwendet werden.

Das durch die SAX-Chromatographie erhaltene Tf-Glykoformen-Muster wird von der höchst konzentrierten Glykoform S<sub>4</sub> dominiert, welche von verschiedenen geringer konzentrierten Glykoformen unterschiedlicher Sialinierungsgrade flankiert ist. Die geringer sialinierten Glykoformen haben, bedingt durch ihre weniger negativen Ladungen, im Vergleich zu S<sub>4</sub> kürzere Retentionszeiten, während die höher sialinierten Glykoformen später als S<sub>4</sub> eluieren. Die geringer sialinierten Glykoformen ohne, mit einer oder mit zwei endständigen Sialinsäureresten ihrer N-Glykane sind abnormale Variationen. Die Summe aus A-, Mono- und Disialo-Tf ist als CDT-Konzentration definiert. Üblicherweise ist ein geringer CDT-Level im Serum vorhanden, da auch deglykosylierende Enzyme wie Neuraminidase im Serum präsent sind. Durch sie werden Glykoproteine während ihre Lebensdauer umgesetzt, dies ist ein Zeichen für die Alterung von Proteine (Streyer 1999, S. 501). Bei der Alterung des Tf-Moleküls sowie bei gestörter Synthese der posttranslationalen Modifikation, die zu fehlenden endständigen Sialinsäureresten oder Abwesenheit ganzer Zuckerketten führen kann, wird das beschädigte Tf aus der Zirkulation entnommen. Der Asialoglykoprotein-Rezeptor bindet defekte Tfs mit terminaler Galaktose, also fehlender Sialinsäure (Weigel und Yik 2002). Diese gebundenen Proteine werden dann in den Lysosomen abgebaut (Eskelinen *et al.* 2003). Solche Tf-Glykoformen mit geringer oder keiner endständigen Sialinierung sind weniger effektiv beim Eisentransport. Sie zeigen eine deutlich verkürzte Halbwertszeit

gegenüber einem normalen Tf-Molekül, welches durchschnittlich mehr als 100mal recycelt wird. In Abbildung 52 ist ein normales Tf-Glykoformen-Muster eines Seehundes (Abbildung 52a) im Vergleich zu einem Glykoformen-Muster mit erhöhten CDT-Werten (Abbildung 52b) abgebildet.



**Abbildung 52:** SAX-HPLC-ICP-MS Chromatogramm **a)** mit normalem Glykoformen-Muster am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres W05/08Pv (männlich, 119 cm, 39 kg, Neuwerk 10.10.08) **b)** mit abnormalem Glykoformen-Muster am Beispiel einer Serum-Probe des Tieres W02/08Pv (männlich, 130 cm, 48 kg, Neuwerk 10.10.08). Der hellblaue Kasten markiert den Bereich der CDT-Glykoformen

Das normale Glykoformen-Muster von Seehund-Tf (Abbildung 52a) ist dem klinisch unauffälligen Glykoformen-Muster menschlichen Tfs ähnlich (Abbildung 44). Die Unterschiede der Tf-Glykoformen-Muster zeigen, dass auch in Seehund-Blutproben abnormale Tf-Variationen vorkommen, ähnlich der CDT-Glykoformen in humanen Blutproben. Die CDT-Werte können möglicherweise ebenfalls als Biomarker für Lebererkrankungen Anwendung finden.

#### 4.5.2. Bestimmung des Referenzbereichs für Tf- und CDT-Konzentrationen für Seehunde aus der Nordsee

Erstmalig wurde eine absolute Quantifizierung von Tf und Tf-Glykoformen von 43 wildlebenden Seehunden aus der deutschen Nordsee durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die Tf-Konzentrationen der untersuchten weiblichen Tiere über denen der männlichen Tiere lagen. Die gesamte Tf-Konzentrationen sowie die berechneten CDT-Konzentrationen dieser Serum-Proben sind in Tabelle 35 aufgelistet.

**Tabelle 35:** Tf- und CDT-Konzentration mit Standardabweichung und CDT-Level für 43 Seehunde aus der deutschen Nordsee gefangen auf der Lorenzenplate (L) und Helgoland (H). Juvenile ( $\leq 2$  Jahre) und adulte ( $> 2$  Jahre), männliche (m) und weibliche (w) Tiere (zur besseren Übersicht mit einer Linie abgegrenzt).

Tier	Datum	Ort	Alter [Jahre]	Geschlecht	Tf [g/L]	SD [g/L]	CDT [g/L]	SD [g/L]	CDT/Tf*100 [%]
P.v. 3287	10.04.06	H	>2	m	<b>1,64</b>	0,10	<b>0,07</b>	0,02	<b>4,3</b>
P.v. 3288	10.04.06	H	>2	m	<b>1,77</b>	0,10	<b>0,09</b>	0,02	<b>5,1</b>
P.v. 3289	10.04.06	H	>2	m	<b>1,93</b>	0,10	<b>0,10</b>	0,01	<b>5,2</b>
P.v. 3290	10.04.06	H	$\leq 2$	m	<b>1,26</b>	0,09	<b>0,05</b>	0,03	<b>4,0</b>
P.v. 3294	11.04.06	H	>2	m	<b>2,27</b>	0,08	<b>0,13</b>	0,01	<b>5,7</b>
P.v. 3296	11.04.06	H	>2	m	<b>2,02</b>	0,07	<b>0,06</b>	0,01	<b>3,0</b>
P.v. 3300	19.04.06	L	$\leq 2$	m	<b>2,15</b>	0,11	<b>0,08</b>	0,02	<b>3,7</b>
P.v. 3303	19.04.06	L	>2	m	<b>1,93</b>	0,09	<b>0,07</b>	0,00	<b>3,6</b>
P.v. 3306	19.04.06	L	>2	m	<b>2,27</b>	0,05	<b>0,07</b>	0,01	<b>3,1</b>
P.v. 3307	19.04.06	L	>2	m	<b>1,92</b>	0,09	<b>0,06</b>	0,01	<b>3,1</b>
P.v. 3308	19.04.06	L	>2	m	<b>2,24</b>	0,04	<b>0,51</b>	0,05	<b>22,8</b>
P.v. 3309	19.04.06	L	>2	m	<b>1,77</b>	0,04	<b>0,05</b>	0,01	<b>2,8</b>
P.v. 3310	19.04.06	L	>2	m	<b>2,27</b>	0,10	<b>0,02</b>	0,00	<b>0,9</b>
P.v. 3312	19.04.06	L	>2	m	<b>2,45</b>	0,07	<b>0,25</b>	0,02	<b>10,2</b>
P.v. 3314	19.04.06	L	>2	m	<b>2,27</b>	0,10	<b>0,10</b>	0,01	<b>4,4</b>
P.v. 3315	19.04.06	L	>2	m	<b>2,35</b>	0,03	<b>0,09</b>	0,01	<b>3,8</b>
P.v. 3564	28.09.06	H	>2	m	<b>1,83</b>	0,08	<b>0,05</b>	0,01	<b>2,7</b>
P.v. 3565	28.09.06	H	>2	m	<b>1,77</b>	0,06	<b>0,03</b>	0,01	<b>1,7</b>
P.v. 3566	28.09.06	H	>2	m	<b>1,92</b>	0,04	<b>0,09</b>	0,00	<b>4,7</b>
P.v. 3677	13.03.07	L	>2	m	<b>2,19</b>	0,13	<b>0,10</b>	0,04	<b>4,6</b>
P.v. 3681	13.03.07	L	>2	m	<b>2,06</b>	0,10	<b>0,02</b>	0,00	<b>1,0</b>
P.v. 3682	13.03.07	L	>2	m	<b>2,36</b>	0,09	<b>0,06</b>	0,06	<b>2,7</b>
P.v. 3684	13.03.07	L	$\leq 2$	m	<b>1,30</b>	0,03	<b>0,04</b>	0,01	<b>3,4</b>
P.v. 3687	13.03.07	L	$\leq 2$	m	<b>1,48</b>	0,12	<b>0,02</b>	0,01	<b>1,6</b>
P.v. 3688	13.03.07	L	>2	m	<b>2,16</b>	0,01	<b>0,02</b>	0,00	<b>0,9</b>
P.v. 3689	13.03.07	L	$\leq 2$	m	<b>2,29</b>	0,08	<b>0,01</b>	0,00	<b>0,6</b>
P.v. 3691	13.03.07	L	$\leq 2$	m	<b>2,14</b>	0,04	<b>0,08</b>	0,01	<b>3,6</b>
P.v. 3692	13.03.07	L	$\leq 2$	m	<b>1,75</b>	0,09	<b>0,21</b>	0,08	<b>12,0</b>
P.v. 4112	02.11.07	L	>2	m	<b>1,62</b>	0,01	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,0</b>
P.v. 4115	02.11.07	L	>2	m	<b>1,56</b>	0,04	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,0</b>
P.v. 4116	02.11.07	L	>2	m	<b>1,98</b>	0,03	<b>0,04</b>	0,03	<b>2,0</b>
P.v. 4120	02.11.07	L	>2	m	<b>2,16</b>	0,05	<b>0,10</b>	0,01	<b>4,6</b>
P.v. 4123	02.11.07	L	>2	m	<b>1,97</b>	0,14	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,0</b>
P.v. 4124	02.11.07	L	$\leq 2$	m	<b>1,76</b>	0,07	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,0</b>
P.v. 3301	19.04.06	L	$\leq 2$	w	<b>2,54</b>	0,06	<b>0,08</b>	0,01	<b>3,1</b>
P.v. 3305	19.04.06	L	>2	w	<b>1,85</b>	0,06	<b>0,33</b>	0,06	<b>17,8</b>
P.v. 3313	19.04.06	L	>2	w	<b>2,04</b>	0,11	<b>0,06</b>	0,03	<b>2,9</b>
P.v. 3563	27.09.06	H	$\leq 2$	w	<b>2,81</b>	0,07	<b>0,89</b>	0,05	<b>31,7</b>
P.v. 3683	13.03.07	L	$\leq 2$	w	<b>2,18</b>	0,11	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,0</b>
P.v. 3690	13.03.07	L	>2	w	<b>2,22</b>	0,25	<b>0,02</b>	0,00	<b>1,0</b>
P.v. 4117	02.11.07	L	$\leq 2$	w	<b>2,63</b>	0,11	<b>0,03</b>	0,01	<b>1,1</b>
P.v. 4118	02.11.07	L	$\leq 2$	w	<b>2,05</b>	0,07	<b>0,19</b>	0,03	<b>9,3</b>
P.v. 4119	02.11.07	L	>2	w	<b>2,45</b>	0,08	<b>0,03</b>	0,01	<b>1,2</b>

In diesem Probenstet wurden eine minimale Tf-Konzentration von 1,26 g/L und eine maximale Konzentration von 2,81 g/L quantifiziert. Der Median der Tf-Konzentrationen der 43 Serum-Proben beträgt 2,05 g/L. Zwischen den beiden Fangorten ( $N_1 = 33 / N_2 = 10 /$

U = 218,5 / P = 0,125) und den beiden Altersgruppen ( $N_1 = 30 / N_2 = 13 / U = 199,0 / P = 0,928$ ) wurden keine signifikanten Unterschiede in den Tf-Konzentrationen gefunden.

Zwischen den männlichen und den weiblichen Tieren wurden signifikante Unterschiede in den Werten der Tf-Konzentrationen berechnet ( $N_1 = 34 / N_2 = 9 / U = 234,5 / P = 0,013$ ). Für zukünftige Untersuchungen kann ein Referenzbereich (5 % - 95 % Perzentil) von 1,42 - 2,35 g/L Tf für die Männchen zugrunde gelegt werden. Der Referenzbereich (5 % - 95 % Perzentil) für die weiblichen Tiere liegt mit 1,93 - 2,74 g/L Tf etwas höher (Tabelle 35).

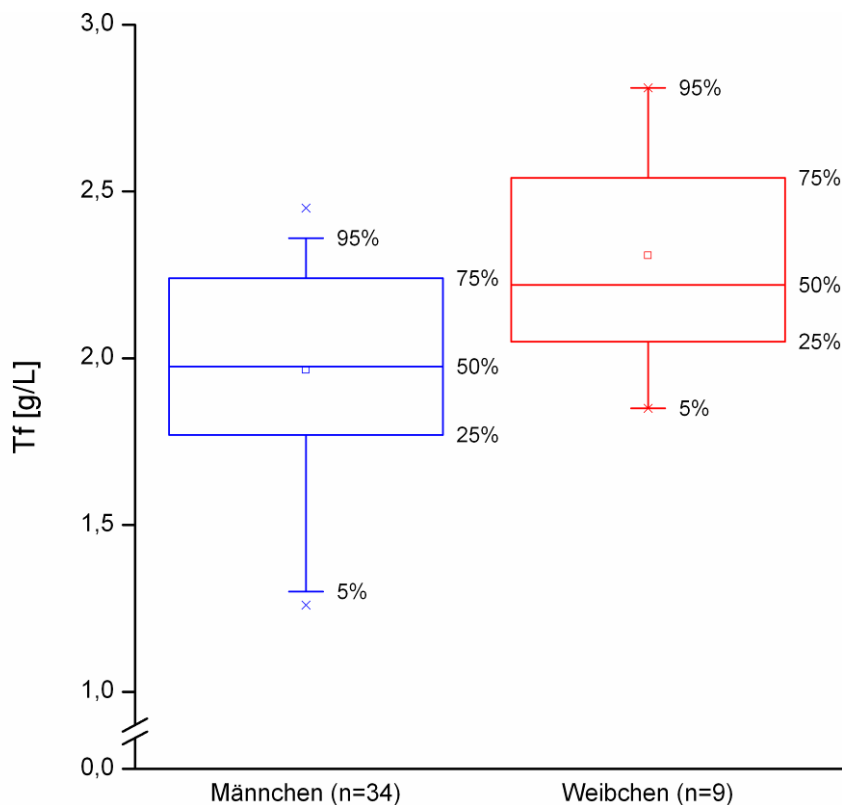
Die Tf-Glykoformen-Muster von drei männlichen und drei weiblichen Seehunden (P.v. 3308 / P.v. 3312 / P.v. 3692 / P.v. 3305 / P.v. 3563 / P.v. 4118) zeigen auffällige Abweichungen. Die Tf-Glykoformen-Muster ähnelt dem des Tieres W02/08Pv (Abbildung 52b), die CDT-Konzentrationen dieser Tiere sind im Vergleich zu den übrigen 37 Tieren stark erhöht. Diese Tiere wurden nicht in die Berechnung des Referenzbereichs einbezogen. Bei ihnen wurde eine maximale CDT-Konzentration von 0,89 g/L gemessen. Diese Konzentration entspricht, im Bezug auf die Tf-Konzentration der Probe, einem CDT-Level von 31,7 %.

Der Referenzbereich (5 % - 95 % Perzentil) für die CDT-Werte wurde aus den Werten der verbleibenden 37 Tiere mit 0,00 - 0,10 g/L CDT berechnet, dies entspricht einem CDT-Level von 0,0 - 5,1 % (Tabelle 36).

**Tabelle 36:** Statistische Parameter für die Tf- und CDT-Konzentrationen von Serum-Proben der 43 Seehunde aus der deutschen Nordsee.

	<b>Männchen</b>	<b>Weibchen</b>	<b>Summe</b>	
	<b>Tf [g/L]</b>	<b>Tf [g/L]</b>	<b>Tf [g/L]</b>	
<b>Median</b>	1,97	2,22	<b>2,05</b>	
<b>Mittelert</b>	1,97	2,31	2,04	
<b>SD</b>	0,31	0,32	0,34	
<b>Min</b>	1,26	1,85	1,26	
<b>Max</b>	2,45	2,81	2,81	
<b>Anzahl</b>	34	9	43	
<b>5% Perzentil</b>	<b>1,42</b>	<b>1,93</b>	1,49	
<b>95% Perzentil</b>	<b>2,35</b>	<b>2,74</b>	2,53	
	<b>normales Tf-Isoformen Muster</b>		<b>erhöhte CDT-Level</b>	
	<b>CDT [g/L]</b>	<b>CDT/Tf*100 [%]</b>	<b>CDT [g/L]</b>	<b>CDT/Tf*100 [%]</b>
<b>Median</b>	0,05	2,94	0,29	14,90
<b>Mittelert</b>	0,05	2,60	0,40	17,29
<b>SD</b>	0,04	1,71	0,27	8,72
<b>Min</b>	0,00	0,00	0,19	9,27
<b>Max</b>	0,13	5,73	0,89	31,67
<b>Anzahl</b>	37	37	6	6
<b>5% Perzentil</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,19	9,50
<b>95% Perzentil</b>	<b>0,10</b>	<b>5,10</b>	0,80	29,45

Die ermittelten Referenzbereiche für die gemessenen Tf-Konzentrationen der 43 Seehunde aus der deutschen Nordsee sind in Abbildung 53 in einem Box-Diagramm veranschaulicht.



**Abbildung 53:** Tf-Konzentrationen der 43 Seehunde (34 männliche Tiere und 9 weibliche Tiere). Der Referenzbereich ist als 5 – 95 % Perzentil, der Median als Strich bei 50 %, der Mittelwert als Quadrat, das Maximum und Minimum sind als Kreuz dargestellt.

Der Referenzbereich für die weiblichen Seehunde liegt insgesamt höher als der für die Männchen.

Die Quantifizierung von Tf durch antikörperbasierte Methoden ist auf Menschen und einige wenige Nutz- und Haustiere beschränkt, daher wird im Folgenden der Referenzbereich für Tf aus der Humanmedizin aufgeführt. Die Tf-Quantifizierung erfolgt vornehmlich durch Immuno-Nephelometrie und Immuno-Turbidimetrie (del Castillo Busto *et al.* 2009b).

In der humanen Diagnostik wird der Referenzbereich für Frauen (2,50 - 3,80 g/L) ebenfalls leicht über dem für Männer (2,15 - 3,65 g/L) angegeben<sup>[8]</sup>. Del Castillo Busto *et al.* (2006) haben mit einem IDA-ICP-MS Ansatz Tf in humanen Serum-Proben quantifiziert und dabei in zehn Proben Werte von 1,5 - 4,0 g/L bestimmt.

Durch die Tf-Quantifizierung über das Fe mit ICP-MS Detektion kann ebenfalls die TIBC berechnet werden. Dies ermöglicht den Vergleich mit einigen wenigen Studien mariner Säuger, in denen der Eisenstatus der Tiere untersucht wurde (Nyman *et al.* 2003; Burns *et al.* 2004; Kumagai 2004; Mazzaro *et al.* 2004; Fair *et al.* 2006). Der Referenzbereich für weibliche Seehunde mit 1,93 - 2,74 g/L Tf entspricht 47,57 - 67,54  $\mu\text{mol/L}$  TIBC und für die Männchen mit 1,42 - 2,35 g/L Tf entsprechend 35,00 - 57,93  $\mu\text{mol/L}$  TIBC.

Aus 15 Seehund-Serum Proben wurde ebenfalls mit *double-spiking* IDA die Tf-Konzentration neben weiteren Werten zum Eisen-Status bestimmt (Tabelle 37).

Zur Abschätzung eines Referenzbereichs wurden die Seehunde, welche nicht lebensfähig waren und von einem Seehundjäger getötet werden mussten, nicht mit berücksichtigt. Ebenso die Wildfang-Tiere mit abnormalem Tf-Glykoformen-Muster, bei denen die beiden ICP-MS Quantifizierungs-Methoden unterschiedliche Konzentrationen hervorbrachten.

So wurden zur Bemessung eines Referenzbereiches nur die Werte der verbleibenden sieben Wildfangtiere kalkuliert (Tabelle 37, fett hervorgehoben). Eine Unterscheidung zwischen weiblichen und männlichen Seehunden wurde aufgrund des relativ geringen Probenumfangs nicht vorgenommen.

**Tabelle 37:** Statistische Parameter für Serum-Eisen, *unsaturated iron binding capacity* (UIBC), *total iron binding capacity* (TIBC), Tf-Konzentration und Tf-Sättigung quantifiziert mit *double-spiking* IDA für Seehund-Serumproben. Die getöteten Tiere sind mit einem \* gekennzeichnet.

Probe Tiernummer	Serum-Eisen [ $\mu\text{mol/L}$ ] <sup>56</sup> Fe (endogen)	UIBC [ $\mu\text{mol/L}$ ] <sup>57</sup> Fe (exogen)	TIBC [ $\mu\text{mol/L}$ ] <sup>56</sup> Fe + <sup>57</sup> Fe	Tf [g/L]	Tf-Sättigung [%] <sup>56</sup> Fe/TIBC*100
P.v. 4112	<b>14,57</b>	<b>28,62</b>	<b>43,19</b>	<b>1,75</b>	<b>33,74</b>
P.v. 4115	<b>11,60</b>	<b>31,13</b>	<b>42,73</b>	<b>1,73</b>	<b>27,14</b>
P.v. 4116	<b>21,08</b>	<b>28,50</b>	<b>49,57</b>	<b>2,01</b>	<b>42,52</b>
P.v. 4117	<b>26,96</b>	<b>38,15</b>	<b>65,11</b>	<b>2,64</b>	<b>41,41</b>
P.v. 4118	20,12	37,84	57,96	2,35	34,71
W01/08Pv	<b>22,51</b>	<b>25,41</b>	<b>47,92</b>	<b>1,94</b>	<b>46,97</b>
W02/08Pv	26,78	134,28	161,06	6,53	16,63
W03/08Pv	<b>15,74</b>	<b>27,25</b>	<b>42,99</b>	<b>1,74</b>	<b>36,58</b>
W04/08Pv	18,88	76,19	95,07	3,86	19,92
W05/08Pv	<b>20,90</b>	<b>37,57</b>	<b>58,46</b>	<b>2,37</b>	<b>35,74</b>
P.v. 4144*	16,56	112,94	129,50	5,25	12,79
P.v. 4145*	18,56	40,78	59,34	2,41	31,28
P.v. 4190*	22,50	45,21	67,72	2,75	33,25
P.v. 4191*	9,30	47,87	57,17	2,32	16,28
P.v. 4195*	10,22	52,49	62,71	2,54	16,30
<b>Mittel</b>	19,05	30,95	50,00	2,03	37,73
<b>Median</b>	20,90	28,62	47,92	1,94	36,58
<b>Min</b>	11,60	25,41	42,73	1,73	27,14
<b>Max</b>	26,96	38,15	65,11	2,64	46,97
<b>Anzahl</b>	7	7	7	7	7
<b>5% Perzentil</b>	<b>12,49</b>	<b>25,96</b>	<b>42,80</b>	<b>1,74</b>	<b>29,12</b>
<b>95% Perzentil</b>	<b>25,63</b>	<b>37,98</b>	<b>63,12</b>	<b>2,56</b>	<b>45,63</b>

Für Serum-Eisen wurde in dieser Studie ein Referenzbereich (5 - 95 % Perzentil) von 12,49 - 25,63  $\mu\text{mol/L}$  und für die TIBC ein Bereich von 42,80 - 63,12  $\mu\text{mol/L}$  bestimmt.

Für marine Säuger werden in der Literatur vereinzelt die colorimetrisch ermittelten Konzentrationen an Serum-Eisen und TIBC als indirekter Parameter für die Tf-Konzentration angegeben. Burns *et al.* (2004) untersuchten unter anderem den Eisenstatus von 13 wildlebenden weiblichen Seehunden. Für diese adulten Weibchen wurde ein Mittelwert  $\pm$  SD für Serum-Eisen von  $46,55 \pm 6,80 \mu\text{mol/L}$  und für TIBC von  $64,9 \pm 7,9 \mu\text{mol/L}$  bestimmt, die Tf-Sättigung dieser Weibchen lag bei  $68,9 \pm 6,4 \%$ . Diese Werte liegen deutlich über den in

dieser Studie ermittelten Konzentrationen. Jedoch ist zu beachten, dass es sich bei Burns *et al.* ausschließlich um adulte weibliche Tiere handelte.

Nyman *et al.* (2003) untersuchten 29 wildlebende Ringelrobben (*Phoca hispida baltica*) und 30 Kegelrobben (*Halichoerus grypus*) aus der Ostsee im Vergleich zu Ringelrobben von Spitzbergen und Kegelrobben aus Kanada von Sable Island auf eine Schadstoffbelastung bewertet durch verschiedene Biomarker. Die Autoren unterschieden nicht zwischen den Geschlechtern und gaben für die Ringelrobben aus der Ostsee einen Bereich von 9 - 70  $\mu\text{mol/L}$  für Serum-Eisen (Mittelwert = 34  $\mu\text{mol/L}$ ) und 56 - 165  $\mu\text{mol/L}$  für TIBC (Mittelwert = 87  $\mu\text{mol/L}$ ) an. Für die Kegelrobben lagen beide Bereiche niedriger, für Serum-Eisen mit 5,3 - 47  $\mu\text{mol/L}$  (Mittelwert = 22  $\mu\text{mol/L}$ ) und für TIBC mit 31 - 77  $\mu\text{mol/L}$  (Mittelwert = 53  $\mu\text{mol/L}$ ). Diese Bereiche decken eine relativ weite Spanne ab und zeigen eine breite biologische Streuung. Diese Streuung ist nicht nur durch die normale Variabilität zwischen den Individuen bedingt, sondern wird auch durch den aktuellen Ernährungszustand der einzelnen Tiere beeinflusst (Kumagai 2004). Die von Nyman *et al.* (2003) angegebenen Bereiche für Serum-Eisen und TIBC sowohl der Ringelrobben als auch der Kegelrobben aus der Ostsee schließen die in dieser Studie ermittelten Referenzbereiche für Seehunde ein.

Die in dieser Arbeit experimentell bestimmte Tf-Sättigung bei Seehunden liegt in einem Bereich von 29,12 - 45,63 % (5 - 95 % Perzentil). Dieser Referenzbereich liegt deutlich unter dem von Burns *et al.* (2004) ermittelten Wert von 68,9 % für adulte weibliche Seehunde. Möglicherweise variiert die Tf-Sättigung bei Seehunden auch zwischen den Geschlechtern. Bei Mazzaro *et al.* (2004) findet man für in Dauerhaltung lebende Nördliche Seebären (*Callorhinus ursinus*) eine Tf-Sättigung (Mittelwert  $\pm$  SD) für Weibchen von  $56 \pm 16,5$  % und für Männchen von nur  $36 \pm 9,3$  %.

Die bestimmte Sättigung für Seehund-Tf liegt allerdings über der für humanes Tf. Wie zuvor erwähnt, beträgt der Bereich für die Tf-Sättigung humaner Serum-Proben gesunder Individuen etwa 25 - 30 % (del Castillo Busto *et al.* 2006; De Domenico *et al.* 2008; del Castillo Busto *et al.* 2009b; del Castillo Busto *et al.* 2010), wobei der Referenzbereich unter Berücksichtigung der biologischen Streuung von klinischen Laboratorien mit 16 - 45 % angegeben wird<sup>[8]</sup>.

Die niedrigen, unter dem ermittelten Referenzbereich liegenden Werten für das Serum-Eisen der Tiere P.v. 4191 (9,3  $\mu\text{mol/L}$ ) und P.v. 4195 (10,2  $\mu\text{mol/L}$ ) weisen auf einen Eisenmangel hin. Dies spiegelt sich auch in der berechneten Sättigung von nur etwa 16 % wider. Allerdings ist auch für drei weitere Tiere (W02/08Pv / W04/08Pv / P.v. 4144) die Sättigung mit 16,6 %, 19,9 % und 12,8 % gering. Dabei liegt die Konzentration an Serum-Eisen im ermittelten Referenzbereich. Auffällig ist, dass diese drei Tiere ein deutlich erhöhtes CDT-Level zeigen.



### 4.5.3. Fallstudie: Tiere aus dem Elbe-Ästuar

Bei einem Wildfang nahe der Insel Neuwerk im Oktober 2008 wurden erstmals Seehunde aus dem Elbe-Mündungsgebiet beprobt. Da es sich um einen neuen und antropogen stark beeinflussten Beprobungsstandort handelt, wurden diese Proben separat zu denen der Wildfangtiere von der Lorenzenplate und Helgoland betrachtet.

Bei diesem Wildfang wurden fünf männliche Seehunde beprobt. Die Insel Neuwerk liegt im Hamburgischen Wattenmeer, welches stark durch die Elbe beeinflusst wird. Die Elbe ist eine stark befahrene Wasserstraße und einer der großen Flüsse, die Schadstoffe in die Nordsee einträgt.

Von diesen fünf Tieren wurden klinische und immunologische Parameter sowie die Belastungssituation mit Elementen, chlorierte Pestizide und polychlorierte Biphenyle untersucht (Kakuschke *et al.* 2010b). Ebenfalls wurde die Konzentration von Tf und dessen Glykoformen quantifiziert (Tabelle 38).

**Tabelle 38:** Tf- und CDT-Konzentration mit Standardabweichung und CDT-Level für fünf Seehunde von einem Wildfang (W) nahe Neuwerk (N) in 2008. Juvenile ( $\leq 2$  Jahre) und adulte ( $> 2$  Jahre), männliche (m) und weibliche (w) Tiere.

Tier	Datum	Ort	Alter [Jahre]	Geschlecht	Tf [g/L]	SD [g/L]	CDT [g/L]	SD [g/L]	CDT/Tf*100 [%]
<b>W 01/08 Pv</b>	10.10.08	N	$\leq 2$	m	<b>1,81</b>	0,09	<b>0,02</b>	0,02	<b>1,31</b>
<b>W 02/08 Pv</b>	10.10.08	N	$> 2$	m	<b>2,94</b>	0,09	<b>0,91</b>	0,13	<b>31,06</b>
<b>W 03/08 Pv</b>	10.10.08	N	$> 2$	m	<b>1,65</b>	0,07	<b>0,01</b>	0,01	<b>0,37</b>
<b>W 04/08 Pv</b>	10.10.08	N	$\leq 2$	m	<b>2,50</b>	0,01	<b>0,40</b>	0,03	<b>16,15</b>
<b>W 05/08 Pv</b>	10.10.08	N	$\leq 2$	m	<b>2,52</b>	0,08	<b>0,06</b>	0,02	<b>2,23</b>

Die quantifizierten Tf-Werte liegen für drei der Tiere (W02/08Pv / W04/08Pv / W05/08Pv) über dem Referenzbereich der männlichen Tiere von der Lorenzenplate und Helgoland. Zwei dieser Seehunde (W02/08Pv / W04/08Pv) zeigen ebenfalls einen deutlich erhöhten CDT-Level (Abbildung 52b). Die Tiere W01/08Pv und W03/08Pv sind von ihrem Glykoformen-Muster und von der quantifizierten Tf-Konzentration unauffällig (Abbildung 52a).

Die Auffälligkeiten in der Tf-Konzentration der Seehunde aus dem Elbe-Ästuar sind im Vergleich zu den männlichen Tieren der Lorenzenplate und Helgoland nicht verschieden ( $N_1 = 34 / N_2 = 5 / U = 119,0 / P = 0,164$ ).

Die Seehunde von Neuwerk zeigen erhöhte  $\gamma$ -Globulin-Level, die möglicherweise auf erhöhte Pathogen-Konzentrationen aufgrund der Nähe zu dicht besiedelten Gebieten zurückzuführen sind (Kakuschke *et al.* 2010b). Ähnliche Befunde fanden sich für Seehunde in British Columbia, Kanada und Washington State, USA (Mos *et al.* 2006). Die Metalle V, Sn, Pb und Sr sind im Blut der Seehunde aus dem Elbe-Ästuar deutlich höher als bei den Tieren aus dem nordfriesischen Wattenmeer (Griesel *et al.* 2008). Bei einem der fünf Tiere (W03/08Pv) wurde eine Metallsensibilisierung für Sn und Ti gefunden, eine Reaktion, die auf einen

chronischen Einfluss dieser Metalle auf das Immunsystem des Tieres hinweist (Kakuschke *et al.* 2005; 2007; 2008a). Die intensive Nutzung der Wasserstraße bedingt einen erhöhten Eintrag von Schwermetallen, wie z.B. als Tributylzinn welches in Schiffsanstrichen verwendet wurde. Durch die Gezeiten und besonders durch wiederkehrende Baggerungen zur Vertiefung der Schifffahrtsstraße werden die besonders belasteten Sedimente wiederholt aufgewirbelt (Loewe 2009) und gelangen so vermehrt in die Wassersäule und in die Nahrungskette. Dies zeigt sich auch im Verteilungsmuster der in dieser Studie untersuchten organischen Schadstoffe (Kakuschke *et al.* 2010b). Die erhöhten Hexachlorbenzen (HCB)-Level weisen auf einen charakteristischen Beitrag an Schadstoffen aus der Elbe hin (Loewe *et al.* 2006).

Des Weiteren wurden die Konzentrationen der APPs C-reaktives Protein (CRP) und Haptoglobin (Hp) bestimmt. Die APPs als Elemente der angeborenen Immunantwort reagieren schnell auf unspezifische Stimuli, mit dem vornehmlichen Ziel der Wiederherstellung der Homöostase und der Hemmung von mikrobiellem Wachstum (Murata *et al.* 2004). So bindet Hp das frei werdende Hämoglobin aus beschädigten Erythrozyten und Tf komplexiert das frei werdende Fe und verhindern somit gemeinsam, dass freies Fe pathogenen Bakterien zur Verfügung steht (Petersen *et al.* 2004). Durch solche komplexen Zusammenhänge und der unspezifischen Reaktion der APPs ist es sinnvoll ein Set aus mehreren APPs gemeinsam zu betrachten. Die Konzentrationen der Entzündungsmarker CRP und Hp sind in Tabelle 39 zusammen mit der Tf-Konzentration und dem relativen CDT-Level aufgeführt.

**Tabelle 39:** Konzentrationen von Tf und der relative CDT-Level sowie die Konzentration der Akut-Phase-Proteine Hp und CRP (Kakuschke *et al.* 2010b), in rot sind die gegenüber dem Referenzbereich für Hp <sup>1</sup>(Kakuschke *et al.* 2010a) erhöhten Werte markiert, Pink weist auf die nur leicht angestiegenen Werte im Vergleich zu denen anderer Tiere dieser Fallstudie hin.

Tier	Geschlecht	Tf [g/L]	CDT/Tf*100 [%]	Hp [g/L]	CRP [mg/L]
<b>Referenzbereich</b>	<b>m</b>	<b>1,42 - 2,35</b>		<b>0,11 - 1,24<sup>1</sup></b>	
W 01/08 Pv	m	1,81	1,3	0,93	100
W 02/08 Pv	m	2,94	31,1	0,71	35
W 03/08 Pv	m	1,65	0,4	0,67	30
W 04/08 Pv	m	2,50	16,1	0,56	62
W 05/08 Pv	m	2,52	2,2	0,13	57

Die Hp- und CRP-Konzentration des Tieres W01/08Pv sind gegenüber den anderen vier Tieren dieser Studie leicht erhöht. Gemeinsam mit der hohen Anzahl an Leukozyten und erhöhtem Cortisol bei gleichzeitiger Unauffälligkeit der anderen klinischen Parameter deuten diese Befunde vermutlich auf eine Entzündungsreaktion hin (Kakuschke *et al.* 2010b).

Die erhöhten Tf-Konzentrationen und CDT-Level zeigten keine Korrelation zu Hp und CRP, jedoch werden die APPs zu unterschiedlichen Zeiten im Verlauf einer APR vermehrt ausgeschüttet (Gabay und Kushner 1999). Eine Beziehung ist daher nicht zwingend. Die

Abfolge der Regulierung der APPs kann Hinweise auf den zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion liefern. Die erhöhten Tf-Konzentrationen und CDT-Level konnten nicht mit anderen immunologischen Faktoren oder Parametern der klinischen Chemie korreliert werden. Einzig die Aktivität der Creatin-Kinase war für W02/08Pv und W04/08Pv ebenfalls erhöht (Kakuschke *et al.* 2010b).

#### 4.5.4. Fallstudie: tödlich erkrankte Seehunde

In einer zweiten Fallstudie wurden Proben von Seehunden analysiert, die nach Untersuchung durch einen Veterinärmediziner als nicht überlebensfähig eingestuft und getötet wurden. Für die getöteten Seehunde wurden ebenfalls deutlich erhöhte Tf-Konzentrationen im Vergleich zu dem ermittelten Referenzbereich quantifiziert.

Diese Tiere waren schwer erkrankt, die pathologischen Befunde (nicht vorliegend für P.v. 3675\*) sind mannigfaltig aber vergleichbar zwischen den Tieren (Kakuschke *et al.* 2011). Alle fünf Tiere litten an eine Darmentzündung mit einhergehenden geschwollenen Lymphknoten, Hepatitis und wiesen Veränderungen der Lunge z.B. eine Lungenentzündung auf. Zusätzlich hatten vier Tiere einen Parasitenbefall und bei drei Tieren war die Milz verändert. Entnommene Gewebeproben der Leber, Nieren und Muskeln wurden auf Metalle und organische Schadstoffe untersucht. Zusätzlich wurden die entnommenen Blutproben auf klinische und immunologische Parameter sowie auf den Elementgehalt und organische Schadstoffe analysiert.

In Serum-Proben dieser tödlich erkrankten Tiere wurden ebenfalls Tf und dessen Glykoformen mit FIA quantifiziert, die ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 40 aufgelistet.

**Tabelle 40:** Tf- und CDT-Konzentration mit Standardabweichung und CDT-Level für sechs Seehunde, die aufgrund ihres kritischen allgemeinen Gesundheitszustands von Seehundjägern erschossen wurden (\*). Fundorte Helgoland (H) und Sylt. Juvenile ( $\leq 2$  Jahre) und adulte ( $> 2$  Jahre), männliche (m) und weibliche (w) Tiere.

Tier	Datum	Ort	Alter [Jahre]	Geschlecht	Tf [g/L]	SD [g/L]	CDT [g/L]	SD [g/L]	CDT/Tf*100 [%]
P.v. 3675*	12.03.07	H	$\leq 2$	m	<b>3,34</b>	0,09	<b>0,19</b>	0,01	<b>5,69</b>
P.v. 4144*	06.12.07	H	$\leq 2$	w	<b>3,19</b>	0,09	<b>0,50</b>	0,07	<b>15,67</b>
P.v. 4145*	06.12.07	H	$\leq 2$	m	<b>2,54</b>	0,06	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,00</b>
P.v. 4190*	29.01.08	H	$\leq 2$	w	<b>2,78</b>	0,05	<b>0,10</b>	0,01	<b>3,60</b>
P.v. 4191*	29.01.08	H	$\leq 2$	m	<b>2,42</b>	0,08	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,00</b>
P.v. 4195*	14.02.08	Sylt	$\leq 2$	m	<b>2,58</b>	0,09	<b>0,00</b>	0,00	<b>0,00</b>

Die Tf-Konzentrationen für die männlichen Tiere sind gegenüber dem Referenzbereich signifikant erhöht ( $N_1 = 34 / N_2 = 4 / U = 135,0 / P = 5,42 \cdot 10^{-5}$ ). Auch die Tf-Konzentrationen

der beiden Weibchen liegen über dem Referenzbereich. Da es sich nur um zwei weibliche Tiere handelt, wurde kein U-Test angewendet.

Diese Seehunde wurden aufgrund ihres extrem schlechten Gesundheitszustands getötet. Sie litten an einer Vielzahl verschiedener Symptome, wie Infektionen und Durchfall verursacht von teilweise unbestimmten Ursachen oder mehreren Erkrankungen in Kombination. Daher ist eine Zuordnung der erhöhten Tf-Konzentrationen oder CDT-Level zu einzelnen Krankheitsbildern nicht möglich. Das Tier P.v. 4144 weist keine pathologischen Besonderheiten oder Auffälligkeiten der gemessenen klinischen Parameter auf, die mit dem erhöhten CDT-Level in Verbindung gebracht werden können.

In Tabelle 41 sind die Konzentrationen von CRP und Hp zusammen mit der von Tf und dem relativen CDT-Level für die tödlich erkrankten Tiere aufgelistet.

**Tabelle 41:** Konzentrationen der Akut-Phase-Proteine Tf, Hp und CRP und der CDT-Level. In rot sind die gegenüber dem Referenzbereich erhöhten Werte markiert, Pink weist auf die nur leicht angestiegenen Werte hin<sup>1</sup>(Kakuschke *et al.* 2010a).

Tier	Geschlecht	Tf [g/L]	CDT/Tf*100 [%]	Hp [g/L]	CRP [mg/L]
<b>Referenzbereich</b>	m	1,42 - 2,35		0,11 - 1,24 <sup>1</sup>	
	w	1,93 - 2,74			
P.v. 3675*	m	3,34	5,7	1,30	n.b.
P.v. 4144*	w	3,19	15,7	3,58	93
P.v. 4145*	m	2,54	0,0	0,98	132
P.v. 4190*	w	2,78	3,6	4,00	79
P.v. 4191*	m	2,42	0,0	2,38	103
P.v. 4195*	m	2,58	0,0	3,38	64

Zu CRP von Seehunden wurden bislang wenige Studien publiziert. Funke *et al.* (1997) entwickelten einen Immunoassay mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die unterschiedlich starke Kreuzreaktionen mit Seehund-CRP zeigten. Die höchste gemessene CRP-Konzentration der acht erkrankten Seehunde betrug 93 mg/L (Funke *et al.* 1997). Die CRP-Konzentrationen bei Kakuschke *et al.* (2010b) wurden mit Immunturbidimetrie bestimmt, die Werte lagen in einem Bereich von 30 - 100 mg/L.

Die CRP-Konzentrationen dieser tödlich erkrankten Seehunde sind für drei Tiere (P.v. 4144\* / P.v. 4145\* / P.v. 4190\*) erhöht. Die Werte sind vergleichbar mit dem für Tier W01/08Pv der Seehunde von Neuwerk.

Die Konzentration an Hp ist für vier Tiere (P.v. 4144\* / P.v. 4190\* / P.v. 4191\* / P.v. 4195\*) deutlich erhöht und für das Tier P.v. 3675\* leicht über dem Referenzbereich bzw. für P.v. 4145\* im oberen Bereich des Referenzbereiches für Seehunde des Wattenmeeres, der von Kakuschke *et al.* (2010a) bestimmt wurde. Als Besonderheit wiesen einige Tiere von der Insel Helgoland ebenfalls erhöhte Hp-Konzentrationen im Bereich von 0,82 - 1,98 g/L auf (Kakuschke *et al.* 2010a).

Die Tf-Konzentrationen der tödlich kranken Seehunde liegen für alle sechs Tiere deutlich über dem in Kapitel 4.5.2. bestimmten Referenzbereich (Grebe *et al.* 2011).

Bei der Mehrzahl der Säugetieren regiert Tf zwar als negatives APP (Murata *et al.* 2004; Ceron *et al.* 2005; Gruys *et al.* 2005), aber als Ausnahme ist Tf bei Mäusen zu nennen, dort reagiert es als positives APP (Kalmovarin *et al.* 1991).

Im Zusammenhang mit den erhöhten CRP-Konzentrationen dreier Tiere und der massiv erhöhten Hp-Konzentrationen aller sechs Seehunde kann Tf als positives APP bei Seehunden eingeordnet werden.



## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit war im Rahmen eines Langzeit-Monitoring-Programms zur Beurteilung des Gesundheitszustandes von Seehunden der Nordsee eingebunden. Zur Erweiterung des Parametersets wurde das APP Tf als möglicher Biomarker aus Blutproben von wildlebenden Seehunden isoliert. Das Seehund-Tf wurde im Verlauf der Arbeit durch molekulspezifische Methoden wie 2D-Gelelektrophorese, MALDI- und ESI-MS identifiziert und charakterisiert.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Entwicklung einer akkuraten und präzisen ICP-MS-basierenden Quantifizierungsmethode für Seehund-Tf über das gebundene Eisen, dessen Eignung als natürlicher Elementmarker gezeigt wurde. Denn erst eine unabhängige und verlässliche Quantifizierungs-Methode macht eine Langzeit-Untersuchung möglich.

Die Isolierung von Tf aus Seehund-Blutproben erfolgte nach einer simplen Probenvorbereitung mit Anionenaustausch-Chromatographie und anschließender Fraktionierung der einzelnen Tf-Glykoformen-Peaks. Parallel wurden die Tf-Glykoformen ebenfalls mit 2D-Gelelektrophorese aus der komplexen Matrix Blut separiert. Während die Proteine in Lösung für die Bestimmung der Molekülmasse verwendet wurden, erfolgte der tryptische Verdau der Proteine in den isolierten Gelspots, um für die anschließende Identifizierung über PMF-Interspezies-Protein-Identifizierung und Teilsequenzierung verwendet zu werden.

Seehund-Tf ist homolog zu Tf anderer Säugetier-Spezies. Es hat die physiologisch wichtige Funktion des regulierten Eisentransports im Blut. Transferrin reagiert in Seehunden als positives APP. Insgesamt wurden bis zu neun Seehund-Tf-Glykoformen separiert und identifiziert. Die dominante Tf-Glykoform S<sub>4</sub> hat eine molekulare Masse von 81,136 kDa. Die neun Glykoformen haben einen pI im Bereich von 6,9 - 7,9. Die N-Glykane auf der Proteinoberfläche zeichnen sich durch terminale Sialinsäurereste aus, wobei sich die einzelnen Tf-Glykoformen in der Anzahl der negativ geladenen Sialinsäurereste unterscheiden.

Die Identifizierung über den PMF lieferte die größte Sequenzhomologie zu Tf von Pferden, wobei eine Sequenzabdeckung von 17 % erreicht wurde. Die Sequenz einiger der homologen Peptide wurde mit MS/MS-Experimenten aufgeklärt und durch eine MS-Blast-Suche als proteotypische Peptide für Tf bestätigt, wodurch eine eindeutige Identifizierung der eisenhaltigen Proteine als Seehund-Tf-Glykoformen erfolgte.

Es wurden zwei unabhängige Quantifizierungs-Methoden für das diagnostisch relevante Protein Tf und dessen Glykoformen entwickelt. Diese ICP-MS-basierenden Methoden nutzen den charakteristischen Eisenanteil von Tf zur absoluten Quantifizierung. Durch die Detektion

des Eisens sind diese ICP-MS Methoden unabhängig von der Tier-Spezies und der ins Plasma eingebrachten Fe-Verbindung, in diesem Fall die Tf-Glykoformen.

Die FIA basierte Quantifizierungsmethode ist schnell, akkurat und präzise. Es wird ein einfacher zertifizierter auf NIST rückführbarer Elementstandard zur Kalibrierung genutzt.

Der Vorteil gegenüber der IDA ist, dass keine aufwendigen täglichen Messungen für die Massendiskriminierung, die Bestimmung des Spike-Flusses und zur Spike-Charakterisierung durchgeführt werden müssen. Die Kalibrierung der Probenschleife für die Flussinjektion ist nur einmal durchzuführen und über den gesamten Zeitraum verwendbar, in der der instrumentelle Aufbau des externen Ventils mit Probenschleife nicht verändert wird.

Ein weiterer gewichtiger Vorteil der FIA ist, dass diese Quantifizierungsmethode auch für monoisotopische Elemente wie z.B.  $^{31}\text{P}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$  oder  $^{75}\text{As}$  eingesetzt werden kann, oder für solche Elemente, deren Isotope schwer oder kaum anzureichern sind.

Die absolute Tf-Quantifizierung über IDA-ICP-MS ist ebenfalls eine präzise und akkurate Methode. Der Vorteil gegenüber der FIA liegt darin, dass keine Verdünnung durch den gegenläufigen Gradienten mit ebenfalls 0,75 mL/min erfolgt. Eine begrenzte Verdünnung durch den *post-column* Spike-Fluss mit 0,1 mL/min ist dagegen vernachlässigbar gering.

Bei der Verwendung der *double-spiking* IDA wurde durch die Sättigung mit einem weiteren isotopisch angereicherten Eisen-Spike die zusätzliche diagnostisch relevante Information der Tf-Sättigung bestimmt. Dies erfolgte in nur einer Messung zusammen mit der Bestimmung der Serum-Eisen- und Tf-Konzentration. Allerdings erfolgt durch die Verteilung der Tf-Peaks in einzelne Chromatogramme der Massen 56 und 57 auch ein „Verdünnungseffekt“. Das S/N-Verhältnis der  $^{56}\text{Fe}$  Peaks wurde gemindert, so dass die Nachweisgrenze für die niedrig konzentrierten Glykoformen nicht in jeder Probe überschritten wurde.

Die Vorteile überwiegen auf Seiten der FIA-ICP-MS Methode. Der Vorteil der *double-spiking* IDA, zusätzliche diagnostische Parameter wie die Tf-Sättigung zu liefern, geht verloren, da die Sättigung mit  $^{57}\text{Fe}$  für die Proben mit erhöhten CDT-Leveln nicht geklärte Artefakte produziert. Des Weiteren kann der Nachteil der FIA, die Verdünnung durch den gegenläufigen Gradienten, kompensiert werden. Durch eine Verwendung von Kapillarsäulen (ID 0,3 mm) und der damit verbundenen geringeren Flussrate, ist es möglich mit einem *total consumption* Zerstäuber zu arbeiten. Dadurch gelangt der kompletter Fluss ins Plasma und mit diesem auch der gesamte Analyt, wodurch insgesamt geringere Nachweisgrenzen erreicht werden können.



Zum ersten Mal wurde ein Referenzbereich für Tf von wildlebenden Seehunden aus der Nordsee experimentell ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte mit der akkuraten und präzisen FIA-ICP-MS Methode. Eine solche unabhängige Methode ist eine Grundvoraussetzung insbesondere für Langzeit-Gesundheitsbetrachtungen.

Der Referenzbereiche (5 - 95 % Perzentil) für die Tf-Konzentrationen als Summe der einzelnen Tf-Glykoformen liegt für die weiblicher Seehunde (N = 9) mit 1,93 - 2,74 g/L leicht höher als für die Männchen (N = 34) mit 1,42 - 2,35 g/L. Diese Konzentrationsbereiche entsprechen einer TIBC von 47,57 - 67,54  $\mu\text{mol/L}$  bzw. 35,00 - 57,93  $\mu\text{mol/L}$ .

Neben der Bestimmung von Tf-Konzentration können möglicherweise Unterschiede im Tf-Glykoformen-Muster als potentieller Biomarker genutzt werden. Das chromatographische Muster der Tf-Glykoformen kann in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Das Muster mit der dominanten Glykoform unterscheidet sich von dem mit vermehrt gering-sialinierten Glykoformen, dem *carbohydrate deficient Tf* (CDT).

Ebenfalls wurden in dieser Arbeit Werte zum Eisenstatus mit der *double-spiking* IDA bestimmt. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurde in diesem Fall keine Unterscheidung zwischen Männchen und Weibchen vorgenommen. Für Seehunde mit normalem Tf-Glykoformen-Muster (N = 7) wurde ein Referenzbereich von 12,64 - 25,40  $\mu\text{mol/L}$  für Serum-Eisen und von 42,82 - 62,79  $\mu\text{mol/L}$  für die *total iron binding capacity* (TIBC) ermittelt. Die Tf-Sättigung lag zwischen 29,45 - 45,41 %.

Die Fallstudien der Tiere aus dem Elbe-Ästuar und der tödlich erkrankten Seehunde sind von den Tieren aus der Nordsee abzugrenzen. Die Tiere aus dem anthropogen stark beanspruchten Elbe-Mündungsgebiet wiesen eine für die Elbe charakteristische Schadstoffbelastung auf. Systematische Veränderungen in der Tf-Konzentration oder dem Tf-Glykoformen-Muster konnten für diese Tier nicht festgestellt werden.

Die aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes getöteten Seehunde lieferten interessantes Probenmaterial, da zum einen deutlich mehr Blut entnommen werden konnte und somit methodische Experimente mit dem gleichen Probenmaterial möglich waren. Zum anderen standen so Blutproben von eindeutig erkrankten Tieren zur Verfügung. Allerdings ist es schwierig bis unmöglich, diese krankheitsspezifisch zu bewerten, da diese Tiere alle unter mehreren Krankheiten zugleich litten.

Für alle Tiere lag die Tf-Konzentration deutlich über dem bestimmten Referenzbereich und in Verbindung mit den ebenfalls erhöhten Konzentration der Entzündungsmarker CRP und Hp kann Tf bei Seehunden als positives APP eingeordnet werden. Transferrin als positives APP ist als ein weiter Entzündungsmarker im Set der Parameter zur Gesundheitsbeurteilung von Seehunden geeignet.

In Zukunft kann die Quantifizierung von Tf und dessen Glykoformen als weitere wichtiger Biomarker im Gesundheitsmonitoring von Seehunden Anwendung finden.

Des Weiteren sind die methodischen Entwicklungen dieser Arbeit übertragbar auf andere Fragestellungen in der Proteinanalytik. Die entwickelte FIA-ICP-MS basierte Quantifizierungsmethode ist universell einsetzbar, sie kann für Tf-Glykoformen anderer Tier-Spezies optimiert werden. Darüber hinaus ist eine solche ICP-MS Quantifizierungsmethode für andere thermodynamisch stabile Metall-Protein-Komplexe oder Proteine mit Heteroatomen wie S und Se anwendbar.

Weitere Einsatzmöglichkeiten bieten phosphorylierte Proteine, die als posttranslationelle Modifikation eine oder mehrerer Phosphatgruppen tragen (Pröfrock und Prange 2009). Selbst Proteine, die keine dieser natürlichen Markerelemente aufweisen, können durch verschiedenen Labelingmethoden in eine ICP-MS-detektierbare Form umgewandelt werden (Prange und Pröfrock 2008).

Die Quantifizierung mittels ICP-MS weist eine hohe Genauigkeit auf und ist somit eine ideale Referenzmethode, um Standardreferenzmaterialien zu zertifizieren. Die FIA-ICP-MS hat gegenüber den IDA basierten Methoden den Vorteil, dass sie auch für monoisotopische Elemente eingesetzt werden kann.

Der verwendete Gradientenausgleich bei der FIA-Methode ist auch hilfreich für viele andere Detektionsmethoden. Als Beispiel sei die Verwendung von organischen Lösemitteln in der ESI-MS genannt: Durch den Gradientenausgleich wird eine konstante Zusammensetzung der Lösemittel erhalten und mit der gleich bleibenden Viskosität bildet sich ein stabilerer Spray aus. Es wäre ebenso eine Kombination der IDA-ICP-MS mit einer Gradientenkompensation denkbar, um möglicherweise die Genauigkeit zusätzlich zu verbessern.

Der Gradientenausgleich ist allgemein betrachtet ein bedeutender und viel versprechender Ansatz in der quantitativen Analytik.

## Summary

This study was integrated in a long term monitoring program for the assessment of the health status of North Sea seals. To obtain more complete diagnostic information a wide range of parameters is necessary. For expanding the parameter set the acute phase protein Tf was isolated from wildlife harbour seals. Molecule-specific detection techniques such as 2D gel electrophoresis, MALDI- and ESI-MS were used to unambiguously identify the isolated proteins as seal Tf via cross species protein identification and to further characterise the protein.

Another focus was the development of an accurate and precise protein quantification method for seal Tf via its bound iron used as natural element tag. An independent and reliable quantification method is necessary for comparable long term investigations of the health status of marine mammals such as harbour seals.

After a simple sample preparation protocol the isolation of the seal Tf glycoforms were conducted with anion exchange separation and the following iron guided fractionation. In parallel the Tf glycoforms were also separated with 2D gel electrophoresis. While the proteins in solution were used for the determination of the molecular mass, the proteins in the gel spots were digested with Trypsin and the gained peptides were used for the cross species protein identification.

Seal Tf is homolog to Tf of other mammalian species. Its essential physiologic function is the regulation of the iron transport in the blood. Tf is a positive APP in harbour seals. Up to nine different glycoforms were separated with a pI range of 6.9 - 7.9. For the dominant Tf glycoform S<sub>4</sub> a molecular mass of 81.136 kDa was determined. The N-glycans of Tf are terminated by sialic acid and the different Tf glycoforms vary in their sialic acid content, which is responsible for the elution behaviour of the glycoforms during their ion exchange separation.

The identification via peptide mass fingerprinting (PMF) indicates high sequence homologies to Tf of horses, with a sequence identity of 17 %. The sequence of some peptides were determined by MS/MS experiments and verified by MS-Blast. With this proteotypic peptides the iron containing plasma protein and its glycoforms were clearly identified as seal Tf.

Two independent HPLC-ICP-MS approaches were developed for the sensitive and specific absolute quantification of Tf and its glycoforms using their characteristic iron content. Through the detection of the bound iron the ICP-MS quantification methods are independent of the animal species and the introduced Fe species, in this case the Tf glycoforms.

The FIA based quantification is a fast, accurate and precise method. The calibration is based on a certified, traceable element standard.

Its advantage over the IDA is that no daily measurements for the mass discrimination, spike flow and spike characterisation are necessary. The calibration of the sample loop is only required one time, and can be used until the assembly of the external valve and sample loop is unchanged. Another important benefit is that the FIA can be used for monoisotopic elements such as  $^{31}\text{P}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$  or  $^{75}\text{As}$  or for such elements with isotopes which are poorly enrichable.

The absolute quantification of Tf with IDA-ICP-MS is precise and accurate, too. Its benefit over the FIA is that there is no dilution through the reversed gradient sheath flow with a flow of 0.75 mL/min. Only a restricted dilution with the post column spike flow of 0.1 mL/min happens.

Using a second isotopically enriched iron spike for the saturation of seal Tf (double spiking IDA) the diagnostically relevant parameter Tf saturation is determined directly, in a single measurement along with the serum iron and Tf concentration. Nevertheless, due to splitting up the chromatographic Tf peaks in the masses 56 and 57 there is also a "dilution effect". The S/N ratio of the  $^{56}\text{Fe}$  peaks were reduced so that the limit of detection for the low abundant glycoforms was not reached in every sample.

The comparison of the FIA and IDA based ICP-MS quantification of the Tf glycoforms shows that the advantages prevail for the FIA-ICP-MS method. The benefit of this additional diagnostic relevant parameter determined by double spiking IDA was nullified through the discrepancy in the concentration of the CDT glycoforms gained by the saturation of Tf with the  $^{57}\text{Fe}$  isotope. The only disadvantage of the FIA, the dilution through the reversed gradient sheath flow can be balanced by using a capillary column (ID 0.3 mm) with a reduced flow rate and a total consumption nebuliser. So the whole flow with the analyt is introduced in the plasma and the limit of detection can be minimised.

For the first time it was possible to quantify a baseline reference range (5 - 95 % percentile) of serum Tf for female (N = 9; 1.93 - 2.74 g L<sup>-1</sup>) and male German North Sea seals (N = 34; 1.42 - 2.35 g L<sup>-1</sup>). This equates a total iron binding capacity (TIBC) of 47.57 - 67.54 μmol/L and 35.00 - 57.93 μmol/L, respectively. The quantification was conducted with the accurate and precise FIA-ICP-MS, which is urgently needed when aiming on comparable long term investigations.

Beside the Tf concentration differences in the Tf glycoform pattern can be useful as potential biomarker. The chromatographic pattern can be separated in two groups, one with the

dominant glycoform and several low abundant glycoforms and the other pattern with elevated levels of the low sialinated glycoforms, the carbohydrate deficient Tf (CDT).

With the double spiking IDA additional data of the iron status were determined. With this method only a smaller sample set was investigated, so that no distinction of the gender were considered. For the seals with a normal CDT level (N = 7) a baseline reference range (5 - 95 % percentile) were calculated for serum iron (12.64 - 25.40  $\mu\text{mol/L}$ ) and TIBC (42.82 - 62.79  $\mu\text{mol/L}$ ). The Tf saturation for this sample set is 29.45 - 45.41 %.

The case studies for the five seals living in the German Elbe estuary and the six deadly ill animals were discussed separately. The measured body burden of contaminants for the animals from the area of the anthropogenic influenced Elbe waters shows a characteristic input from the River Elbe. For these animals systematically changes of the Tf concentration or in the Tf glycoform pattern were not detected.

From the deadly ill animals more blood was available and so these samples were used for methodical investigations. For these samples it can be assumed that the animals were definitively diseased. Nevertheless, all of these animals are seriously affected by more than one illness, which made an interpretation of the data challenging or even impossible.

For these six animals the Tf concentration was elevated above the reference range of the North Sea seals. In combination with the high CRP concentrations and the significantly increased Hp values, it would appear that Tf also reacts as a positive acute phase protein (APP) in harbour seals. The positive APP Tf is one more important parameter for the investigation of the health status of harbour seals.

In the future the quantification of Tf and its glycoforms can be used as essential biomarker for the survey of the health status of harbour seals.

Furthermore, the developed methods can be transferred to different questions of the protein analytic. The FIA-ICP-MS can be optimised for Tf glycoforms of different animal species and it can also be adopted to thermodynamically stable metal protein complexes or proteins with heteroatoms. Additionally, phosphorylated proteins, with phosphorus as posttranslational modifications can be quantified with FIA-ICP-MS (Pröfrock und Prange 2009) or proteins without natural elemental tags can be labelled so that they can be detected by ICP-MS (Prange und Pröfrock 2008).

With ICP-MS a highly precise quantification is possible due to this it is an ideal method for certifying standard reference material. The FIA-ICP-MS can be applied also for monoisotopic elements in opposite to the IDA method.

The compensation of the gradient related effects by the reversed gradient sheath flow can also be useful for different detection methods. As example when using ESI-MS with organic

solvents, the gradient compensation will keep the composition of the mobile phase constant and as effect the continual viscosity the spray is more stable. Also a combination of IDA-ICP-MS and the gradient compensation possibly will increase the accuracy.

The gradient compensation in general is an important and promising application for quantitative analytic.

## 6. Literatur

- AbouShakra, F. R., Rayman, M. P., Ward, N. I., Hotton, V. und Bastian, G. (1997).** "Enzymatic digestion for the determination of trace elements in blood serum by inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 12(4): 429-433.
- Adams, T. E., Mason, A. B., He, Q.-Y., Halbrooks, P. J., Briggs, S. K., Smith, V. C., MacGillivray, R. T. A. und Everse, S. J. (2003).** "The Position of Arginine 124 Controls the Rate of Iron Release from the N-lobe of Human Serum Transferrin. A STRUCTURAL STUDY." The Journal of Biological Chemistry. 278(8): 6027-6033.
- Adelung, D., Müller, G., Liebsch, N. und Wilson, R. (2007).** "Verbreitungsmuster von Seehunden in der Nordsee." 2. Wissenschaftstag des Bundesumweltministeriums zur Offshore-Windenergienutzung.
- Aebersold, R. und Goodlett, D. R. (2001).** "Mass Spectrometry in Proteomics." Chemical Reviews. 101(2): 269-295.
- Aebersold, R. und Mann, M. (2003).** "Mass spectrometry-based proteomics." Nature. 422: 198-207.
- Ahrens, L., Siebert, U. und Ebinghaus, R. (2009).** "Temporal trends of polyfluoroalkyl compounds in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German Bight, 1999-2008." Chemosphere. 76(2): 151-158.
- Andersen, S. M., Teilmann, J., Harders, P. B., Hansen, E. H. und Hjøllund, D. (2007).** "Diet of harbour seals and great cormorants in Limfjord, Denmark: interspecific competition and interaction with fishery." ICES Journal of Marine Science. 64.
- Arndt, T. (2001).** "Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation." Clinical Chemistry. 47(1): 13-27.
- Arndt, T., Guessregen, B., Hallermann, D., Nauck, M., Terjung, D. und Weckesser, H. (2008).** "Forensic analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by HPLC--Statistics and extreme CDT values." Forensic Science International. 175(1): 27-30.
- Aubailly, L., Drucbert, A.-S., Danzé, P.-M. und Forzy, G. (2011).** "Comparison of surface plasmon resonance transferrin quantification with a common immunoturbidimetric method." Clinical Biochemistry. in press.
- Bahr, U., Karas, M. und Hillenkamp, F. (1994).** "Analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. 348(12): 783-791.
- Bakker, J., Kellermann, A., Farke, H., Laursen, K., Knudsen, T., Marencic, H., de Jong, F. und Lürßen, G. (1998).** Implementation of the Trilateral Monitoring and Assessment Program (TMAP), Common Wadden Sea Secretariat (CWSS) Trilateral Monitoring and Assessment Group (TMAG): 38.
- Bates, G. W. und Schlabach, M. R. (1975).** "The nonspecific binding of Fe<sup>3+</sup> to transferrin in the absence of synergistic anions." The Journal of Biological Chemistry. 250(6): 2177-2181.
- Becker, J. S. (2007)** Inorganic Mass Spectrometry - Principles and Applications. John Wiley & Sohns, Ltd, Chichester.
- Berta, A. (2002).** Pinnipedia, Overview. In: Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego. 903-911.
- Bettmer, J., Montes Bayón, M., Ruiz Encinar, J., Fernández Sánchez, M. L., Fernández de la Campa, M. d. R. und Sanz Medel, A. (2009).** "The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis." Journal of Proteomics. 72(6): 989-1005.

- Bortolotti, F., De Paoli, G., Pascali, J. P., Trevisan, M. T., Floreani, M. und Tagliaro, F. (2005).** "Analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin: Comparative Evaluation of Turbidimetric Immunoassay, Capillary Zone Electrophoresis, and HPLC." Clinical Chemistry. 51(12): 2368-2371.
- Bowen, D. W. (2002).** Pinniped Ecology. In: Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego. 911-921.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry. 72(1-2): 248-254.
- Budzikiewicz, H. und Schäfer, M. (2005)** Massenspektrometrie. WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, Weinheim
- Burns, J. J. (2002).** Harbor Seal and Spotted Seal. In: Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego. 552-560.
- Burns, J. M., Clark, C. A. und Richmond, J. P. (2004).** "The impact of lactation strategy on physiological development of juvenile marine mammals: implications for the transition to independent foraging." International Congress Series. 1275: 341-350.
- Byrne, S. L., Steere, A. N., Chasteen, N. D. und Mason, A. B. (2010).** "Identification of a kinetically significant anion binding (KISAB) site in the N-lobe of human serum transferrin." Biochemistry. 49(19): 4200-4207.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. und Viarengo, A. (2000).** "The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach." The Science of The Total Environment. 247(2-3): 295-311.
- Ceciliani, F., Giordano, A. und Spagnolo, V. (2002).** "The systemic reaction during inflammation: The acute-phase proteins." Protein and Peptide Letters. 9(3): 211-223.
- Ceron, J. J., Eckersall, P. D. und Martinez-Subiela, S. (2005).** "Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives." Veterinary Clinical Pathology. 34(2): 85-99.
- Coplen, T. B., Bohlke, J. K., De Bievre, P., Ding, T., Holden, N. E., Hopple, J. A., Krouse, H. R., Lamberty, A., Peiser, H. S. und Revesz, K. (2002).** "Isotope-abundance variations of selected elements (IUPAC Technical Report)." Pure and Applied Chemistry. 74(10): 1987-2017.
- Cray, C., Zaias, J. und Altman, N. H. (2009).** "Acute Phase Response in Animals: A Review." Comparative Medicine. 59(6): 517.
- Crichton, R. R., Wilmet, S., Legssyer, R. und Ward, R. J. (2002).** "Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells." Journal of Inorganic Biochemistry. 91(1): 9-18.
- De Domenico, I., McVey Ward, D. und Kaplan, J. (2008).** "Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders." Nature Reviews Molecular Cell Biology. 9(1): 72-81.
- del Castillo Busto, M. E., Montes-Bayon, M., Blanco-Gonzalez, E., Meija, J. und Sanz-Medel, A. (2005).** "Strategies To Study Human Serum Transferrin Isoforms Using Integrated Liquid Chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF Detection: Application to Chronic Alcohol Abuse." Analytical Chemistry. 77(17): 5615-5621.
- del Castillo Busto, M. E., Montes-Bayon, M. und Sanz-Medel, A. (2006).** "Accurate Determination of Human Serum Transferrin Isoforms: Exploring Metal-Specific Isotope Dilution Analysis as a Quantitative Proteomic Tool." Analytical Chemistry. 78(24): 8218-8226.



- del Castillo Busto, M. E., Montes-Bayon, M., Bettmer, J. und Sanz-Medel, A. (2008).** "Stable isotope labelling and FPLC-ICP-SFMS for the accurate determination of clinical iron status parameters in human serum." *Analyst*. 133(3): 379-384.
- del Castillo Busto, M. E., Meija, J., Montes-Bayón, M. und Sanz-Medel, A. (2009a).** "Diophantine analysis complements electrospray-Q-TOF data for structure elucidation of transferrin glycoforms used for clinical diagnosis in human serum and cerebrospinal fluid." *Proteomics*. 9(4): 1109-1113.
- del Castillo Busto, M. E., Montes-Bayón, M. und Sanz-Medel, A. (2009b).** "The potential of mass spectrometry to study iron-containing proteins used in clinical diagnosis." *Analytica Chimica Acta*. 634(1): 1-14.
- del Castillo Busto, M. E., Montes-Bayon, M., Garcia Alonso, J. I., Caruso, J. A. und Sanz-Medel, A. (2010).** "Novel HPLC-ICP-MS strategy for the determination of  $\beta$ 2-Transferrin, the biomarker of cerebrospinal fluid (CSF) leakage." *Analyst*. 135(7): 1538-1540.
- Duffy, L. K., Bowyer, R. T., Testa, J. W. und Faro, J. B. (1996).** "Acute Phase Proteins and Cytokines in Alaskan Mammals as Markers of Chronic Exposure to Environmental Pollutants." *American Fisheries Society Symposium*. 18: 809-813.
- Dufresne, M. M., Frouin, H., Pillet, S., Lesage, V., De Guise, S. und Fournier, M. (2010).** "Comparative sensitivity of harbour and grey seals to several environmental contaminants using in vitro exposure." *Marine Pollution Bulletin*. 60(3): 344-349.
- Durrant, S. F. (1993).** "Alternatives to All-Argon Plasmas in Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) - an Overview." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 347(10-11): 389-392.
- Eckersall, P. D. (2000).** "Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals." *Revue De Medecine Veterinaire*. 151(7): 577-584.
- Edler, M., Jakubowski, N. und Linscheid, M. (2005).** "Styrene oxide DNA adducts: quantitative determination using P-31 monitoring." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 381(1): 205-211.
- Edler, M., Jakubowski, N. und Linscheid, M. (2006).** "Quantitative determination of melphalan DNA adducts using HPLC - inductively coupled mass spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry*. 41(4): 507-516.
- El Hage Chahine, J.-M. und Pakdaman, R. (1995).** "Transferrin, a Mechanism for Iron Release." *European Journal of Biochemistry*. 230(3): 1102-1110.
- Eskelinen, E.-L., Tanaka, Y. und Saftig, P. (2003).** "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." *Trends in Cell Biology*. 13(3): 137-145.
- Fair, P. A. und Becker, P. R. (2000).** "Review of stress in marine mammals." *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)*. 7(4): 335-354.
- Fair, P. A., Hulsey, T. C., Varela, R. A., Goldstein, J. D., Adams, J., Zolman, E. S. und Bossart, G. D. (2006).** "Hematology, Serum Chemistry, and Cytology Findings from Apparently Healthy Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) Inhabiting the Estuarine Waters of Charleston, South Carolina." *Aquatic Mammals*. 32: 182-195.
- Fenn, J. (2002).** "Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began." *Journal of Biomolecular Techniques*. 13(3): 101.
- Fraenkel, E., Szabó, G., Lengyel, G., Jarčuška, P., Lazúrová, I., Dinya, E. und Fehér, J. (2009).** "Carbohydrate-deficient transferrin, a sensitive biomarker and diagnostic parameter in non-alcoholic fatty liver." *Clinical and Experimental Medical Journal*. 3(3): 479-486.

- Funke, C., King, D. P., Brotheridge, R. M., Adlung, D. und Stott, J. L. (1997).** "Harbor seal (*Phoca vitulina*) C-reactive protein (C-RP): purification, characterization of specific monoclonal antibodies and development of an immuno-assay to measure serum C-RP concentrations." Veterinary Immunology and Immunopathology. 59(1-2): 151-162.
- Gabay, C. und Kushner, I. (1999).** "Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation." The New England Journal of Medicine. 340(6): 448-454.
- Giusti, P., Schaumlöffel, D., Encinar, J. R. und Szpunar, J. (2005).** "Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 20(10): 1101-1107.
- Görg, A., Weiss, W. und Dunn, M. J. (2004).** "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics." PROTEOMICS. 4(12): 3665-3685.
- Grant, B. D. und Donaldson, J. G. (2009).** "Pathways and mechanisms of endocytic recycling." Nature Reviews Molecular Cell Biology. 10(9): 597-608.
- Grebe, M., Pröfrock, D., Kakuschke, A., Broekaert, J. A. C. und Prange, A. (2010).** "Metallomics approach for the identification of the iron transport protein transferrin in the blood of harbour seals (*Phoca vitulina*)." Metallomics. 2(10): 683 - 693.
- Grebe, M., Pröfrock, D., Kakuschke, A., Broekaert, J. A. C. und Prange, A. (2011).** "Absolute quantification of transferrin in blood samples of harbour seals using HPLC-ICP-MS." Metallomics. 3(2): 176-185.
- Griesel, S., Kakuschke, A., Siebert, U. und Prange, A. (2008).** "Trace element concentrations in blood of harbor seals (*Phoca vitulina*) from the Wadden Sea." Science of The Total Environment. 392(2-3): 313-323.
- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A. und Koopmans, S. J. (2005).** "Acute phase reaction and acute phase proteins." Journal of Zhejiang University Science. 6(11): 1045–1056.
- Hamano Nagaoka, M. und Maitani, T. (2009).** "Speciation of aluminium in human serum investigated by HPLC/high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS): Effects of sialic acid residues of the carbohydrate chain on the binding affinity of aluminium for transferrin." Journal of health science. 55(2): 161-168.
- Härkönen, T., Dietz, R., Reijnders, P., Teilmann, J., Harding, K., Hall, A., Brasseur, S., Siebert, U., Goodman, S. J. und Jepson, P. D. (2006).** "A review of the 1988 and 2002 phocine distemper virus epidemics in European harbour seals." Diseases of aquatic organisms. 68: 115-130.
- Hasselmeier, I., Fonfara, S., Driver, J. und Siebert, U. (2008).** "Differential Hematology Profiles of Free-Ranging, Rehabilitated, and Captive Harbor Seals (*Phoca vitulina*) of the German North Sea." Aquatic Mammals. 34: 149-156.
- Helander, A., Eriksson, G., Stibler, H. und Jeppsson, J.-O. (2001a).** "Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse." Clinical Chemistry. 47(7): 1225-1233.
- Helander, A., Fors, M. und Zakrisson, B. (2001b).** "Study of axis-shield new %CDT immunoassay for quantification of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum." Alcohol and Alcoholism. 36(5): 406-412.
- Helander, A. und Bergström, J. P. (2006).** "Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum using the Bio-Rad %CDT by HPLC test." Clinica Chimica Acta. 371(1-2): 187-190.

- Heumann, K. G. (2004).** "Isotope-dilution ICP–MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method?" Analytical and Bioanalytical Chemistry. 378(2): 318-329.
- Jeppsson, J. O., Kristensson, H. und Fimiani, C. (1993).** "Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol." Clinical Chemistry. 39(10): 2115-2120.
- Kaim, W. und Schwederski, B. (2004) 3. überarbeitet Auflage.** Bioanorganische Chemie zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen. B. G. Teuber Verlag / GWV Fachverlag GmbH, Stuttgart.
- Kakuschke, A., Valentine-Thon, E., Griesel, S., Fonfara, S., Siebert, U. und Prange, A. (2005).** "Immunological impact of metals in harbor seals (*Phoca vitulina*) of the North Sea." Environmental Science & Technology. 39(19): 7568-7575.
- Kakuschke, A. (2006).** Einfluss von Metallen auf das Immunsystem von Meeressäugern. Universität Hamburg Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Dissertation, Dr. rer. nat.: 219.
- Kakuschke, A. und Prange, A. (2007).** "The Influence of Metal Pollution on the Immune System - A Potential Stressor for Marine Mammals in the North Sea." International Journal of Comparative Psychology. 20(2): 179-193.
- Kakuschke, A., Valentine-Thon, E., Fonfara, S., Griesel, S., Rosenberger, T., Siebert, U. und Prange, A. (2008a).** "Metal-Induced Impairment of the Cellular Immunity of Newborn Harbor Seals (*Phoca vitulina*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 55(1): 129-136.
- Kakuschke, A., Valentine-Thon, E., Griesel, S., Rosenberger, T., Mundry, R., Siebert, U. und Prange, A. (2008b).** "Blood metal levels and metal-influenced immune functions of harbour seals in captivity." Marine Pollution Bulletin. 56(4): 764-769.
- Kakuschke, A., Erbsloeh, H. B., Griesel, S. und Prange, A. (2010a).** "Acute phase protein haptoglobin in blood plasma samples of harbour seals (*Phoca vitulina*) of the Wadden Sea and of the isle Helgoland." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 155(1): 67-71.
- Kakuschke, A., Valentine-Thon, E., Griesel, S., Gandrass, J., Pérez Luzardo, O., Domínguez Boada, L., Zumbado Peña, M., Almeida González, M., Grebe, M., Pröfrock, D., Erbsloeh, H.-B., Kramer, K., Fonfara, S. und Prange, A. (2010b).** "First Health and pollution study on harbor seals (*Phoca vitulina*) living in the German elbe estuary." Marine Pollution Bulletin. 60 (11): 2079-2086.
- Kakuschke, A., Gandrass, J., Pérez Luzardo, O., Domínguez Boada, L., Zaccaroni, A., Griesel, S., Grebe, M., Pröfrock, D., Erbsloeh, H.-B., Valentine-Thon, E., Prange, A. und Kramer, K. (2011).** "Post mortem health and pollution investigations – a pilot study on harbor seals (*Phoca vitulina*) of the isles Helgoland and Sylt." unpublished work.
- Kalmovarin, N., Friedrichs, W. E., O'Brien, H. V., Linehan, L. A., Bowman, B. H. und Yang, F. M. (1991).** "Extrahepatic Expression of Plasma-Protein Genes during Inflammation." Inflammation. 15(5): 369-379.
- Kleesiek, K., Kohse, K. P., Neumaier, M., Dibbelt, L., Geilenkeuser, W.-J. und Kruse, R. (2010).** Ringversuch Carbonhydrate Deficient Transferrin (CDT) DT2/10. Bonn, Referenzinstitut für Bioanalytik.
- Koolman, J. und Röhm, K.-H. (2009)** Taschenatlas Biochemie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Kuenstl, L., Griesel, S., Prange, A. und Goessler, W. (2009).** "Arsenic speciation in bodily fluids of harbor seals (*Phoca vitulina*) and harbor porpoises (*Phocoena phocoena*)." Environmental Chemistry. 6(4): 319-327
- Kumagai, S. (2004).** Seasonal differences in physiology of captive steller seal lions (*Eumetopias jubatus*) in response to short-term low energy intake. University of British Columbia The faculty of graduate studies - Zoology. Master thesis, Master of Science: 95.
- Lamprecht, J. (1999) Neubearb. Aufl.** Biologische Forschung: von der Planung bis zur Publikation. Filander Verlag, Fürth.
- Larsen, E. H. und Ludwigsen, M. B. (1997).** "Determination of iodine in food-related certified reference materials using wet ashing and detection by inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 12(4): 435-439.
- Leonhard, P., Pepelnik, R., Prange, A., Yamada, N. und Yamada, T. (2002).** "Analysis of diluted sea-water at the ng L<sup>-1</sup> level using an ICP-MS with an octopole reaction cell." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 17(3): 189-196.
- Lester, P. J. und Hubbard, S. J. (2002).** "Comparative bioinformatic analysis of complete proteomes and protein parameters for cross-species identification in proteomics." Proteomics. 2(10): 1392 - 1405.
- Link, A. J. und LaBear, J. (2010)** Proteomics-Methoden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Loewe, P., Becker, G., Brockmann, U., Dick, S., Frohse, A., Herrmann, J., Klein, B., Klein, H., Nies, H., Schmolke, S., Schrader, D., Schulz, A., Theobald, N. und Weigelt, S. (2006).** Nordseezustand 2004. Berichte des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie. Nr. 40. Hamburg, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH): 217.
- Loewe, P. (2009).** System Nordsee: Zustand 2005 im Kontext langzeitlicher Entwicklungen. Berichte des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie. Nr. 44. Hamburg, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH): 261.
- Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W., (Hrsg.) 2. Auflage (2006).** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, München.
- MacGillivray, R. T. A., Moore, S. A., Chen, J., Anderson, B. F., Baker, H., Luo, Y., Bewley, M., Smith, C. A., Murphy, M. E. P., Wang, Y., Mason, A. B., Woodworth, R. C., Brayer, G. D. und Baker, E. N. (1998).** "Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release." Biochemistry. 37(22): 7919-7928.
- Makino, T., Nakamura, K. und Takahara, K. (2011).** "A high-performance liquid immunoaffinity chromatography method for determining transferrin-bound iron in serum." Clinica Chimica Acta. In Press, Corrected Proof.
- Marchetti, V., Lubas, G., Lombardo, A., Corazza, M., Guidi, G. und Cardini, G. (2010).** "Evaluation of Erythrocytes, Platelets, and Serum Iron Profile in Dogs with Chronic Enteropathy." Veterinary Medicine International. 2010: doi: 10.4061/2010/716040.
- Mazzaro, L. M., Dunn, J. L., St. Aubin, D. J., Andrews, G. A. und Chavey, P. S. (2004).** "Serum indices of body stores of iron in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and their relationship to hemochromatosis." Zoo Biology. 23(3): 205-218.
- Meija, J. und Yang, L. (2006).** "Calculations of double spike isotope dilution results revisited." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 21: 1294-1297.
- Mischak, H., Coon, J. J., Novak, J., Weissinger, E. M., Schanstra, J. P. und Dominiczak, A. F. (2009).** "Capillary electrophoresis–mass spectrometry as a powerful tool in biomarker

- discovery and clinical diagnosis: An update of recent developments." Mass Spectrometry Reviews. 28(5): 703-724.
- Mos, L., Morsey, B., Jeffries, S. J., Yunker, M. B., Raverty, S., De Guise, S. und Ross, P. S. (2006).** "Chemical and biological pollution contribute to the immunological profiles of free-ranging harbor seals." Environmental Toxicology and Chemistry. 25(12): 3110-3117.
- Murata, H., Shimada, N. und Yoshioka, M. (2004).** "Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview." The Veterinary Journal. 168(1): 28-40.
- Murawaki, Y., Sugisaki, H., Yuasa, I. und Kawasaki, H. (1997).** "Serum carbohydrate-deficient transferrin in patients with nonalcoholic liver disease and with hepatocellular carcinoma." Clinica Chimica Acta. 259(1-2): 97-108.
- Niessen, W. M. A. (1999)** Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. Marcel Dekker Inc., New York
- Nyman, M., Bergknut, M., Fant, M. L., Raunio, H., Jestoi, M., Bengs, C., Murk, A., Koistinen, J., Bäckman, C., Pelkonen, O., Tysklind, M., Hirvi, T. und Helle, E. (2003).** "Contaminant exposure and effects in Baltic ringed and grey seals as assessed by biomarkers." Marine Environmental Research. 55(1): 73-99.
- Oda, R. P., Prasad, R., Stout, R. L., Coffin, D., Patton, W. P., Kraft, D. L., O'Brien, J. F. und Landers, J. P. (1997).** "Capillary electrophoresis-based separation of transferrin sialoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome." Electrophoresis. 18(10): 1819-1826.
- Pereira Navaza, A., Encinar, J. R. und Sanz-Medel, A. (2007).** "Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorus standard and element mass spectrometry." Angewandte Chemie International Edition. 46(4): 569-571.
- Pereira Navaza, A., Encinar, J. R., Carrascal, M., Abian, J. und Sanz-Medel, A. (2008).** "Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: Its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures." Analytical Chemistry. 80(5): 1777-1787.
- Petersen, H. H., Nielsen, J. P. und Heegaard, P. M. H. (2004).** "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry." Veterinary Research. 35(2): 163-187.
- Pfeifer, T. (2010).** Eine neue Niedrigfluss-Ionenquelle für die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS). Westfälische Wilhelms-Universität Münster Fachbereich Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Inauguraldissertation, Dr. rer nat: 198.
- Prange, A. und Pröfrock, D. (2008).** "Chemical labels and natural element tags for the quantitative analysis of bio-molecules." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 23(4): 432-459.
- Pröfrock, D. und Prange, A. (2009).** "Compensation of gradient related effects when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides." Journal of Chromatography A. 1216(39): 6706-6715.
- Rehm, H. (2006) 5. Auflage.** Proteinbiochemie/Proteomics. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Reijnders, P. J. H., Basseur, S. M. J. M., Borchardt, T., Camphuysen, K., Czeck, R., Gilles, A., Jensen, L. F., Leopold, M., Lucke, K., Ramdohr, S., Scheidat, M., Siebert, U. und Teilmann, J. (2009).** Marine Mammals. Wadden Sea Ecosystem No.25, Quality Status report 2009, Thematic Report No. 20. Wilhelmshaven, Germany, Common Wadden Sea Secretariat, Trilateral Monitoring and Assessment Group.

- Rienitz, O., Schiel, D., Güttler, B., Koch, M. und Borchers, U. (2007).** "A convenient and economic approach to achieve SI-traceable reference values to be used in drinking-water interlaboratory comparisons." Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement. 12(12): 615-622.
- Rodriguez-Castrillon, J. A., Moldovan, M., Ruiz Encinar, J. und Garcia Alonso, J. I. (2008).** "Isotope pattern deconvolution for internal mass bias correction in the characterisation of isotopically enriched spikes." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 23(3): 318-324.
- Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J. M., García Alonso, J. I. und Sanz-Medel, A. (2005).** "Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review." Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 60(2): 151-207.
- Roepstorff, P. und Fohlman, J. (1984).** "Letter to the editors." Biological Mass Spectrometry. 11(11): 601-601.
- Rosenfeld, H., Lassen, S. und Prange, A. (2009).** "Characterization of Haptoglobin in the Blood Plasma of Harbor Seals (*Phoca vitulina*)." Journal of Proteome Research. 8(6): 2923-2932.
- Rosman, K. J. R. und Taylor, P. D. P. (1998).** "Isotopic Compositions of Elements 1997." Journal of Physical and Chemical Reference Data. 27: 1275-1288.
- Ross, P. S., De Swart, R. L., Reijnders, P. J. H., Van Loveren, H., Vos, J. G. und Osterhaus, A. D. M. E. (1995).** "Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody-responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea." Environmental Health Perspectives. 103(2): 162-167.
- Ross, P. S., De Swart, R. L., Timmerman, H. H., Reijnders, P. J. H., Vos, J. G., Van Loveren, H. und Osterhaus, A. D. M. E. (1996).** "Suppression of natural killer cell activity in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed Baltic Sea herring." Aquatic Toxicology. 34(1): 71-84.
- Ross, P. S. (2002).** "The role of immunotoxic environmental contaminants in facilitating the emergence of infectious diseases in marine mammals." Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 8(2): 277 - 292.
- Rottmann, L. und Heumann, K. G. (1994).** "Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. 350(4): 221-227.
- Sanz-Medel, A., Montes-Bayón, M. und Luisa Fernández Sánchez, M. (2003).** "Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics." Analytical and Bioanalytical Chemistry. 377(2): 236-247.
- Sanz-Medel, A., Montes-Bayón, M., del Rosario Fernández de la Campa, M., Encinar, J. und Bettmer, J. (2008).** "Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics." Analytical and Bioanalytical Chemistry. 390(1): 3-16.
- Sanz-Nebot, V., Benavent, F. und Barbosa, J. (2002).** "Liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis combined approach for separation and characterization of multicomponent peptide mixtures - Application to crude products of leuprolide synthesis." Journal of Chromatography A.
- Schlabach, M. R. und Bates, G. W. (1975).** "The synergistic binding of anions and Fe<sup>3+</sup> by transferrin. Implications for the interlocking sites hypothesis." Journal of Biological Chemistry. 250(6): 2182-2188.
- Sesi, N. N., Mackenzie, A., Shanks, K. E., Yang, P. Y. und Hieftje, G. M. (1994).** "Fundamental Studies of Mixed-Gas Inductively-Coupled Plasmas." Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 49(12-14): 1259-&.
- Siebert, U., Wohlsein, P., Lehnert, K. und Baumgärtner, W. (2007).** "Pathological findings in harbour seals (*Phoca vitulina*): 1996-2005." Journal of Comparative Pathology. 137(1): 47-58.

- Siethoff, C., Feldmann, I., Jakubowski, N. und Linscheid, M. (1999).** "Quantitative determination of DNA adducts using liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry. 34(4): 421-426.
- Streyer, L. (1999) 4. Auflage.** Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sun, H., Cox, M. C., Li, H. und Sadler, P. J. (1997).** Rationalisation of metal binding to transferrin: Prediction of metal-protein stability constants. Metal Sites in Proteins and Models, Springer Berlin / Heidelberg. 88: 71-102.
- Svantesson, E., Pettersson, J. und Markides, K. E. (2002).** "The use of inorganic elemental standards in the quantification of proteins and biomolecular compounds by inductively coupled plasma spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 17(5): 491-496.
- Swart, C., Rienitz, O. und Schiel, D. (2011).** "Alternative approach to post column online isotope dilution ICP-MS." Talanta. 83(5): 1544-1551.
- Tanner, S. D., Baranov, V. I. und Bandura, D. R. (2002).** "Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review." Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 57(9): 1361-1452.
- Turner, P. J., Mills, D. J., Schröder, E., Iapitajs, G., Jung, G., Iacone, L. A., Haydar, D. A. und Montaser, A. (1998).** 6. Instrumentation for low- and high-resolution ICPMS. In: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Wiley-VCH, Inc., New York. 421-501.
- Turner, P. J. und Montaser, A. (1998).** 4. Plasma generation in ICPMS. In: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Wiley-VCH, Inc., New York. 265-334.
- Vanhaecke, F. und Köllensperger, G. (2003).** 5.3 Detection by ICP-Mass Spectrometry. In: Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 281-312.
- Walczyk, T. und von Blanckenburg, F. (2002).** "Natural Iron Isotope Variations in Human Blood." Science. 295(5562): 2065-2066.
- Weigel, P. H. und Yik, J. H. N. (2002).** "Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1572(2-3): 341-363.
- Weijs, L., Das, K., Siebert, U., van Elk, N., Jauniaux, T., Neels, H., Blust, R. und Covaci, A. (2009).** "Concentrations of chlorinated and brominated contaminants and their metabolites in serum of harbour seals and harbour porpoises." Environment International. 35(6): 842-850.
- Weinberg, E. D. (2010).** "The hazards of iron loading." Metallomics. 2(11): 732-740
- Westermeier, R., Naven, T. und Höpker, H.-R. (2008)** Proteomics in Practice. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Westmann-Brinkmalm, A. und Brinkmalm, G. (2009).** 2. A Mass Spectrometer's building blocks. In: Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications. John Wiley Sons, Inc., Hoboken. 15-36.
- Wind, M., Wesch, H. und Lehmann, W. D. (2001).** "Protein phosphorylation degree: Determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry." Analytical Chemistry. 73(13): 3006-3010.
- Wu, L., Wu, J., Zhang, J., Zhou, Y., Ren, G. und Hu, Y. (2008).** "A simple method for obtaining transferrins from human plasma and porcine serum: Preparations and properties." Journal of Chromatography B. 867(1): 62-68.

- Yamada, N., Takahashi, J. und Sakata, K. (2002).** "The effects of cell-gas impurities and kinetic energy discrimination in an octopole collision cell ICP-MS under non-thermalized conditions." Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 17(10): 1213-1222.
- Yamashita, K., Ideo, H., Ohkura, T., Fukushima, K., Yuassa, I., Ohno, K. und Takeshita, K. (1993).** "Sugar Chains of Serum Transferrin from Patients with Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrome." The Journal of Biological Chemistry. 268(8): 5783-5789.
- Zinn, N., Hahn, B., Pipkorn, R. d., Schwarzer, D. und Lehmann, W. D. (2009).** "Phosphorus-Based Absolutely Quantified Standard Peptides for Quantitative Proteomics." Journal of Proteome Research. 8(10): 4870-4875.

### Internetlinks

- [1] **Stepmap:** <http://www.stepmap.de/karte/nordsee-deutsche-bucht-3-141095> (21.02.2011)
- [2] **Mascot-Suche:** <http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1> (05.06.2008)
- [3] **MS-Blast:** <http://www.uniprot.org/> (11.01.2011)
- [4] **Mann-Whitney U-Test:** <http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html> (10.11.2010)
- [5] **Protein-MW-Berechnung:** <http://www.encorbio.com/protocols/Prot-MW.htm> (09.11.2009)
- [6] **Glykan-Suche:** <http://functionalglycomics.org/glycomics/molecule/jsp/carbohydrate/searchByMw.jsp> (16.12.2010)
- [7] **Sequenz-Alignment:** [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) (26.05.2009)  
<http://www.uniprot.org/> (16.03.2011)
- [8] **Referenzbereich Tf human:** [http://www.fennerlabor.de/index.php?id=leistungsverzeichnis&tx\\_laboratoryeditor\\_pi1\[s\\_uid\]=1111](http://www.fennerlabor.de/index.php?id=leistungsverzeichnis&tx_laboratoryeditor_pi1[s_uid]=1111) (18.01.2011)



## 7. Anhang

**Tabelle A1:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Gefahreinstufung und Sicherheitshinweisen nach GHS ("Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals")

Piktogramme "Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals" (GHS)



GHS 01 GHS 02 GHS 03 GHS 04 GHS 05 GHS 06 GHS 07 GHS 08 GHS 09

### Chemikalien

Einstufung nach GHS

---

#### 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (19:1)

Gefahr GHS 08, GHS 06  
 Karzinogenität (Kat. 1B), Keimzell-Mutagenität (Kat.1B), Reproduktionstoxizität (Kat.2),  
 Akute Toxizität (Kat.3), Spez. Zielorgane-Toxizität - wiederholte Exposition (Kat.1),  
 Augenreizung (Kat.2), Reizwirkung a. d. Haut (Kat.2), Sensibilisierung d. Hautkontakt (Kat.1)  
 H372, H319, H315, H301, H312, H317, H332, H340, H350, H361f  
 P201, P208, P301+P310, P305+P351+P338, P308+P313

---

#### Aceton, Optigrade® (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>)

Gefahr GHS 02, GHS 07  
 Entz. Flüssigkeit (Kat.2), Augenreizung (Kat. 2), Spez. Zielorgane Tox.-1x Exp. (Kat.3)  
 H225, H319, H336, EUH066  
 P210, P261, P305+P351+P338

---

#### Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN), Suprapure®

Gefahr GHS 02, GHS 05  
 Entzündbare Flüssigkeiten (Kat.2), Akute Tox., Einatmen (Kat.4), Haut (Kat.4), Oral (Kat.4)  
 Augenreizung (Kat.2)  
 H225, H319, H302, H312, H332  
 P210, P280, P305+P351+P338

---

#### Agarose

*Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

---

#### Ameisensäure, Suprapure®

Gefahr GHS 05  
 Ätzwirkung a.d. Haut (Kat. 1A)  
 H314  
 P280, P305+P351+P338, P310

---

#### Ammoniaklösung, 25%, Suprapure®

Gefahr GHS 05, GHS 07, GHS 09  
 Ätzwirkung auf die Haut (Kat.1B), Atemwegsreizung, akut Gewässergefährdend (Kat.1)  
 H314, H335, H400  
 P280, P273, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P309, P310

---

#### Ammoniumhydrogencarbonat (NH<sub>4</sub>COOH)

Achtung GHS 07  
 Akute Tox., Oral (Kat.4)  
 H302

---

#### APS; Ammoniumpersulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)

Gefahr GHS 08, GHS 07, GHS 03  
 Ox. Feststoff (Kat.3), Akute Tox. (Kat.4), Augenreizung (Kat.2), Spez. Ziello.-Tox -1x Exp. (Kat.3)  
 Reizwirkung a. d. Haut (Kat.2), Atemsensibilisierung (Kat.1), Sensib. d. Hautkontakt (Kat.1)  
 H319, H315, H272, H302, H317, H334, H335  
 P220, P261, P280, P305+P351+P338, P342+P311

---

**Argon 5.0 (99.999%)**

Achtung GHS 04  
 Unter Druck stehende Gase - verdichtet Gase  
 H280  
 P403

**Bio-Lyte® 3/10**

Achtung GHS 07  
 Reizw. a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat. 2), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)  
 H315, H319, H335  
 P305+P351+P338

**Bis-Tris, BioUltra (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>)**

Achtung GHS 07  
 Reizwirkung a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat.2), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)  
 H315, H319, H335  
 P261, P305+P351+P338

**Bradford Reagenz**

Gefahr GHS 05, GHS 07  
 Reizwirkung a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat.2), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)  
 H314, H312, H302, H332, H334  
 P261, P262, P280, P305+P351+P338, P301+P312

**Bromphenol Blau (C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>CC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>)**

*Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

**BSA (bovine serum albumine)**

*Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

**1-Butanol (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH)**

Gefahr GHS 02, GHS 07, GHS 05  
 Akute Tox., Oral (Kat.4), Entzündbare Flüssigkeit (Kat.3), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)  
 Reizwirkung a.d. Haut (Kat.2), Schwere Augenschäden (Kat.1)  
 H315, H226, H302, H318, H335, H336  
 P261, P280, P305+P351+338

**CHAPS; 3-((3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio)-1-propansulfonat)**

Achtung GHS 07  
 Reizw. a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat. 2)  
 H315, H319  
 P305+P351+P338

**Chelex® 100**

*Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

**Coomassie® Brilliant Blue R-250**

Gefahr GHS 06, GHS 02  
 Entzündbare Flüssigkeiten (Kat.2), Akute Tox., Einatmen (Kat.3), Haut (Kat.3), Oral (Kat.3)  
 H225, H302, H312, H332, H314  
 P210, P280, P305+P351+P338

**Dextransulfat, Na-Salz, von Leuconostoc ssp.; Mr~500000, BioChemika**

*Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

**DTT; Dithiothreitol (HSCH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>SH)**

Achtung GHS 07  
 Akut. Tox., Oral (Kat.4), Reizw. a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat.2),  
 Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)  
 H302, H315, H319, H335  
 P261, P305+P351+P338

**Eisen-III-chloride Hexahydrat p.a. (FeCl<sub>3</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O)**

Gefahr GHS 05, GHS 07  
 Akute Toxizität, Oral (Kategorie 4), Ätzwirkung auf die Haut (Kategorie 1B)  
 H302, H314  
 P280, P305+P351+P338, P310

**<sup>54</sup>Fe-Isotop und <sup>57</sup>Fe-Isotop als Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Achtung GHS 07

Augenreizung (Kat. 2), Spezifische Zielorgane – Toxizität - einmalige Exposition (Kat. 3)

H315, H319, H335

P261, P305+P351+P338

**Element Standards, CertiPUR®, 1000 mg/L: Fe, Ge, Cs, Co, Y; rückführbar auf SRM von NIST**

Achtung GHS 07

Augenreizung (Kategorie 2), Reizwirkung auf die Haut (Kategorie 2)

H315, H319

P305+P351+P338

**ERM®-470k/IFCC zertifiziertes Referenzmaterial, humanes Serum***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Essigsäure (hochrein)**

Gefahr GHS 05, GHS 02

Ätzwirkung auf die Haut (Kategorie 1A), Entzündbare Flüssigkeit (Kategorie 3)

H314, H226

P280, P305+P351+P338, P310

**Ethanol, Suprapure®**

Gefahr GHS 02

Entzündbare Flüssigkeit (Kat.2)

H225

P210

**Glycerol ((CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>)***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Glycin (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Harnstoff (CO(NH<sub>2</sub>))***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***HCCA, α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (HOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH=C(CN)COOH)**

Achtung GHS 07

Reizw. a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat. 2), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)

H315, H319, H335

P261, P305+P351+P338

**IAA, Iodoacetamid (ICH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>)**

Gefahr GHS 08, GHS 06

Akute Tox., Oral (Kat. 3), Atemsensibilisierung (Kat.1), Sensibilisierung b. Hautkontakt (Kat. 1)

H301, H317, H334

P261, P280, P301+P310, P342+P311

**Kaliumphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Magnesiumchlorid Hexahydrat, BioChemika Ultra (MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O)***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Methanol (CH<sub>3</sub>OH)**

Gefahr GHS 02, GHS 08, GHS 06

Entzündbare Flüssigkeiten (Kat.2), Spez. Zielorgane-Tox. - 1x Exp. (Kat.1),

Akute Tox., Einatmen (Kat.3), Haut (Kat.3), Oral (Kat.3)

H225, H319, H302, H312, H332

P210, P280, P305+P351+P338

**Mineralöl, Biotechnology grade***Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

**Natriumcarbonat, wasserfrei, Suprapure® (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)**

Achtung GHS 07  
 Augenreizung (Kategorie 2)  
 H319  
 P305+P351+P338

**ortho-Phosphorsäure**

Gefahr GHS 05, GHS 07  
 Akute Tox., Oral (Kat.4), Ätzwirkung auf die Haut (Kat. 1B)  
 H302, H314  
 P280, P305+P351+P338, P310

**PageRuler® (MW-Marker 10-170 kDa)**

enthaltenen Gefahrstoffe: 62,5 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 2% SDS, 10 mM DTT,  
 1 mM NaN<sub>3</sub>, 33% Glycerol

Achtung GHS 05  
 Reizw. a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat. 2), Akute Tox., Haut (Kat.4), Oral (Kat.4)  
 H302, H312, H315, H319  
 P280, P305+P351+P338

**Peptid Calibration Standard 2 (Angiotensin II, Angiotensin I, Substanz B, Bombesin, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, Somatostatin 28)**

*Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

**PNGase F (Peptid N-Glykosidase aus *Flavobacterium meningosepticum*)**

*Kein gefährlicher Stoff laut GHS*

**Protein Calibration Standard 1 (Trypsinogen, Protein A, BSA)**

Gefahr GHS 08, GHS 07  
 Atemwegssensibilisierung (Kat.1), Akute tox., Oral (Kat.4)  
 H334, H302  
 P261, P264, P270, P285, P301+P312. P304+P341

**Salpetersäure, 65%, ultrapure (HNO<sub>3</sub>)**

Gefahr GHS 05, GHS 03  
 Ätzwirkung auf die Haut (Kategorie 1A), Oxidierende Flüssigkeit (Kategorie 3)  
 H272, H314  
 P280, P305+P351+P338, P310

**SDS (sodium dodecyl sulfate), Natriumdodecylsulfat**

Gefahr GHS 02, GHS 06  
 Entzündbare Feststoffe (Kat.1), Akute Tox., Haut (Kat.3), Akute Tox., Oral (Kat.4),  
 Reizwirkung a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat.2), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)  
 H228, H302, H311, H315, H318, H335  
 P210, P261, P280, P305+P351+P338, P312

**Sinapinsäure, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OHC<sub>3</sub>H<sub>2</sub>OOH)**

Achtung GHS 07  
 Reizw. a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat. 2), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)  
 H315, H319, H335  
 P261, P305+P351+P338

**TEMED; N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)**

Gefahr GHS 02, GHS 07, GHS 05  
 Entzündbare Flüssigkeiten (Kat.2), Ätzwirkung a.d. Haut (Kat.1B), Akute Tox., Einatmen (Kat.4)  
 Akute Tox., Oral (Kat. 4)  
 H225, H314, H302, H332  
 P210. P280, P305+P351+P338

**TFA, Trifluoressigsäure (CF<sub>3</sub>COOH), Suprapure®**

Gefahr GHS 07, GHS 05  
 Ätzwirkung a.d. Haut (Kat.1A), chron. Aquat.Tox. (Kat.3), Akute Tox., Einatmen (Kat.4)  
 H314, H332, H412  
 P273, P280, P305+P351+P338

**Transferrin bovine (holo)***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Transferrin human***Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Tris-Base (Trizma® base)**

Achtung GHS 07

Reizwirkung a. d. Haut (Kat.2), Augenreizung (Kat.2), Spez. Zielorgane-Tox. -1x Exp. (Kat.3)

H315, H319, H335

P261, P305+P351+P338

**Trypsin**

Gefahr GHS 08, GHS 07

Augenreizung (Kat.2), Spez. Zielorgane-Tox.-1x Exp. (Kat.3), Reizwirkung a. d. Haut (Kat.2),

Atemsensibilisierung (Kat.1)

H319, H315, H334, H335

P261, P305+P351+P338, P342+311

**Wasserstoff 5.0 (99.999%)**

Gefahr GHS 04, GHS 02

Unter Druck stehende Gase - verdichtet Gase, Entzündbare Gase

H220, H280

P210, P377, P381, P403

 **$\alpha(2 \rightarrow 3,6,8,9)$ Neuraminidase von *Arthrobacter ureafaciens****Kein gefährlicher Stoff laut GHS***Savitzky-Golay Filter:****Gleichung 28:** Polynom 2. Ordnung / 15 Datenpunkten

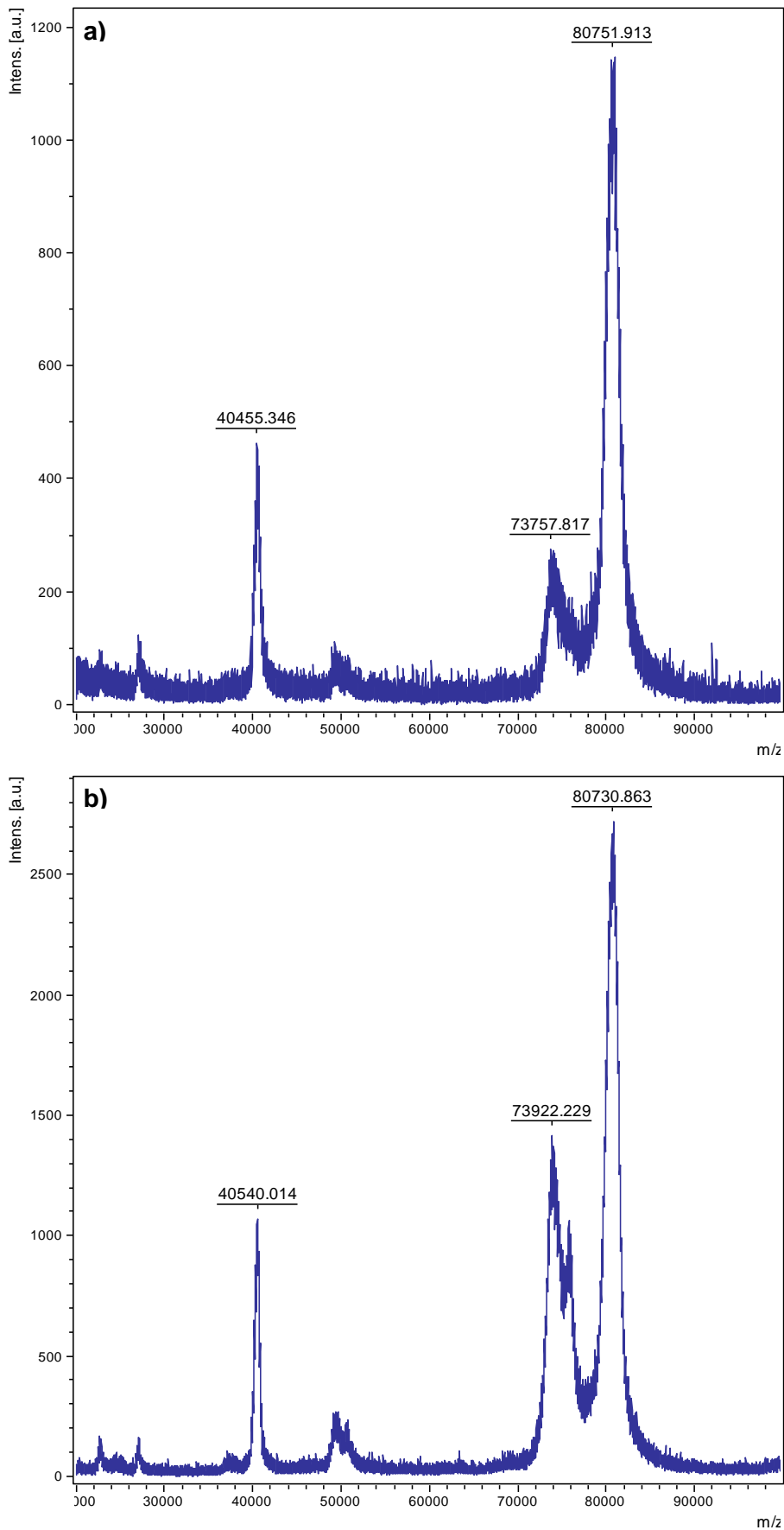
$$y_t = \left( \begin{array}{l} -253x_{t-12} - 138x_{t-11} - 33x_{t-10} + 62x_{t-9} + 147x_{t-8} + 222x_{t-7} + 287x_{t-6} + 343x_{t-5} + 387x_{t-4} \\ + 442x_{t-3} + 447x_{t-2} + 462x_{t-1} + 467x_t + 462x_{t+1} + 447x_{t+2} + 442x_{t+3} + 387x_{t+4} + 343x_{t+5} \\ + 287x_{t+6} + 222x_{t+7} + 147x_{t+8} + 62x_{t+9} - 33x_{t+10} - 138x_{t+11} - 253x_{t+12} \end{array} \right)$$

Die geglättete Intensität zum Zeitpunkt  $t$  entspricht  $y_t$ . Zur Berechnung werden die gemessenen Intensitäten  $x$  zum Zeitpunkt  $t$  mit den 12 vorherigen und den 12 nachfolgenden Zeitpunkten verwendet.

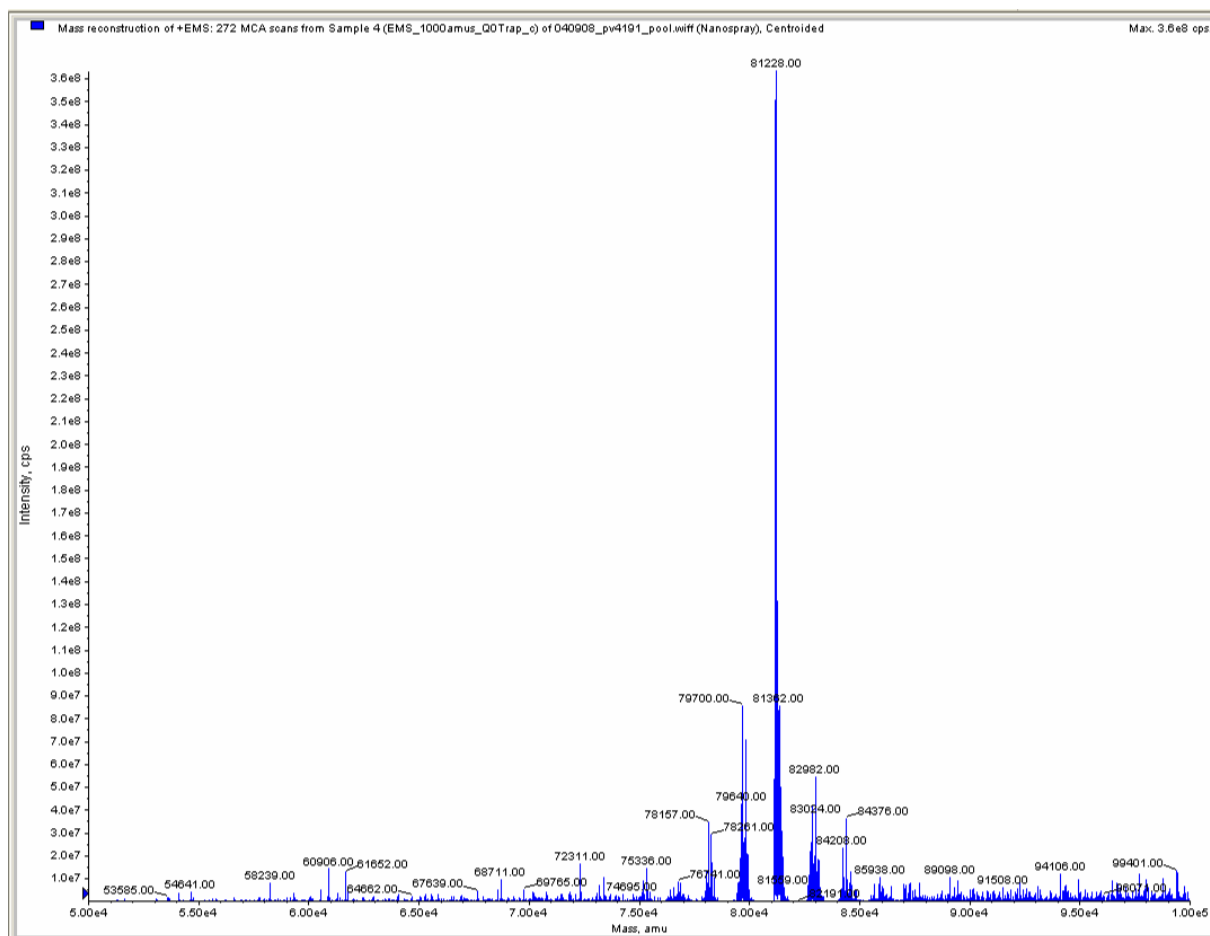
**Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis:****Gleichung 33:** Peak-Peak S/N

$$S/N = \frac{h_{\text{Signal}}}{(\text{Max}_{\text{Noise}} - \text{Min}_{\text{Noise}})}$$

Die Differenz aus dem Maximum des Untergrundrauschens  $\text{Max}_{\text{Noise}}$  und dem Minimum des Rauschen  $\text{Min}_{\text{Noise}}$  wird durch die Signalthöhe  $h_{\text{Signal}}$  geteilt.



**Abbildung A1:** MALDI-TOF-MS Spektrum (Sinapinsäure, linearer Modus) **a)** der Tf-Glykoform  $S_7$  und **b)** der Tf-Glykoform  $S_8$  des Tieres P.v. 4191 nach der SAX-HPLC-ICP-MS

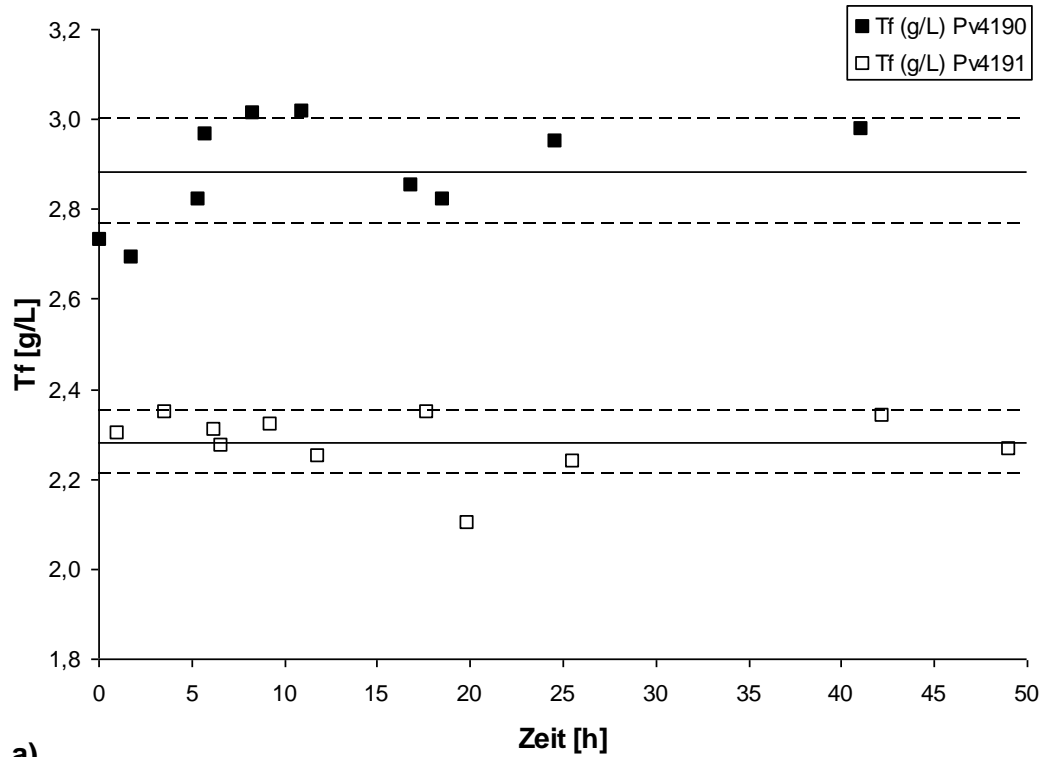


**Abbildung A2:** Ergebnis der Daten-Entfaltung des ESI-QTrap-MS-Protein-Spektrums der gepoolten Tf-Glykoform aus der HPLC-ICP-MS Fraktionierung vom Plasma des Tieres P.v. 4190

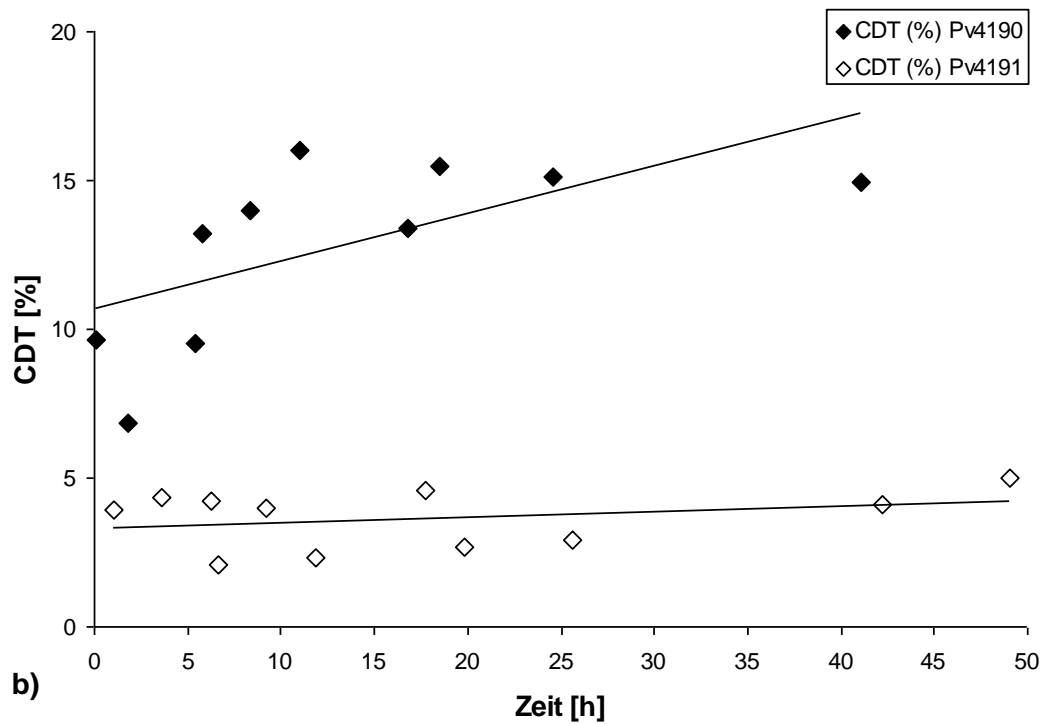
1	MRPAURALLACAVLGLCLADPERTURWCTISTHEANKCAFRENVLRLILES--GPFVSCVKKTSNMDCKA	69	Q29443	TRFE_BOVIN
1	-----VAQKTURWCTISNQEANKCSSFRENMSKAVKN--GPLVSCVKKSSYLDCKA	50	P09571	TRFE_PIG
1	MRLAIRALLACAVLGLCL--AEQTVRWCTVSMHEVSKCASFRDSMKSIVPA--PPLVACVKKTSYLECKA	67	P27425	TRFE_HORSE
1	MRLAUGALLVCAVLGLCLAVDPKTURWCAVSEHEATKQCSFRDHMSKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCKA	70	P02787	TRFE_HUMAN
	...*****: * : *_** ***: : : : * *:****: *:::***:			
70	ISNNEADAVTLGGLVVEAGLKPNNLKPVAEFGTKDNPQTHYVAVAUUVKGDTDPKLNELRGGKSCHTG	139	Q29443	TRFE_BOVIN
51	IRDKLADAVTLGGLVVEAGLAPYMLKPVAEFGYQKDNQTHYVAVAUUVKGSNFPQNNQLQGGKSCHTG	120	P09571	TRFE_PIG
68	IADNEADAVTLGGLVVEAGLSPYNLKPVAEFGSKTEPQTHYVAVAUUVKKNFNQNLQGGKSCHTG	137	P27425	TRFE_HORSE
71	IAANEADAVTLGGLVVEAGLAPMNLKPVAEFGSKEDPQTFYVAVAUUVKGDSDGFQNNQLRGGKSCHTG	140	P02787	TRFE_HUMAN
	* : *****_*_*_* : * * : *****_*_*_* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
140	LGRSAGWNIIPMAGLKYELPDPQESIQRAAAMFFSASCVPACADQSSFPKLCQLCAGKGTDKCACSNHEPYF	209	Q29443	TRFE_BOVIN
121	LGRSAGWIIPMGLLYDQLPEPRKPEKAVASFFSSSCVPCADPUNFPKLCQQCAGKGAECCACSNHEPYF	190	P09571	TRFE_PIG
138	LGRSAGWNIIPGLLYVQLPEPRESLQKAVSNFFAGSCVPCADRTAVPMLCQLCVGKGTDKCACSNHEPYF	207	P27425	TRFE_HORSE
141	LGRSAGWNIIPGLLYCDLPEPRKPLEKAVAMFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPG----CGCSTLNQYF	205	P02787	TRFE_HUMAN
	*****_*_*_* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
210	GYSGAFKCLMEGAGDVAFVKHSTVFDMLPNPEDRKNYELLCGDNTKRSUDDYQECYLAMVPSHAAUVARTV	279	Q29443	TRFE_BOVIN
191	GYAGAFNCKLEDAGDVAFVKHSTVLEMLPKADRDQYELLCRDNTRRPVDDYENCYLAQVPSHAAUVARSV	260	P09571	TRFE_PIG
208	GYSGAFKCLADGAGDVAFVKHSTVLEMLPQEARDEYVQLCRDNTKRSUDDYQECYLASIPSHAAUVARSV	277	P27425	TRFE_HORSE
206	GYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFEMLANKADRDQYELLCLDNTREKPVDEYKCHLAQVPSHAAUVARSV	275	P02787	TRFE_HUMAN
	** : *			
280	GKEDVIWELLNHAQEHFGKDKPDPNFQLFQSPHGKDLLFKDSANGFLKIPSKMDFELYLYEYVUTALQML	349	Q29443	TRFE_BOVIN
261	DGQEDSIWELLNQAQEHFGRDKSPDFQLFSSSHGKDLLFKDSANGFLKIPSKMDSLYLYGYVUTALRML	330	P09571	TRFE_PIG
278	DGKEDLIWELLNQAQEHFQTEKSKDFHLFSSPHGKDLLFKDSANGFLRIPPAMDITWLYLYEYVUTAIRML	347	P27425	TRFE_HORSE
276	GKEDLIWELLNQAQEHFGRDKSKFQLFSSPHGKDLLFKDSANGFLKVPFPMDARMYLYEYVUTAIRML	345	P02787	TRFE_HUMAN
	. : *			
350	RESKPPSSKDEC-HVKWC&IGHQERTKCDRWSGFSGGAIECETAEANTEECIAKIMKGEADAMSLDGGYLV	418	Q29443	TRFE_BOVIN
331	REEISPPSSSKNECKKURWC&IGHQERTKCDRWSGFSGGAIECETAEANTEECIAKIVKGEADAMSLDGGYI	400	P09571	TRFE_PIG
348	REDIRPEVPKDECKKVKWC&IGHHEKVKCDEWSVNSGGNIECESAQSTEDCIAKIVKGEADAMSLDGGFI	417	P27425	TRFE_HORSE
346	REGTCPEAPTECKPVKWC&ALSHERLKCDEWSVNSVUGKIECVSSETTEECIAKIMNGEADAMSLDGGFV	415	P02787	TRFE_HUMAN
	** : *			
419	YIAGKGLVPLAENYKTE-GESECKNTEKGYLAVAAVK-TSDANINWMLKDKKSCHTAVDETAGWNIIP	486	Q29443	TRFE_BOVIN
401	YIAGKGLVPLAENYKTE-GENCVNTEKGYLAVAAVKSSGPDLMWMLKGGKSCHTAVDETAGWNIIP	469	P09571	TRFE_PIG
418	YIAGKGLVPLAENYETRSGS&CVDTPEEGYHAAVAUUVKSSSDPDLTWNLSLGGKSCHTAVDETAGWNIIP	487	P27425	TRFE_HORSE
416	YIAGKGLVPLAENYMKSS--DNCEDTPEAGYFAIAAVK-KSADLTWMLKGGKSCHTAVGRTAGWNIIP	482	P02787	TRFE_HUMAN
	*****_*_*_* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
487	MGLLYSKINNCIFDEFFS&GCAPGSPRNSSLCALCIGSEKGTGKCVNPNHRYG--TGAFRCVLEKGDV	556	Q29443	TRFE_BOVIN
470	MGLLYNKINSCKFDQFFGEGCAPGSRNSSLCALCIGSERAPGRECLANNHRYG--TGAFRCVLEKGDV	539	P09571	TRFE_PIG
488	MGLLYSEIKHCEFDKFFREGCAPGYRNSLCLMCLIGS&GPRECEPNHRYG--TGAFRCVLEKGDV	557	P27425	TRFE_HORSE
483	MGLLYNKINHCRFDFPSEGC&PSSKSSSLCKLCHG&GLN--LCEPNKGYG--TGAFRCVLEKGDV	549	P02787	TRFE_HUMAN
	*****_*_*_* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
557	AFVKDQTVIQNTDGNMNEAWAKNKKENFEVLCKDGTREKPVTDENCHLARAPNHAAVSRKDKATCUEKI	626	Q29443	TRFE_BOVIN
540	AFVKDQVUQNTDGNMNDWAKDLKQMDPELLCQNGAREPVDNAENCHLARAPNHAAVARDKVTVAEE	609	P09571	TRFE_PIG
558	AFVKHQTVQNTDGNMDDWAKDLKSENFKLLCPDGTREKPVTEFKSCYLARAPNHAAVSRKEKAAACVQE	627	P27425	TRFE_HORSE
550	AFVKHQTVQNTDGNMDDWAKDLKSENFKLLCPDGTREKPVTEYANCHLARAPNHAAVTRKDKK&CVHKI	619	P02787	TRFE_HUMAN
	****_*_*_* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
627	LNKQDDFGKSVTDCTSNFCLFQSNKDLLFRDDEKCLASIA-KKYDYSYGLDDYVAMTMLRQCSTSKL	695	Q29443	TRFE_BOVIN
610	LLKQQAQFGRHVTDCSSSFCMFKSNKDLLFRDDEKCLARVQ-KTTSYSLGADYITAVANLRQCSTSKL	678	P09571	TRFE_PIG
628	LHNQQA&YKNGS&HCPDKFCLFQSAKDLLFRDDEKCLANLQPTTTTKYTKYKYLAVANLRQCSTSKL	697	P27425	TRFE_HORSE
620	LRQQQLFGSNVTDCTSNFCLFRSETKDLLFRDDEKCLAKLHNRNTYKYLKGEYVKAUGMLRQCSTSSL	689	P02787	TRFE_HUMAN
	* : *			
696	LEACTFHKP-----	704	Q29443	TRFE_BOVIN
679	LEACTFHS&AKNPRVETTT	696	P09571	TRFE_PIG
698	LEACTFHVV-----	706	P27425	TRFE_HORSE
690	LEACTFRFP-----	698	P02787	TRFE_HUMAN
	*****:			

**Abbildung A3:** Sequenz-Alignment von Serotransferrin (Rind, Schwein, Pferd, Mensch) mit dem Algorithmus „clustalW“ auf SwissProt/UniProtKB<sup>[3]</sup> (<http://www.uniprot.org/>). Sternchen zeigen identische Aminosäuren an (397) und Punkte ähnliche Aminosäuren (178). In blau sind die Bindungsstellen für das Fe markiert und in grün die Bindungsstellen für das Carbonat-Ion. Die lila markierte Anfangssequenz ist ein Signalpeptid, welches nach der Translation abgespalten wird.





a)



b)

**Abbildung A4:** a) Tf-Konzentration (Quadrat) und b) CDT-Level (Raute) für Serum-Proben der Tiere P.v. 4190 (schwarz) und P.v. 4191 (weiß) über einen Zeitraum von etwa zwei Tagen mit wiederholten IDA-Messungen

**Tabelle A2:** y- und b-Ionenserien der ESI-MS/MS Fragmentspektren zu den tryptischen Peptiden mit den Massen 1756,98 *m/z*, 1994,17 *m/z* und 1096,61 *m/z*.

**Verlässlichkeit** 99%  
**Sequenz** AVSNFFAGSCVPCADR  
**Modifikationen** Deamidated(N)@4; Carbamidomethyl(C)@10; Carbamidomethyl(C)@13  
**ΔMasse** -0,7701  
**Exaktes MW** 1756,9801  
**z** 2

Aminosäure	b	b+2	y	y+2
A	72,0444	36,5258	1758,7574	879,8823
V	171,1128	86,06	1687,7203	844,3638
S	258,1448	129,5761	1588,6519	794,8296
N[Dea]	373,1718	187,0895	1501,6199	751,3136
F	520,2402	260,6237	1386,5929	693,8001
F	667,3086	334,1579	1239,5245	620,2659
A	738,3457	369,6765	1092,4561	546,7317
G	795,3672	398,1872	1021,419	511,2131
S	882,3992	441,7032	964,3975	482,7024
C[CAM]	1042,4299	521,7186	877,3655	439,1864
V	1141,4983	571,2528	717,3348	359,1711
P	1238,551	619,7792	618,2664	309,6368
C[CAM]	1398,5817	699,7945	521,2137	261,1105
A	1469,6188	735,313	361,183	181,0951
D	1584,6457	792,8265	290,1459	145,5766
R	1740,7469	870,8771	175,119	88,0631

**Verlässlichkeit** 99%  
**Sequenz** CACSNHEPYFGYSGAFK  
**Modifikationen** Carbamidomethyl(C)@1; Carbamidomethyl(C)@3; Deamidated(N)@5  
**ΔMasse** -0,6224  
**Exaktes MW** 1994,1703  
**z** 3

Aminosäure	b	b+2	y	y+2
C[CAM]	161,0379	81,0226	1995,8	998,4036
A	232,075	116,5412	1835,7694	918,3883
C[CAM]	392,1057	196,5565	1764,7322	882,8698
S	479,1377	240,0725	1604,7016	802,8544
N[Dea]	594,1647	297,586	1517,6696	759,3384
H	731,2236	366,1154	1402,6426	701,825
E	860,2662	430,6367	1265,5837	633,2955
P	957,3189	479,1631	1136,5411	568,7742
Y	1120,3823	560,6948	1039,4884	520,2478
F	1267,4507	634,229	876,425	438,7162
G	1324,4721	662,7397	729,3566	365,1819
Y	1487,5355	744,2714	672,3352	336,6712
S	1574,5675	787,7874	509,2718	255,1396
G	1631,589	816,2981	422,2398	211,6235
A	1702,6261	851,8167	365,2183	183,1128
F	1849,6945	925,3509	294,1812	147,5942
K	1977,7894	989,3984	147,1128	74,06

**Verlässlichkeit** 99%  
**Sequenz** YYGYTGAFR  
**Modifikationen**  
**ΔMasse** 0,1167  
**Exaktes MW** 1096,6145  
**z** 2

<b>Aminosäure</b>	<b>b</b>	<b>b+2</b>	<b>y</b>	<b>y+2</b>
Y	164,0706	82,5389	1097,5051	549,2562
Y	327,1339	164,0706	934,4417	467,7245
G	384,1554	192,5813	771,3784	386,1928
Y	547,2187	274,113	714,357	357,6821
T	648,2664	324,6368	551,2936	276,1504
G	705,2879	353,1476	450,2459	225,6266
A	776,325	388,6661	393,2245	197,1159
F	923,3934	462,2003	322,1874	161,5973
R	1079,4945	540,2509	175,119	88,0631



Aus dieser Arbeit sind bisher folgende Peer-Review Publikationen entstanden:

**M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, J. A.C. Broekaert, A. Prange.**

Metallomics approach for the identification of the iron transport protein transferrin in blood from harbour seals (*Phoca vitulina*). 2010. Metallomics 2(10), 683-693

**A. Kakuschke, E. Valentine-Thon, S. Griesel, J. Gandrass, O. Pérez Luzardo, L. Domínguez Boada, M. Zumbado Peña, M. Almeida González, M. Grebe, D. Pröfrock, H-B. Erbsloeh, K. Kramer, S. Fonfara, A. Prange.**

First health and pollution study on harbor seals (*Phoca vitulina*) living in the German Elbe estuary. 2010. Marine Pollution Bulletin 60(11), 2079-2086

**M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, J. A.C. Broekaert, A. Prange.**

Absolute quantification of transferrin in blood samples of harbour seals using HPLC-ICP-MS. 2011 Metallomics 3(2), 176-185

**M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayon, A. Sanz-Medel, J. A.C. Broekaert, A. Prange.**

Comparison of different methods for the absolute quantification of harbour seal transferrin glycoforms using HPLC-ICP-MS. JAAS, *accepted*

**A. Kakuschke, J. Gandrass, O. Pérez Luzardo, L. Domínguez Boada, A. Zaccaroni, S. Griesel, M. Grebe, D. Pröfrock, H-B. Erbsloeh, E. Valentine-Thon, A. Prange, K. Kramer.**

Post mortem health and pollution investigations on harbor seals (*Phoca vitulina*) of the isles Helgoland and Sylt. *unpublished work*

Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen:

**5th Franco-Spanish Workshop**, 08. - 11.06.2008, Huelva, Spanien

M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, A. Prange: "New approach for measuring the acute-phase protein Transferrin in blood samples of harbour seals (*Phoca vitulina*)"

**DASp Doktorandenseminar**, 09. - 10.07.2008, Jena

M. Grebe, D. Pröfrock, J.A.C. Broekaert, A. Prange: "New approach for measuring the acute-phase protein Transferrin in blood samples of harbour seals (*Phoca vitulina*)"

**Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 03. - 09.01.2010, Fort Meyers, USA

M. Grebe, D. Pröfrock, E. del Castillo Busto, M. Montes Bayon, A. Sanz-Medel, J.A.C. Broekaert, A. Prange: "Quantification of Transferrin isoforms in seal blood samples"

**Anwendertreffen "Plasmaspektometrie"**, 08.02.2010, Hamburg

M. Grebe, D. Pröfrock, E. del Castillo Busto, M. Montes Bayon, A. Sanz-Medel, J.A.C. Broekaert, A. Prange: „Charakterisierung des Akute-Phase Proteins Transferrin in Blutproben von Seehunden (*Phoca vitulina*)“

**Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 30.01. - 04.02.2011, Zaragoza, Spanien

A. Prange, M. Grebe, D. Pröfrock, E. del Castillo Busto, M. Montes Bayon, A. Sanz-Medel, J.A.C. Broekaert: „Transferrin Glycoforms in blood samples of harbour seals - a comparison of quantitative HPLC-ICP-MS approaches“

**Pittcon**, 13. - 18.03.2011, Atlanta, USA

A. Prange, M. Grebe, D. Pröfrock, E. del Castillo Busto, M. Montes Bayon, A. Sanz-Medel, J.A.C. Broekaert: „Application of Metallomics and proteomics approaches in environmental analysis: In deep investigation of potential marker proteins in seal blood samples“

Posterbeiträge auf wissenschaftlichen Tagungen:

**22nd Conference of the European Cetacean Society**, 08. - 12.03.2008, Egmond aan Zee, Niederlande

M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, A. Prange: "New tools for measuring acute-phase proteins in blood and liver samples of harbour seals (*Phoca vitulina*)"

**21. ICP MS User Meeting**, 17. - 19.09.2008, Dresden

M. Grebe, D. Pröfrock, J.A.C. Broekaert, A. Prange: "Investigation of the acute-phase protein Transferrin in blood samples of harbour seals (*Phoca vitulina*)"

**European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry**, 15. - 20.02.2009, Graz, Österreich

M. Grebe, D. Pröfrock, J.A.C. Broekaert, A. Prange: "Analysis of the acute-phase protein Transferrin in blood plasma of harbour seals (*Phoca vitulina*)"

**3rd International Symposium on Metallomics**, 15. - 18.06.2011, Münster

M. Grebe, D. Pröfrock, A. Prange, E. del Castillo Busto, M. Montes Bayon, A. Sanz-Medel, J.A.C. Broekaert: "Metallomics approach in environmental analysis: Transferrin as a potential health marker protein in seal blood samples"

## Curriculum Vitae

Name Mechthild Grebe  
Akademischer Grad Dipl. Biochemikerin  
Geburtsdatum 07.01.1983  
Geburtsort Kreuztal

04/2007 - 03/2011 **Doktorarbeit am Helmholtz-Zentrum Geesthacht**

Institut für Küstenforschung, Marine bioanalytische Chemie (Prof. Dr. Andreas Prange, Dr. Daniel Pröfrock) in Zusammenarbeit mit der Universität Hamburg (Prof. Dr. Jose Broekaert)

Titel der Doktorarbeit: „Isolierung und Charakterisierung von Transferrin-Glykoformen aus Blutproben von Seehunden mittels multidimensionaler chromatographischer Verfahren und molekül- und elementspezifischer massenspektrometrischer Detektion“

06/2009 - 07/2009 **Praktikum an der Universität Oviedo, Spanien**

Fakultät für physikalische und analytische Chemie (Prof. Dr. Alfredo Sanz-Medel, Dr. Maria Montes Bayon)

Thema: Isotopenverdünnungsanalytik mit multiplen Eisen-Spikes zur Quantifizierung von Transferrin und Transferrin-Sättigung in humanen Serum-Proben (IDA-ICP-MS)

09/2006 - 03/2007 **Diplomarbeit an der Universität Bayreuth**

Lehrstuhl für Tierökologie II (Prof. Dr. Konrad Dettner)

Titel der Diplomarbeit: "Spurenanalytische Untersuchungen von mikrobiellen Pederinmetaboliten in Kompartimenten von Kurzflügel-Käfern der Gattung *Paederus*"

Note: sehr gut (1,0)

10/2002 - 03/2007 **Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth**

Abschluss: Diplom in Biochemie

Gesamtnote: gut (1,9)

08/1993 - 06/2002 **Gymnasium Netphen**

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Gesamtnote: gut (1,8)

Geesthacht, 27.06.2011





## Danksagung

Rückblickend auf meine Promotionszeit möchte ich mich an dieser Stelle bei denjenigen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Andreas Prange vom Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Zentrum für Material- und Küstenforschung, Abteilungsleiter der Abteilung „Marine bioanalytische Chemie“ möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die guten Bedingungen für die Durchführung der Arbeit danken.

Prof. Dr. Jose A. C. Broekaert von der Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, Lehrstuhl für Analytische Chemie heterogener Systeme danke ich für die Übernahme der Mentorenschaft und die Möglichkeit zur freien Gestaltung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer-Team Dr. Daniel Pröfrock und Dr. Antje Kakuschke für die ausgezeichnete Betreuung. Daniel für ausdauernde Erklärungen zur ICP-MS und Ideen für die Umsetzung verschiedenster Versuche, Antje für die biologische Sicht der Dinge und einen perfekt organisierten und erfolgreichen Wildfang.

Prof. Dr. Alfredo Sanz-Medel, Dr. Maria Montes Bayon und Dr. Estela del Castillo Busto von der Universität Oviedo, Fakultät für physikalische und analytische Chemie danke ich für die Gelegenheit eines Forschungsaufenthalts in ihrer Arbeitsgruppe und die ausführliche Einarbeitung in die Isotopenverdünnungsanalytik zur Quantifizierung von Transferrin. Estela, Daniel, Tobias und den anderen Studenten danke ich für die schöne Zeit in Oviedo.

Der gesamten Arbeitsgruppe in Geesthacht danke ich für die gute Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen und die vielfältige Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Simone für die Infos rund um Seehunde und ICP-MS sowie für einzelnen TXRF Messungen, Burkhard für die Bestimmung von Haptoglobin, Stephan für die Tipps und Tricks rund ums MALDI und HPLC-*Trouble-shooting*. Christiane danke ich für die künstlerische Unterstützung, aufbauende Gespräche und in besonderen Fällen ein Stückchen Schoki. Euch allen möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit in Geesthacht danken.

Marion, Annika, Antonia, Danijela und Simone danke ich für die vielen schönen Worte, Satzzeichen und fehlenden Buchstaben.

Meiner Familie und Freunden gilt ein besonderer Danke für die beständige Unterstützung auch während der Promotionszeit.



### **Erklärung über früherer Promotionsversuche und eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, Mechthild Grebe, an Eides Statt, dass ich diese Arbeit mit dem Titel „Isolierung und Charakterisierung von Transferrin-Glykoformen aus Blutproben von Seehunden mittels multidimensionaler chromatographischer Verfahren und molekül- und elementspezifischer massenspektrometrischer Detektion“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als von mir angegebene Hilfsmittel und Quellen wurden nicht verwendet und die benutzten wörtlichen oder inhaltlichen entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form an keiner andern Universität als Promotionsarbeit eingereicht worden und es wurden zuvor keine weiteren Promotionsversuche von mir unternommen.

Geesthacht, den 27. Juni 2011