



(10) DE 10 2016 012 302 B4 2020.10.29

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2016 012 302.8**
(22) Anmeldetag: **17.10.2016**
(43) Offenlegungstag: **19.04.2018**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **29.10.2020**

(51) Int Cl.: **H01J 49/40 (2006.01)**
H01J 49/26 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:
US 2007 / 0 038 387 A1

(72) Erfinder:
Boskamp, Tobias, 27726 Worpswede, DE

Sleno, L.: The use of mass defect in modern mass spectrometry. In: J. Mass. Spectrom., Vol. 47, 2012, S. 226 – 236.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Auswerten von Daten einer Massenspektrometrie und massenspektrometrisches Verfahren**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum Auswerten von Daten einer Massenspektrometrie zur Analyse einer Vielzahl von Peptiden aus einer biologischen Probe, insbesondere einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie, mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellung erwarteter Massendefekte für die Vielzahl von Peptiden, wobei die erwarteten Massendefekte berechnet werden aus

$$m_N r_P,$$

wobei m_N die ganzzahlige Nominalmasse eines Peptids auf einer m/z -Skala bezeichnet und r_P ein Faktor ist, der die Nominalmasse m_N mit einer zugehörigen erwarteten Peptidmasse m_P über die Gleichung $m_P = (1+r_P)m_N$ in Beziehung setzt, wobei die erwartete Peptidmasse m_P auf einer m/z -Skala am dichtesten an einer gemessenen Masse m liegt;

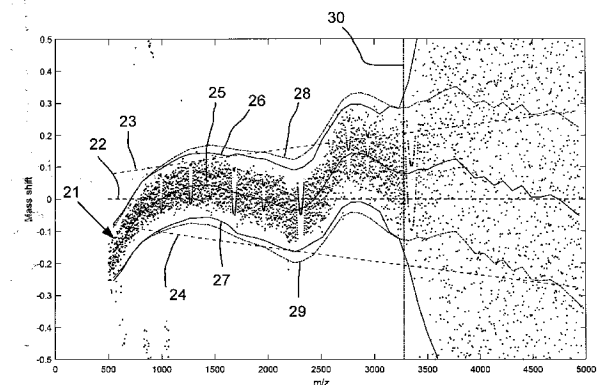
b) Bestimmung gemessener Massendefekte, nämlich der sich aus den Daten der Massenspektrometrie ergebenden Massendefekte, wobei der Massendefekt zu einer gemessenen Masse m auf einer m/z -Skala berechnet wird aus

$$m - \text{floor} \left(\frac{m}{1+r_P} + 0,5 \right),$$

wobei die Funktion $\text{floor}(x)$ für ein beliebiges $x > 0$ den ganzzahligen Anteil von x bezeichnet;

c) Vergleich der gemessenen Massendefekte mit den erwarteten Massendefekten für die Vielzahl von Peptiden aus der biologischen Probe unter Ausnutzung eines Peptidmassendefektdiagramms, welches durch eine Transforma-

tion erzeugt wird, die Positionen der theoretisch erwarteten Peptidmassendefekte für die Vielzahl von Peptiden auf einer Referenzlinie abbildet, die eine waagerechte Nulllinie ist, wobei eine vertikale Achse sich von -0,5 bis 0,5 erstreckt und eine vorzeichenbehaftete Diskrepanz zwischen dem für ein Peptid erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Massendefekt darstellt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auswerten von Daten einer Massenspektrometrie zur Analyse von Peptiden aus biologischen Proben, insbesondere einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Daneben betrifft die Erfindung ein massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse von Peptiden aus biologischen Proben, insbesondere unter Verwendung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers.

[0002] Bei der sogenannten Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) wird eine biologische Gewebeprobe nach einer geeigneten Probenpräparation mit einer Matrixlösung überzogen und in Vakuum mit einem Laser beschossen. Dabei werden biologische Makromoleküle aus dem Gewebe herausgelöst und ionisiert, typischerweise mit einer einfach positiven Ladung. Die Ionen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und von einem Detektor registriert. Aus der Flugzeit lässt sich der m/z-Wert, d.h. das Verhältnis zwischen Masse und Ladung des Moleküls bestimmen. Das gemessene Massenspektrum stellt die relative Zahl der registrierten Ionen (spektrale Intensität) als Funktion ihrer m/z-Werte dar. Unter der Annahme einer einfach positiven Ionisierung ist der m/z-Wert äquivalent zur Masse m des ionisierten Moleküls. Nachfolgend wird zur Vereinfachung unter der Masse m des ionisierten Moleküls der m/z-Wert verstanden.

[0003] Der m/z-Wert bzw. die molekulare Masse wird in Dalton (Da) angegeben als ein Vielfaches der atomaren Masseneinheit ($1 \text{ Da} = 1 \text{ amu}$, atomic mass unit). Näherungsweise entspricht die Masse eines Moleküls in Da der Gesamtzahl der Protonen und Neutronen, aus denen die Atomkerne des Moleküls zusammengesetzt sind. Die Differenz zwischen dieser ganzzahligen Nominalmasse und der tatsächlichen Masse wird als Massendefekt bezeichnet. Der Massendefekt eines Moleküls ist die Summe der Massendefekte der einzelnen Atome, die wiederum für jedes chemische Element bzw. Isotop verschieden sind.

[0004] Der Ausdruck „Massendefekt“ wird in der Literatur nicht einheitlich verwendet. Eine erste Bedeutung des Begriffs bezieht sich auf die Differenz der Massen in der SI-Einheit kg. Eine zweite Bedeutung bezieht sich ebenfalls auf die Differenz der Massen, geht aber von der atomaren Masseneinheit u aus, die mit Bezug zum Kohlenstoff-Isotop **12C** definiert ist. Aufgrund dieser Festlegung ist der Massendefekt des Kohlenstoff-Isotops **12C** gleich Null. Für diese zweite Bedeutung wird anstelle des Begriffs „Massendefekt“ auch der Begriff „Massenüberschuss“ verwendet, um den Unterschied zur oben genannten ersten Bedeutung herauszustellen. In der Biologie und Chemie, insbesondere im Zusammenhang mit massenspektrometrischen Verfahren, wird aber trotzdem der Begriff „Massendefekt“ verwendet, also im Sinne der zweiten Bedeutung, so auch hier.

[0005] Bei der Akquisition von MALDI-TOF-Massenspektrometriedaten von biologischen Gewebeschnitten wird eine Vielzahl von Informationen über die proteomische Struktur der Gewebeproben gewonnen. Gleichzeitig unterliegt die Messung einer Reihe von potentiellen Störungen, die zu Verzerrungen und Verfälschungen der gewonnenen Informationen führen können. Aufgrund der hohen Komplexität der Daten ist eine objektive Beurteilung ihrer Qualität und Genauigkeit oftmals nicht möglich. Aktuell existieren keine breit akzeptierten und leicht anwendbaren Maßstäbe, die eine Aussage darüber erlauben, welche Datenqualität eine Messung aufweist oder ob zwei Messungen Daten von vergleichbarer Qualität liefern.

[0006] Aus der US 2016/0003842 A1 ist ein massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse von Peptiden bekannt. Ziel ist dabei die Erkennung sogenannter Glykopeptide. In den **Fig. 2a**, **Fig. 2b** der US 2016/0003842 A1 sind Massendefekte über nominalen Massen m/z aufgetragen. Unterschieden werden Bereiche mit Peptiden einerseits und mit Glykopeptiden angereicherte Bereiche andererseits.

[0007] Die Veröffentlichung US 2007/0038387 A1 bezieht sich auf ein Verfahren zum Filtern von Massenspektrometerdaten unter Verwendung eines variablen Filterfensters. Die Breite des Fensters kann von der Masse selbst und den Massendefekten für eine Familie von Verbindungen abhängen. Das Verfahren soll mit einer Vielzahl von Verbindungen verwendbar sein, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Peptide, und auf einer Reihe verschiedener Massenspektrometer eingesetzt werden können.

[0008] Der Artikel von Lekha Sleno „The use of mass defect in modern mass spectrometry“ (J. Mass. Spectrom. 2012, 47, 226-236) soll laut der Autorin als Einführung in die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten von Massendefekten bei Anwendungen mit modernen Massenspektrometern dienen.

[0009] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Schaffung eines Verfahrens zur Qualitätskontrolle von Massenspektrometriedaten (bei der Analyse von Peptiden aus biologischen Proben) bzw. ein massenspektrometrisches Verfahren, mit einer entsprechenden Kontrolle.

[0010] Zur Lösung der Aufgabe weist das Verfahren die Merkmale des Anspruchs 1 auf. Vorgesehen ist demnach ein Verfahren zum Auswerten von Daten einer Massenspektrometrie zur Analyse einer Vielzahl von Peptiden aus einer biologischen Probe, insbesondere einer MALDI-TOF- Massenspektrometrie, mit folgenden Schritten:

- a) Bereitstellung erwarteter Massendefekte für die Vielzahl von Peptiden, wobei die erwarteten Massendefekte berechnet werden aus $m_N r_p$, wobei m_N die ganzzahlige Nominalmasse eines Peptids auf einer m/z -Skala bezeichnet und r_p ein Faktor ist, der die Nominalmasse m_N mit einer zugehörigen erwarteten Peptidmasse m_p über die Gleichung $m_p = (1+r_p)m_N$ in Beziehung setzt, wobei die erwartete Peptidmasse m_p auf einer m/z -Skala am dichtesten an einer gemessenen Masse m liegt;
- b) Bestimmung gemessener Massendefekte, nämlich der sich aus den Daten der Massenspektrometrie ergebenden Massendefekte, wobei der Massendefekt zu einer gemessenen Masse m auf einer m/z -Skala berechnet wird aus

$$m - \text{floor}\left(\frac{m}{1+r_p} + 0,5\right),$$

wobei die Funktion $\text{floor}(x)$ für ein beliebiges $x > 0$ den ganzzahligen Anteil von x bezeichnet;

- c) Vergleich der gemessenen Massendefekte mit den erwarteten Massendefekten für die Vielzahl von Peptiden aus der biologischen Probe unter Ausnutzung eines Peptidmassendefektdiagramms, welches durch eine Transformation erzeugt wird, die Positionen der theoretisch erwarteten Peptidmassendefekte für die Vielzahl von Peptiden auf einer Referenzlinie abbildet, die eine waagerechte Nulllinie ist, wobei eine vertikale Achse sich von $-0,5$ bis $0,5$ erstreckt und eine vorzeichenbehaftete Diskrepanz zwischen dem für ein Peptid erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Massendefekt darstellt.

[0011] Je nach Größe der Abweichung der gemessenen Massendefekte von den erwarteten Massendefekten können die Daten bzw. eine zugrunde liegende Messung als fehlerhaft oder akzeptabel bewertet werden. Auch kann durch eine geeignete Signalquelle ein zur Bewertung der Daten korrespondierendes Signal ausgegeben werden, etwa eine Anzeige auf einem Bildschirm.

[0012] Sofern die Daten bzw. die Messung als akzeptabel bewertet werden, wird mit den Daten weiter gearbeitet und/oder es werden weitere Messungen durchgeführt. Bei als fehlerhaft bewerteten Daten können diese beispielsweise für die weitere Verarbeitung verworfen werden und/oder die für die Durchführung der Massenspektrometrie verwendete Vorrichtung wird einer Überprüfung unterzogen.

[0013] Das Verfahren basiert unter anderem auf einer rechnergestützten Visualisierung der Massendefekte der in einem Spektrum aufgefundenen Peaks. Dabei wird ausgenutzt, dass eine Vielzahl der Peaks von Peptiden herrühren, deren Massendefekte einem charakteristischen Muster folgen. Durch Vergleiche der gemessenen Massendefekte mit einem theoretisch erwarteten Muster der Massendefekte / den erwarteten Massendefekten lassen sich rechnerisch und visuell Rückschlüsse auf die Qualität der gemessenen Daten ziehen.

[0014] Die Massendefekte werden im massenspektrometrischen Verfahren natürlich nicht direkt gemessen, sondern aus den ermittelten Massen (welche in einem TOF-Massenspektrometer aus gemessenen Flugzeiten bestimmt werden) berechnet. Zur Vereinfachung wird aber der Begriff „gemessener Massendefekt“ zur Abgrenzung gegenüber dem „erwarteten Massendefekt“ verwendet. Letzterer ergibt sich anhand von Berechnungen aufgrund der besonderen Eigenschaften der Peptide.

[0015] Die erwarteten Massendefekte werden berechnet aus

$$m_N r_p,$$

wobei m_N die Nominalmasse eines Peptids bezeichnet und r_p vorzugsweise zwischen 10^{-3} und 10^{-4} liegt, insbesondere etwa $4,95 \times 10^{-4}$ beträgt.

[0016] Für die Berechnung der erwarteten Massendefekte werden somit für eine gegebene (ganzzahlige) Nominalmasse m_N die Differenz zu der sich aus dem Produkt mit $1+r_p$ ergebenden Masse m berücksichtigt. r_p ist vorzugsweise der Faktor $4,95 \times 10^{-4}$. Auch davon abweichende Werte sind grundsätzlich möglich.

[0017] Nach der Erfindung ist vorgesehen, dass der Massendefekt zu einer gemessenen Masse m berechnet wird aus

$$m - \text{floor}\left(\frac{m}{1+r_P} + 0,5\right),$$

wobei die Funktion $\text{floor}(x)$ für ein beliebiges $x > 0$ den ganzzahligen Anteil von x bezeichnet.

[0018] Der gemessene Massendefekt wird also als Differenz zwischen m und derjenigen Nominalmasse m_N bestimmt, deren zugehörige erwartete Peptidmasse $m_P = (1+r_P)m_N$ am dichtesten an m liegt.

[0019] In Fortbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Diskrepanz δ_P zwischen dem gemessenen und dem erwarteten Massendefekt direkt aus der gemessenen Masse m berechnet wird als

$$\delta_P(m) = \varphi\left(\frac{m}{1+r_P} + 0,5\right) - 0,5$$

wobei die Funktion $\varphi(x) = x - \text{floor}(x)$ den Nachkommaanteil von x für ein beliebiges $x > 0$ bezeichnet.

[0020] Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung ist vorgesehen, dass zum Vergleich der gemessenen Massendefekte mit den erwarteten Massendefekten über Teilintervalle einer Massenachse jeweils der Median der gemessenen Massendefekte gebildet und mit dem erwarteten Massendefekt verglichen wird.

[0021] In Fortbildung der Erfindung werden bei weiterer Verwendung der Daten die Messwerte (der ermittelten Massen) korrigiert, nämlich in Abhängigkeit von der Abweichung der gemessenen Massendefekte von den erwarteten Massendefekten. Im einfachsten Fall werden die ermittelten Massen um die Differenzen der Massendefekte korrigiert.

[0022] Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung werden die gemessenen Massendefekte für lokale Maxima der spektralen Intensitäten berechnet. Jedes lokale Maximum wird als Peak einer bestimmten gemessenen Masse angesehen.

[0023] Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren weist die Merkmale des Anspruchs 8 auf. Vorgesehen ist demnach ein Verfahren zum Auswerten von Daten einer Massenspektrometrie zur Analyse einer Vielzahl von Peptiden aus einer biologischen Probe, insbesondere einer MALDI-TOF- Massenspektrometrie, vorzugsweise nach einem der zuvor erörterten Verfahren, mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellung erwarteter Massendefekte für die Vielzahl von Peptiden, wobei die erwarteten Massendefekte berechnet werden aus

$$m_N r_P,$$

wobei m_N die ganzzahlige Nominalmasse eines Peptids auf einer m/z -Skala bezeichnet und r_P ein Faktor ist, der die Nominalmasse m_N mit einer zugehörigen erwarteten Peptidmasse m_P über die Gleichung $m_P = (1+r_P)m_N$ in Beziehung setzt,

wobei die erwartete Peptidmasse m_P auf einer m/z -Skala am dichtesten an einer gemessenen Masse m liegt;

b) Bestimmung gemessener Massendefekte, nämlich der sich aus den Daten der Massenspektrometrie ergebenden Massendefekte, wobei der Massendefekt zu einer gemessenen Masse m auf einer m/z -Skala berechnet wird aus

$$m - \text{floor}\left(\frac{1}{1+r_P} + 0,5\right),$$

wobei die Funktion $\text{floor}(x)$ für ein beliebiges $x > 0$ den ganzzahligen Anteil von x bezeichnet;

- c) Bestimmung der Diskrepanzen zwischen den gemessenen Massendefekten und den erwarteten Massendefekten.
- d) Bestimmung der Streuung der Diskrepanzen um deren Mittelwert;
- e) Vergleich der Streuung mit einer definierten zulässigen Streuung.

[0024] Je nach Abweichung der Streuung von der definierten zulässigen Streuung können die Daten bzw. eine zugrunde liegende Messung als fehlerhaft oder akzeptabel bewertet werden. Auch kann durch eine geeignete Signalquelle ein zur Bewertung der Daten korrespondierendes Signal ausgegeben werden, etwa eine Anzeige auf einem Bildschirm.

[0025] Sofern die Daten bzw. die Messung als akzeptabel bewertet werden, wird mit den Daten weiter gearbeitet und/oder es werden weitere Messungen durchgeführt. Bei als fehlerhaft bewerteten Daten können diese beispielsweise für die weitere Verarbeitung verworfen werden und/oder die für die Durchführung der Massenspektrometrie verwendete Vorrichtung wird einer Überprüfung unterzogen.

[0026] In Fortbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass zur Bestimmung einer Streuung der Massendefektdiskrepanzen Interquartilsabstände der ermittelten Diskrepanzen über Teilintervalle der Massenachse bestimmt werden, und dass bei Überschreitung eines Grenzwertes der Streuung insbesondere die Daten als fehlerhaft verworfen werden.

[0027] Nach einem weiteren Gedanken der Erfindung ist ein Korridor für zulässige Streuungen gebildet durch die Grenzwerte

$$d_P^{1,2}(m) = \pm \mu \sqrt{v(m)}$$

wobei

$$v(m) = \sigma_P^2(m) + \frac{\Delta m(m)^2}{12}$$

und

$$\sigma_P(m_N) = \sigma_0 + s_P m_N, \text{ mit } \sigma_0 \approx 0,02 \text{ und } s_P \approx 2,0 \times 10^{-5},$$

und $\Delta m(m)$ die Breite von m/z -Bins an der Massenposition m bezeichnet,
 und m/z -Bins die sich durch Diskretisierung der Massenachse ergebenden Intervalle repräsentieren,
 und $\mu > 0$ einen Skalierungsfaktor angibt, vorzugsweise $\mu = 2$,
 und wobei insbesondere die Daten als fehlerhaft verworfen werden, wenn die Streuung der Massendefektdiskrepanzen außerhalb des derart vorgegebenen Korridors liegt.

[0028] In Fortbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass der Massebereich mit erkennbarem Peptidsignal bestimmt wird als die Gesamtheit aller Teilintervalle der Massenachse, für die der Quotient aus der tatsächlichen Streuung und der maximal zulässigen Streuung $d_P(m)$ einen festgelegten Schwellwert t nicht überschreitet, wobei vorzugsweise $t = 1,2$ festgelegt wird. Die untere bzw. obere Grenze dieses Massebereiches geben die Ausdehnung des Peptidsignals an.

[0029] Je nach Unterschreitung eines Toleranzwertes für die obere Grenze oder die Ausdehnung des Peptidsignalsbereiches, bzw. Überschreitung eines Toleranzwertes für die untere Grenze des Peptidsignalsbereiches können die Daten bzw. eine zugrunde liegende Messung als fehlerhaft oder akzeptabel bewertet werden. Auch kann durch eine geeignete Signalquelle ein zur Bewertung der Daten korrespondierendes Signal ausgegeben werden, etwa eine Anzeige auf einem Bildschirm.

[0030] Sofern die Daten bzw. die Messung als akzeptabel bewertet werden, wird mit den Daten weiter gearbeitet und/oder es werden weitere Messungen durchgeführt. Bei als fehlerhaft bewerteten Daten können diese beispielsweise für die weitere Verarbeitung verworfen werden und/oder die für die Durchführung der Massenspektrometrie verwendete Vorrichtung wird einer Überprüfung unterzogen.

[0031] Das erfindungsgemäße massenspektrometrische Verfahren weist die Merkmale des Anspruchs 12 auf. Zur Analyse einer Vielzahl von Peptiden aus einer biologischen Probe, insbesondere unter Verwendung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers, sind folgende Schritte vorgesehen:

- a) Durchführung eines oder mehrerer massenspektrometrischer Untersuchungen an der biologischen Probe und Bereitstellung von sich aus den massenspektrometrischen Untersuchungen ergebenden Daten;
- b) Durchführung eines der Verfahren zum Auswerten von Daten, wie zuvor dargestellt.

[0032] Weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung im Übrigen und aus den Ansprüchen. Vorteilhafte Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend anhand von Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 einen Ausschnitt aus einem Mittelwertspektrum mit deutlich erkennbarer, wellenförmiger Grundlinie mit charakteristischer Wellenlänge von etwas mehr als 1 Da;

Fig. 2 ein herkömmliches Massendefektdiagramm eines Mittelwertspektrums mit erkennbarem Peptidband;

Fig. 3 ein Peptidmassendefektdiagramm (PMD) des Mittelwertspektrums zu, nämlich mit Darstellung einer Massenverschiebung über der Masse (m/z), mit horizontaler Referenzlinie für einen erwarteten Massendefekt und Referenzkorridor (gestrichelte Linien), Massendefektdiskrepanz und deren Streuung (durchgezogene Linien) sowie erwarteter Streuung (Strich-Punkt-Strich Linien) und oberer Grenze des Massebereichs mit erkennbarem Peptidsignal (gepunktete Linie);

Fig. 4 ein PMD eines Mittelwertspektrums mit stark reduziertem Signal-Rauschverhältnis, erkennbar am verkürzten Peptidsignalbereich, der nur bis ca. 1300 Da reicht;

Fig. 5 ein PMD eines Spektrums mit deutlicher Massenverschiebung um ca. 0,15 bis 0,35 Da;

Fig. 6 ein PMD mit deutlich erkennbarer Linienstruktur aufgrund einer äquidistant gesampelten Massenachse;

Fig. 7: ein PMD eines Mittelwertspektrums mit sehr grob gesampelter Massenachse; aufgrund des groben Samplings ist die Struktur des Peptidbandes kaum noch zu erkennen;

Fig. 8 ein PMD eines Mittelwertspektrums mit fehlerhaft durchgeführter Kalibrierung, erkennbar am Bruch im Peptidband ab ca. $m/z=1700$.

[0033] Die in einer MALDI-Messung registrierten Moleküle beinhalten insbesondere Metabolite und Peptide. Metabolite sind Stoffwechselprodukte und können unterschiedliche chemische Formen aufweisen, z.B. Lipide, Kohlehydrate oder Abbauprodukte von aus der Nahrung oder der Umwelt aufgenommenen Substanzen. Ihre Massen betragen typischerweise weniger als 1000 Da. Demgegenüber sind Peptide Verkettungen von Aminosäuren mit Massen von bis zu 5000 Da und mehr.

[0034] Alle 23 in Proteinen vorkommende Aminosäuren - und damit alle Peptide - bestehen aus den fünf chemischen Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel. Das relative Verhältnis dieser Elemente zueinander ist bei allen Peptiden näherungsweise und unabhängig von ihrer Gesamtmasse gleich, so dass der Massendefekt eines Peptides im Wesentlichen durch dessen Nominalmasse bestimmt wird. Es ergibt sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Masse m eines Peptids und seiner Nominalmasse m_N :

$$m \approx m_P(m_N) = (1 + r_P)m_N, \text{ mit } r_P \approx 4,95 \times 10^{-4}.$$

[0035] Die Streuung der wahren Massen um den theoretischen Mittelwert m_p ist relativ klein, ihre Standardabweichung kann mit

$$\sigma_P(m_N) = \sigma_0 + s_P m_N, \text{ mit } \sigma_0 \approx 0,02, s_P \approx 2,0 \times 10^{-5}$$

abgeschätzt werden.

[0036] Aufgrund der großen Zahl von unterschiedlichen Proteinen und daraus resultierenden Peptiden in biologischen Gewebezellen weist ein typisches MALDI-Spektrum Signalintensitäten an praktisch allen $m_P(m_N)$ für einen breiten Bereich von Nominalmassen m_N auf. Bildet man aus mehreren während der Vermessung

einer Gewebeprobe gewonnenen Spektren ein Summen- oder Mittelwertspektrum, siehe **Fig. 1**, so ist darin eine charakteristische, gleichmäßige Wellenlinie als Grundlinie **20** zu erkennen, die insbesondere oberhalb von ca. 1000 Da deutlich hervortritt und eine Wellenlänge von näherungsweise $1+r_p$ Da aufweist.

[0037] Die Bestimmung der Masse eines Moleküls ist mit einem Fehler behaftet, der im Wesentlichen von zwei Ursachen herrührt: Zum einen kann die Flugzeit eines Moleküls nur mit einer gewissen Genauigkeit und in diskreten Intervallen gemessen werden, woraus sich eine Diskretisierung der Massenachse, also eine Einteilung in aufeinanderfolgende Intervalle (m/z -Bins) ergibt. Üblicherweise ist die Breite der m/z -Bins nicht konstant sondern nimmt zu höheren Massen hin zu.

[0038] Zum anderen hängt die Flugzeit des Moleküls nicht nur von seiner Masse ab sondern auch von dessen Anfangszustand innerhalb der Ionenwolke zu Beginn der Beschleunigung. Dieser Anfangszustand, insbesondere Geschwindigkeit und Bewegungsrichtung des Moleküls, sind weitestgehend unbekannt und führen zu einem deutlichen Messfehler, der üblicherweise durch eine Kalibrierung nach der Messung korrigiert wird.

[0039] Zu den gängigen Kalibrierungsmethoden gehören die externe Kalibrierung und die statistische Peptidkalibrierung. Bei der externen Kalibrierung werden vor der Messung mehrere Tropfen einer Lösung mit definierten Inhaltsstoffen neben der Gewebeprobe platziert. Die darin gemessenen Spektren werden nach der Messung mit den erwarteten Massen der bekannten Inhaltsstoffe verglichen und es wird eine Kalibrierungskurve für die m/z -Achse eines Spektrums bestimmt. Bei der Peptidkalibrierung wird der oben beschriebene Zusammenhang zwischen wahrer Masse eines Peptids und dessen Nominalmasse ausgenutzt, um die mutmaßlich zu einem Peptid gehörenden Peakpositionen auf die theoretisch erwarteten m/z -Werte zu verschieben, siehe Wool A, Smilansky Z: Precalibration of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2002, 2, **1365-1373**.

[0040] Beide Kalibrierungsmethoden können die Fehler in den m/z -Werten nicht vollständig korrigieren. Die externe Kalibrierung erfordert darüber hinaus eine manuelle Interaktion, während die Peptidkalibrierung sehr rechen- und zeitaufwändig ist.

[0041] Zur Visualisierung der in einem Spektrum beobachteten Massendefekte werden die m/z -Werte der in einem Spektrum gefundenen Peaks in einem Diagramm aufgetragen, dessen horizontale Achse der Masse m (bzw. dem m/z -Wert) entspricht, während auf der vertikalen Achse deren Nachkommaanteil $m\text{-floor}(m)$ abgetragen wird, siehe **Fig. 2**. Solche Diagramme werden benutzt, um unterschiedliche Zusammensetzungen komplexer Molekülmischungen sichtbar zu machen. Eine Variante sind sog. Kendrick-Massendefektdiagramme, die zur Charakterisierung von chemischen Verbindungen einer bestimmten Gruppe verwendet werden, siehe Wikipedia: Kendrick mass. https://en.wikipedia.org/wiki/Kendrick_mass. Im Zusammenhang mit Untersuchungen an Peptiden können Massendefektdiagramme zur Abgrenzung zwischen Peptiden und sog. Glykopeptiden herangezogen werden, siehe US 2016/0003842 A1 und Froehlich J et al.: A Classifier Based on Accurate Mass Measurements to Aid Large Scale, Unbiased Glycoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 2013, 12, 1017-1025.

[0042] Aus einem über mehrere Spektren einer MALDI-Messung gebildeten Mittelwertspektrum lässt sich ein Diagramm erstellen, das wir als Peptidmassendefektdiagramm (PMD) bezeichnen. Hierzu bestimmt man eine Liste aller lokalen Maxima und ihrer jeweiligen m/z -Werte, sowie für jeden m/z -Wert die Abweichung von der jeweils nächstgelegenen, dem theoretischen Peptidmassenmodell entsprechenden Masse. Die Positionen aller lokalen Maxima werden nun in ein Diagramm eingetragen, dessen horizontale Achse wiederum der Masse bzw. dem m/z -Wert entspricht, und auf dessen vertikaler Achse die oben bestimmte Abweichung vom Peptidmassenmodell abgetragen ist.

[0043] Gegenüber dem bekannten Massendefektdiagramm wird das PMD also durch eine Transformation erzeugt, die die Positionen der theoretisch erwarteten Peptidmassendefekte auf die Referenzlinie **22** abbildet, die eine waagerechte Nulllinie ist. Die vertikale Achse erstreckt sich von -0,5 bis 0,5 und stellt die vorzeichenbehaftete Diskrepanz zwischen dem für ein Peptid erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Massendefekt dar. Zusätzlich zur Referenzlinie **22** kann ein Referenzkorridor mit Linien **23**, **24** eingezeichnet werden, der die erwartete Streuung der Peptidmassendefekte um ihren Mittelwert darstellt, unter Berücksichtigung der für eine Messung gegebenen Diskretisierung der Massenachse.

[0044] An einem PMD lassen sich leicht folgende Qualitätseigenschaften eines Spektrums ablesen:

1. Massenbereich mit Peptidsignalen: Ein klar erkennbares Band („Peptidband 21“) in der Nähe der Referenzlinie **22** lässt auf das Vorhandensein von Peptidsignalen in dem jeweiligen Massenbereich schließen. Wo sich die Bandstruktur in einer unstrukturierten Punktwolke verliert (typischerweise erkennbar am oberen Ende der Massenachse, rechts von einer oberen Grenze **30**), geht das Peptidsignal im Rauschen unter (**Fig. 3, Fig. 4**).

2. Massenverschiebung: Weicht das Peptidband **21** erkennbar von der Referenzlinie **22** ab, so lässt dies auf eine Diskrepanz zwischen den wahren und den gemessenen Molekülmassen schließen. Die Größe der Diskrepanz entspricht dem vertikalen Versatz zwischen der Referenzlinie **22** und der Mittellinie **25** des Peptidbands **21**. Der Referenzkorridor gibt dabei den Bereich an, in dem eine Verschiebung durch die jeweilige Diskretisierung der Massenachse erklärbar ist (**Fig. 3, Fig. 5**).

3. Äquidistant oder zu grob gesamplete Massenachse: Ein MALDI-TOF Massenspektrometer diskretisiert die Massenachse typischerweise nicht äquidistant sondern mit zu hohen Massen hin zunehmender Binbreite. Bei der Nachverarbeitung von Spektraldaten werden die Daten häufig auf eine äquidistante Massenachse mit niedrigerer Auflösung resamplert, wodurch ein Genauigkeitsverlust entsteht. Eine äquidistante Massenachse ist im PMD deutlich durch eine lineare Struktur der aufgetragenen Punkte erkennbar (**Fig. 6**). Ist die Auflösung der Daten nach dem Resampling zu niedrig, verliert sich die Struktur des Peptidbandes **21** (**Fig. 6, Fig. 7**).

4. Fehlerhafte Kalibrierung der Massenachse: Bei der Kalibrierung der Massenachse können Fehler auftreten, die zu einer un stetigen Verzerrung der Massenachse führen. Solche Verzerrungen treten im PMD als ein Bruch bzw. Versatz im Peptidband **21** auf (**Fig. 8**).

[0045] Im Vergleich zur Visualisierung mittels herkömmlicher Massendefektdiagramme sind in einem PMD die oben genannten Qualitätsmerkmale eines Spektrums sehr viel deutlicher erkennbar, insbesondere können auch kleinere oder auf Teilabschnitte der Massenachse beschränkte Massenverschiebungen als Abweichungen von der horizontalen Referenzlinie **22** leichter erfasst werden.

[0046] Statt für ein Mittelwertspektrum kann ein PMD auch für ein Einzelspektrum oder für das Maximumspektrum über mehrere Einzelspektren (sog. Skyline-Spektrum) gebildet werden, diese Darstellung ist jedoch weniger aussagekräftig.

[0047] Neben der reinen Visualisierung können die in einem PMD dargestellten Informationen auch wie folgt quantitativ ausgewertet werden (siehe auch mathematische Formulierung weiter unten):

1. Bestimmung der Diskrepanz zwischen gemessenem und erwartetem Peptidmassendefekt in Abhängigkeit von der Masse. Hierzu wird der Median der Massendefekte über Teilintervalle der Massenachse gebildet und mit dem erwarteten Wert verglichen.
2. Bestimmung der Streuung der Massendefekte um deren Mittelwert. Hierzu wird der Interquartilsabstand der Massendefekte über Teilintervalle bestimmt und in ein vorgegebenes Vielfaches der Standardabweichung einer angenommenen Normalverteilung umgerechnet.
3. Bestimmung des Massebereiches mit erkennbarem Peptidsignal. Hierzu wird die aus den Daten bestimmte Streuung der Massendefekte (Bereich zwischen Linien **26**, **27**) mit der Breite des Referenzkorridors (Bereich zwischen Linien **23**, **24**) verglichen und der Bereich ermittelt, in dem die Abweichung innerhalb einer gewählten Toleranz bleibt.

[0048] Diese quantitativen Informationen können sowohl im PMD dargestellt als auch numerisch angezeigt bzw. zur Qualitätsbewertung der Messung weiterverarbeitet werden.

[0049] Wir bezeichnen mit

$$S = (s_j, m_j)_{j=1..n}, \text{ mit } n \in \mathbb{N}, 0 < m_1 < \dots < m_n$$

ein (Einzel-, Mittelwert- oder Skyline-) Spektrum, bestehend aus den n Intensitäten $s_1 \dots s_n$ zu den m/z -Werten $m_1 \dots m_n$. Mit

$\text{floor}(x)$ für $x > 0$

bezeichnen wir den ganzzahligen Anteil einer positiven Zahl x , mit

$$\varphi(x) = x - \text{floor}(x) \text{ für } x > 0$$

bezeichnen wir den Nachkommaanteil einer positiven Zahl x .

[0050] Das PMD der lokalen Maxima von S besteht aus der grafischen Darstellung der Punkte

$$\left\{ (m_i, \delta_P(m_i)) : s_i > \max_{0 < |j-i| \leq u} s_j \right\}$$

wobei $u \in \mathbb{N}$ den Radius der lokalen Umgebung bezeichnet, über die die lokalen Maxima gebildet werden, und die Funktion die vorzeichenbehaftete Diskrepanz zwischen dem für ein Peptid erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Massendefekt beschreibt. Die obige Darstellung der Diskrepanz $\delta_P(m)$ ergibt sich wie folgt:

[0051] Der theoretisch erwartete Massendefekt eines Peptids mit Nominalmasse m_N beträgt

$$m_P - m_N = (1 + r_P) m_N - m_N = r_P m_N.$$

[0052] Zu einer tatsächlich gemessenen Masse m eines Peptids wird dessen Nominalmasse als diejenige ganzzahlige Masse m_N angenommen, für die die absolute Differenz

$$|m - (1 + r_P) m_N|$$

minimiert wird. Dies führt zu

$$m_N = \text{floor} \left(\frac{m}{1 + r_P} + 0,5 \right).$$

[0053] Die Diskrepanz $\delta_P(m)$ ergibt sich aus der Differenz zwischen gemessenem und erwarteten Massendefekt zu

$$\begin{aligned} \delta_P(m) &= \frac{(m - m_N) - (m_P - m_N)}{1 + r_P} = \frac{m - (1 + r_P) m_N}{1 + r_P} = \frac{m}{1 + r_P} - \text{floor} \left(\frac{m}{1 + r_P} + 0,5 \right) \\ &= \varphi \left(\frac{m}{1 + r_P} + 0,5 \right) - 0,5 \end{aligned}$$

[0054] Die Gewichtung der Differenz der Massendefekte mit $1/(1+r_P)$ dient der Normalisierung von $\delta_P(m)$ auf den Wertebereich $[-0,5 \dots 0,5]$.

[0055] Die Referenzlinie **22** der theoretisch erwarteten mittleren Massendefekte von Peptiden wird durch die Nulllinie $\delta_P = 0$ beschrieben. Zur Bestimmung des Referenzkorridors (Linien **23**, **24**) betrachten wir die erwartete Varianz $v(m)$ der Positionen der lokalen Maxima in Abhängigkeit von der Masse, die durch die Summe aus der Varianz der wahren Peptidmassen σ_P^2 und der von der Diskretisierung der Massenachse herrührenden Varianz abgeschätzt werden kann,

$$v(m) = \sigma_P^2(m) + \frac{\Delta m(m)^2}{12}$$

[0056] Darin bezeichnet $\Delta m(m)$ die Breite der m/z -Bins an der Massenposition m . Der Referenzkorridor wird durch die Begrenzungslinien **23**, **24** bzw.

$$d_P^{1,2}(m) = \pm \sqrt{v(m)}$$

gebildet, wobei der Skalierungsfaktor $\mu > 0$ die Breite des Korridors als Vielfaches einer Standardabweichung angibt (typischerweise $\mu = 2$).

[0057] Zu dem Spektrum S sei eine Partitionierung I der Massenachse in paarweise disjunkte Intervalle I_k gegeben:

$$I = (I_k)_{k=1, \dots, K} \text{ mit } K \in \mathbb{N}, U_k I_k = [m_1, m_n].$$

[0058] Zu einem PMD, in dem die Punkte

$$(m_i \delta_P(m_i))_{i \in L} \text{ mit } L = \left\{ i \in \{1 \dots n\} : s_i > \max_{0 < j-i \leq u} s_j \right\}$$

dargestellt sind, wird zur Bestimmung der Massendiskrepanz $E(m)$ für die Teilintervalle I_k die Diskrepanz

$$E_k = \text{median} \{ \delta_P(m_i) : i \in L \cap I_k \}$$

gebildet. Die E_k werden als Punkte über den jeweiligen Mittelpunkten der zugehörigen Teilintervalle I_k dargestellt, dazwischen wird geeignet interpoliert (z.B. linear).

[0059] Die Streuung $e(m)$ der Massendefekte wird in analoger Weise aus den Interquartilsabständen (IQR) gebildet,

$$e_k = \mu \frac{\text{IQR} \{ \delta_P(m_i) : i \in L \cap I_k \}}{2\sqrt{2} \text{erf}^{-1}(0,5)},$$

wobei der Skalierungsfaktor $\mu > 0$ wiederum die Breite des Korridors als Vielfaches einer Standardabweichung angibt, typischerweise $\mu = 2$, und erf die gaußsche Fehlerfunktion bezeichnet.

[0060] Als Massebereich mit erkennbarem Peptidsignal wird derjenige Teil der Massenachse bestimmt, für den das Verhältnis zwischen beobachteter (Linien **26**, **27**) und erwarteter Streuung (Linien **28**, **29**) unterhalb einer festgelegten Toleranzschwelle t bleibt:

$$M_P = \left\{ m \in [m_1, m_n] : \frac{e(m)}{\mu \sqrt{v(m)}} \leq t \right\}.$$

[0061] Ein typischer Toleranzwert ist $t = 1,2$. Die Positionen der äußeren Ränder von MP können im PMD als vertikale Linien eingezeichnet werden.

Bezugszeichenliste

- 20** Grundlinie
- 21** Peptidband
- 22** Referenzlinie
- 23** Linie für Referenzkorridor
- 24** Linie für Referenzkorridor
- 25** Mittellinie als Massendefektdiskrepanz
- 26** Linie für Massendefektstreuung

- 27 Linie für Massendefektstreuung
- 28 Linie für erwartete Streuung
- 29 Linie für erwartete Streuung
- 30 obere Grenze

Patentansprüche

1. Verfahren zum Auswerten von Daten einer Massenspektrometrie zur Analyse einer Vielzahl von Peptiden aus einer biologischen Probe, insbesondere einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie, mit folgenden Schritten:
a) Bereitstellung erwarteter Massendefekte für die Vielzahl von Peptiden, wobei die erwarteten Massendefekte berechnet werden aus

$$m_N r_P,$$

wobei m_N die ganzzahlige Nominalmasse eines Peptids auf einer m/z -Skala bezeichnet und r_P ein Faktor ist, der die Nominalmasse m_N mit einer zugehörigen erwarteten Peptidmasse m_P über die Gleichung $m_P = (1+r_P)m_N$ in Beziehung setzt, wobei die erwartete Peptidmasse m_P auf einer m/z -Skala am dichtesten an einer gemessenen Masse m liegt;

b) Bestimmung gemessener Massendefekte, nämlich der sich aus den Daten der Massenspektrometrie ergebenden Massendefekte, wobei der Massendefekt zu einer gemessenen Masse m auf einer m/z -Skala berechnet wird aus

$$m - \text{floor}\left(\frac{m}{1+r_P} + 0,5\right),$$

wobei die Funktion $\text{floor}(x)$ für ein beliebiges $x > 0$ den ganzzahligen Anteil von x bezeichnet;

c) Vergleich der gemessenen Massendefekte mit den erwarteten Massendefekten für die Vielzahl von Peptiden aus der biologischen Probe unter Ausnutzung eines Peptidmassendefektdiagramms, welches durch eine Transformation erzeugt wird, die Positionen der theoretisch erwarteten Peptidmassendefekte für die Vielzahl von Peptiden auf einer Referenzlinie abbildet, die eine waagerechte Nulllinie ist, wobei eine vertikale Achse sich von $-0,5$ bis $0,5$ erstreckt und eine vorzeichenbehaftete Diskrepanz zwischen dem für ein Peptid erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Massendefekt darstellt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass r_P zwischen 10^{-3} und 10^{-4} liegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass r_P etwa $4,95 \times 10^{-4}$ beträgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Diskrepanz δ_P zwischen dem gemessenen und dem erwarteten Massendefekt direkt aus der gemessenen Masse m berechnet wird als

$$\delta_P(m) = \phi\left(\frac{m}{1+r_P} + 0,5\right) - 0,5$$

wobei die Funktion $\phi(x) = x - \text{floor}(x)$ den Nachkommaanteil von x für ein beliebiges $x > 0$ bezeichnet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass zum Vergleich der gemessenen Massendefekte mit den erwarteten Massendefekten über Teilintervalle einer Massenachse jeweils der Median der gemessenen Massendefekte gebildet und mit dem erwarteten Massendefekt verglichen wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei weiterer Verwendung der Daten die Messwerte korrigiert werden, nämlich in Abhängigkeit von der Abweichung der gemessenen Massendefekte von den erwarteten Massendefekten.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die gemessenen Massendefekte für lokale Maxima der spektralen Intensitäten berechnet werden.

8. Verfahren zum Auswerten von Daten einer Massenspektrometrie zur Analyse einer Vielzahl von Peptiden aus einer biologischen Probe, insbesondere einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie, vorzugsweise nach einem der voranstehenden Ansprüche, mit folgenden Schritten:

a) Bereitstellung erwarteter Massendefekte für die Vielzahl von Peptiden, wobei die erwarteten Massendefekte berechnet werden aus

$$m_N r_p,$$

wobei m_N die ganzzahlige Nominalmasse eines Peptids auf einer m/z -Skala bezeichnet und r_p ein Faktor ist, der die Nominalmasse m_N mit einer zugehörigen erwarteten Peptidmasse m_p über die Gleichung $m_p = (1+r_p)m_N$ in Beziehung setzt, wobei die erwartete Peptidmasse m_p auf einer m/z -Skala am dichtesten an einer gemessenen Masse m liegt;

b) Bestimmung gemessener Massendefekte, nämlich der sich aus den Daten der Massenspektrometrie ergebenden Massendefekte, wobei der Massendefekt zu einer gemessenen Masse m auf einer m/z -Skala berechnet wird aus

$$m - \text{floor}\left(\frac{m}{1+r_p} + 0,5\right),$$

wobei die Funktion $\text{floor}(x)$ für ein beliebiges $x > 0$ den ganzzahligen Anteil von x bezeichnet;

c) Bestimmung der Diskrepanzen zwischen den gemessenen Massendefekten und den erwarteten Massendefekten;

d) Bestimmung der Streuung der Diskrepanzen um deren Mittelwert;

e) Vergleich der Streuung mit einer definierten zulässigen Streuung.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Bestimmung einer Streuung der Massendefektdiskrepanzen Interquartilsabstände der ermittelten Diskrepanzen über Teilintervalle der Massenachse bestimmt werden, und dass bei Überschreitung eines Grenzwertes der Streuung insbesondere die Daten als fehlerhaft verworfen werden.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Korridor für zulässige Streuungen gebildet ist durch Grenzwerte

$$d_p^{1,2}(m) = \pm \mu \sqrt{v(m)}$$

wobei

$$v(m) = \sigma_p^2(m) + \frac{\Delta m(m)^2}{12}$$

und

$$\sigma_p(m_N) = \sigma_0 \cdot s_p \cdot m_N, \text{ mit } \sigma_0 \approx 0,02 \text{ und } s_p \approx 2,0 \times 10^{-5},$$

und $\Delta m(m)$ die Breite von m/z -Bins an der Massenposition m bezeichnet, und m/z -Bins die sich durch Diskretisierung der Massenachse ergebenden Intervalle repräsentieren,

und $\mu > 0$ einen Skalierungsfaktor angibt, vorzugsweise $\mu = 2$,

und dass insbesondere die Daten als fehlerhaft verworfen werden, wenn die Streuung der Massendefektdiskrepanzen außerhalb des derart vorgegebenen Korridors liegt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Massebereich mit erkennbarem Peptidsignal bestimmt wird als die Gesamtheit aller Teilintervalle der Massenachse, für die der Quotient aus der tatsächlichen Streuung und der maximal zulässigen Streuung $d_p(m)$ einen festgelegten Schwellwert t nicht überschreitet, wobei vorzugsweise $t = 1,2$ festgelegt wird, und dass bei Über- oder Unterschreitung eines Grenzwertes für die untere bzw. obere Grenze dieses Massebereiches oder dessen Ausdehnung insbesondere die Daten als fehlerhaft verworfen werden.

12. Massenspektrometrisches Verfahren zur Analyse einer Vielzahl von Peptiden aus einer biologischen Probe, insbesondere unter Verwendung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers, mit folgenden Schritten:
- a) Durchführung eines oder mehrerer massenspektrometrischer Untersuchungen an der biologischen Probe und Bereitstellung von sich aus den massenspektrometrischen Untersuchungen ergebenden Daten;
 - b) Durchführung des Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche.

Es folgen 8 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

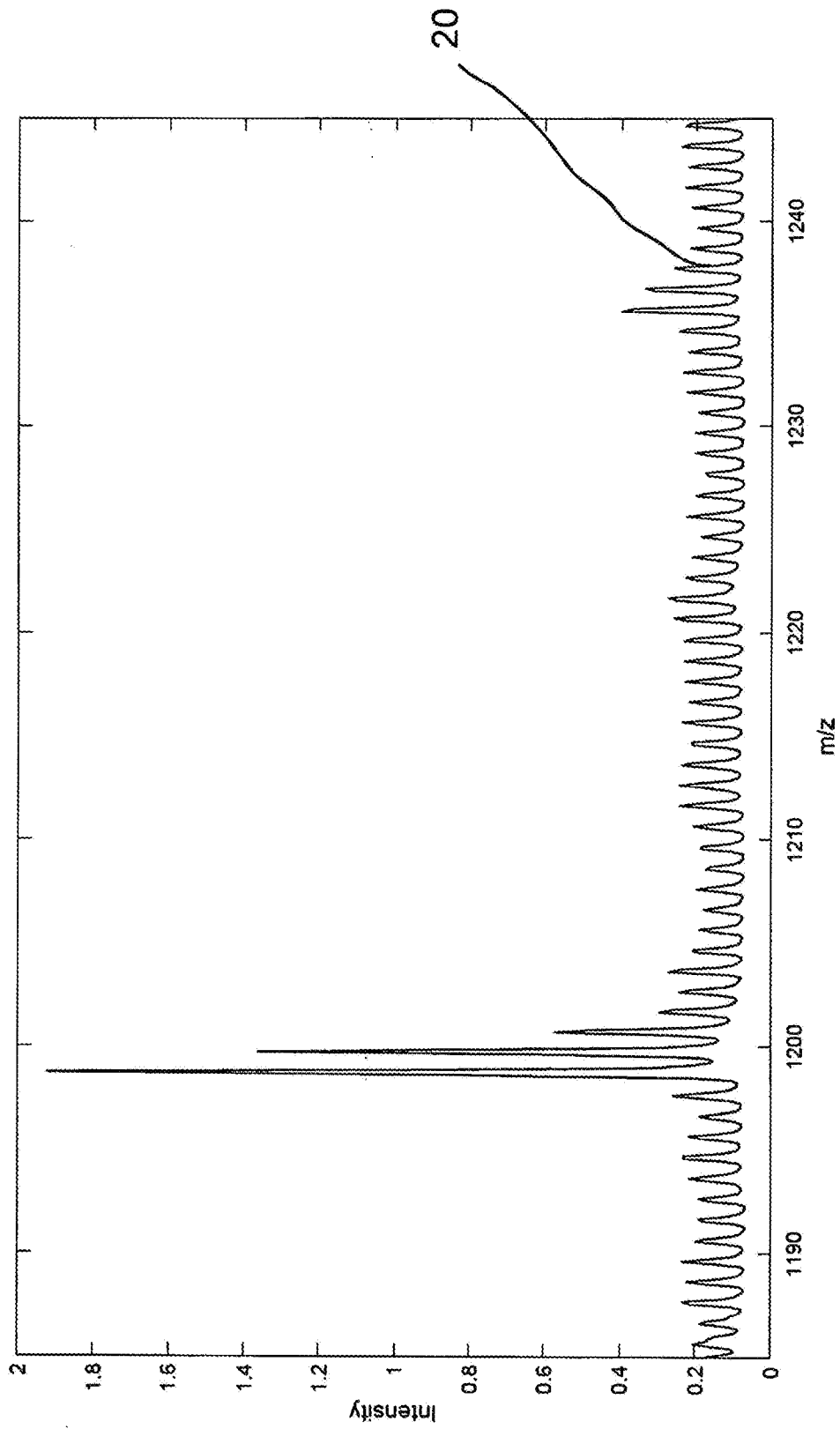


Fig. 1

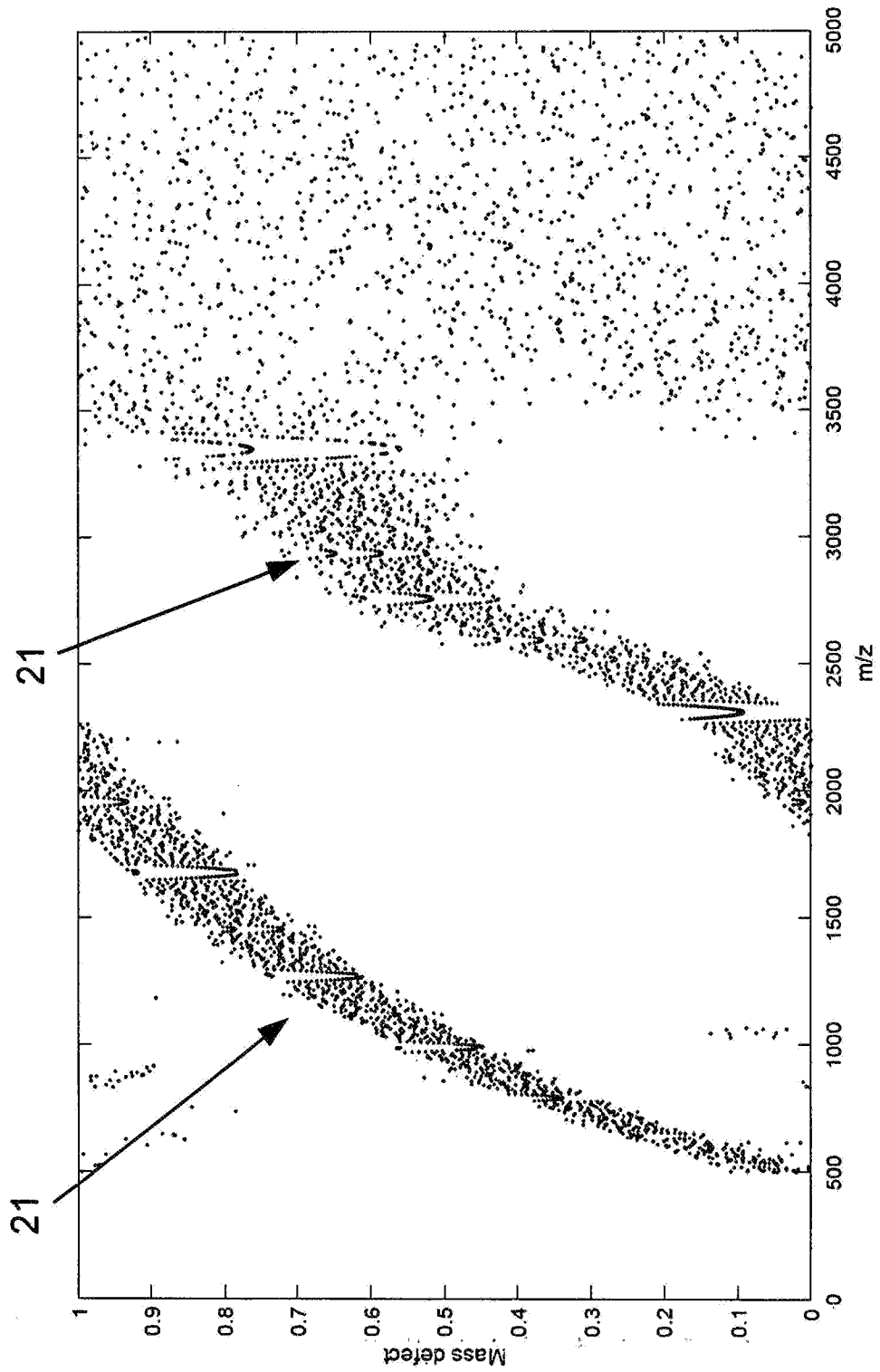


Fig. 2

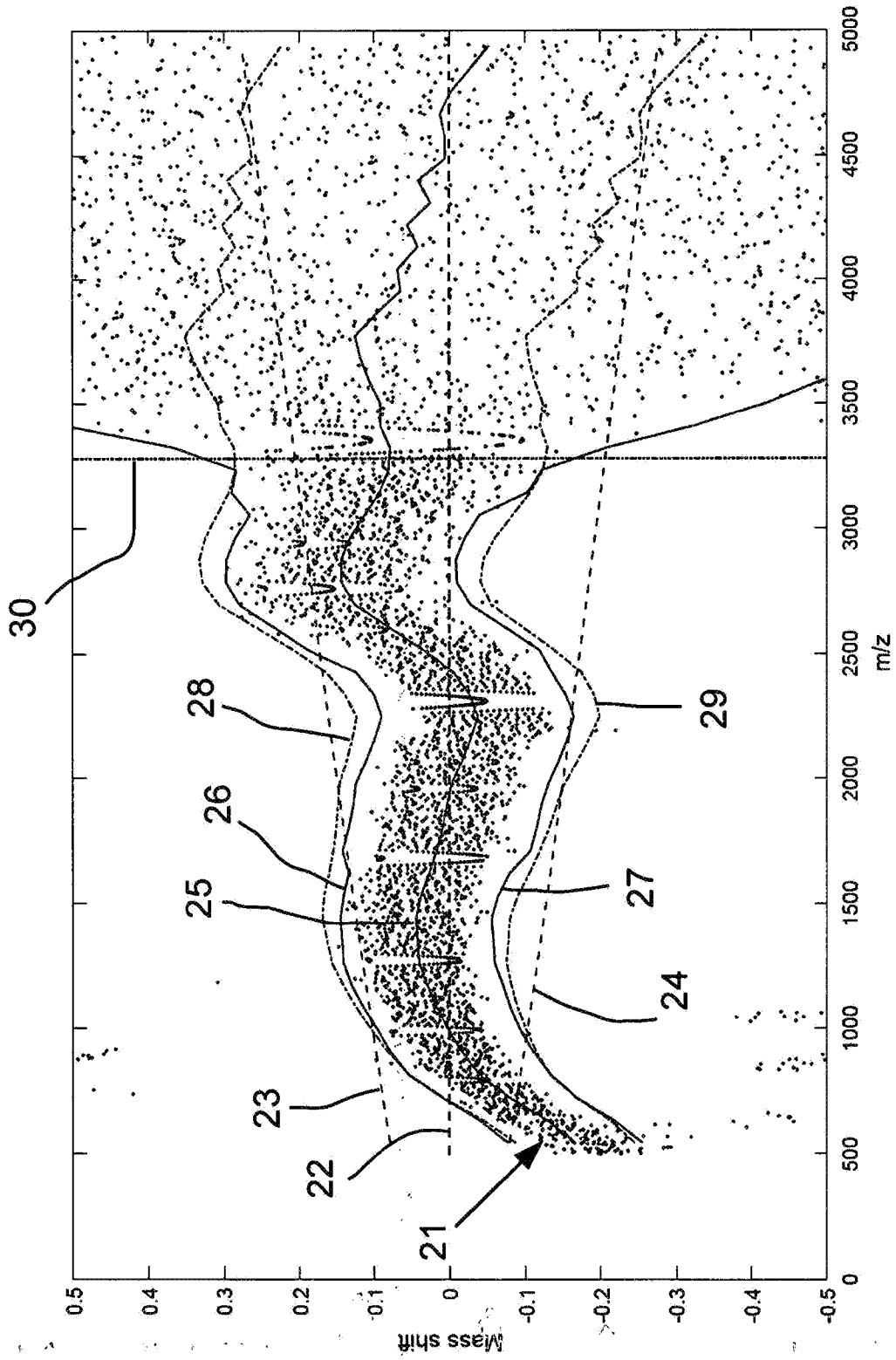


Fig. 3

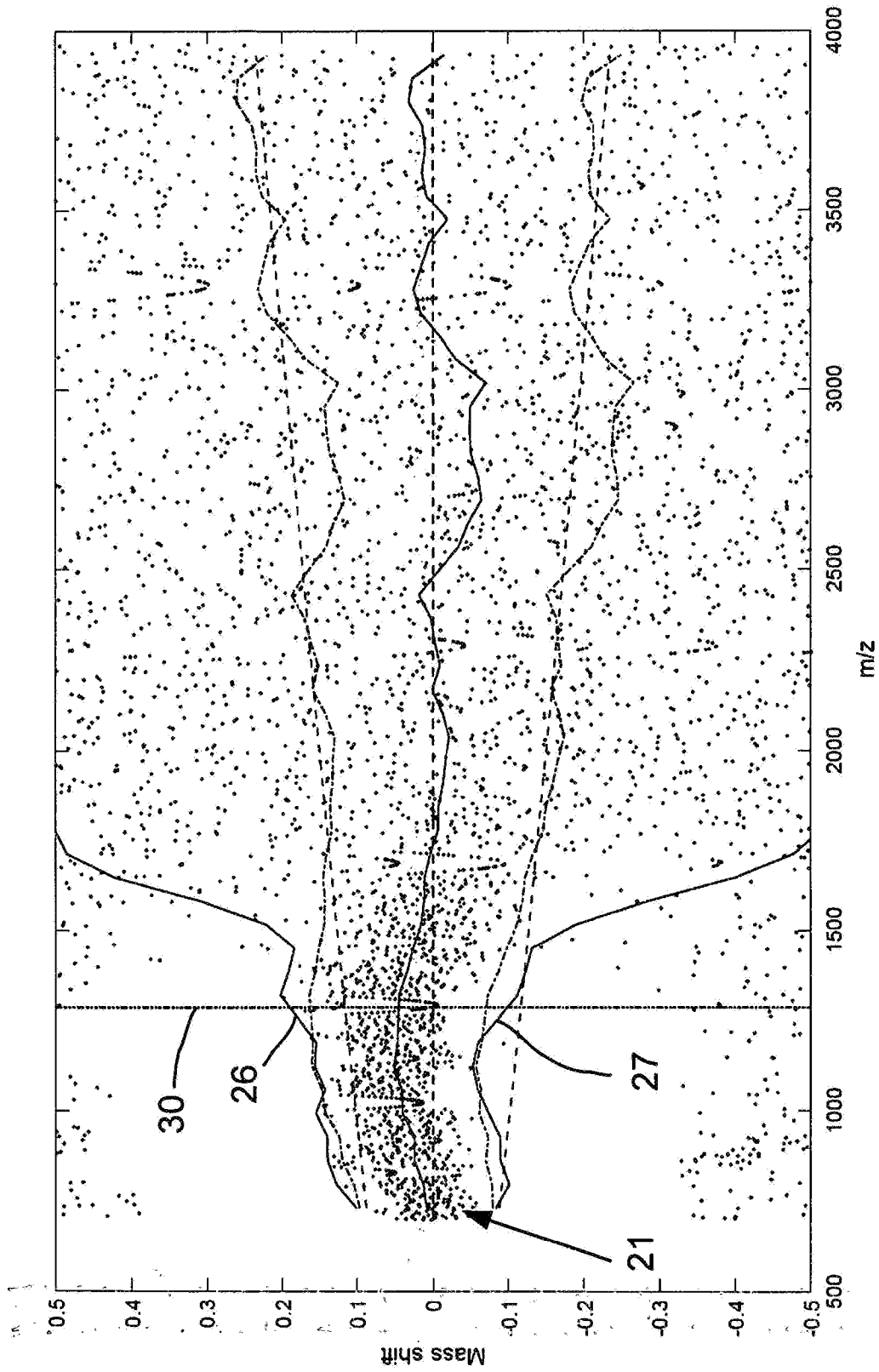


Fig. 4

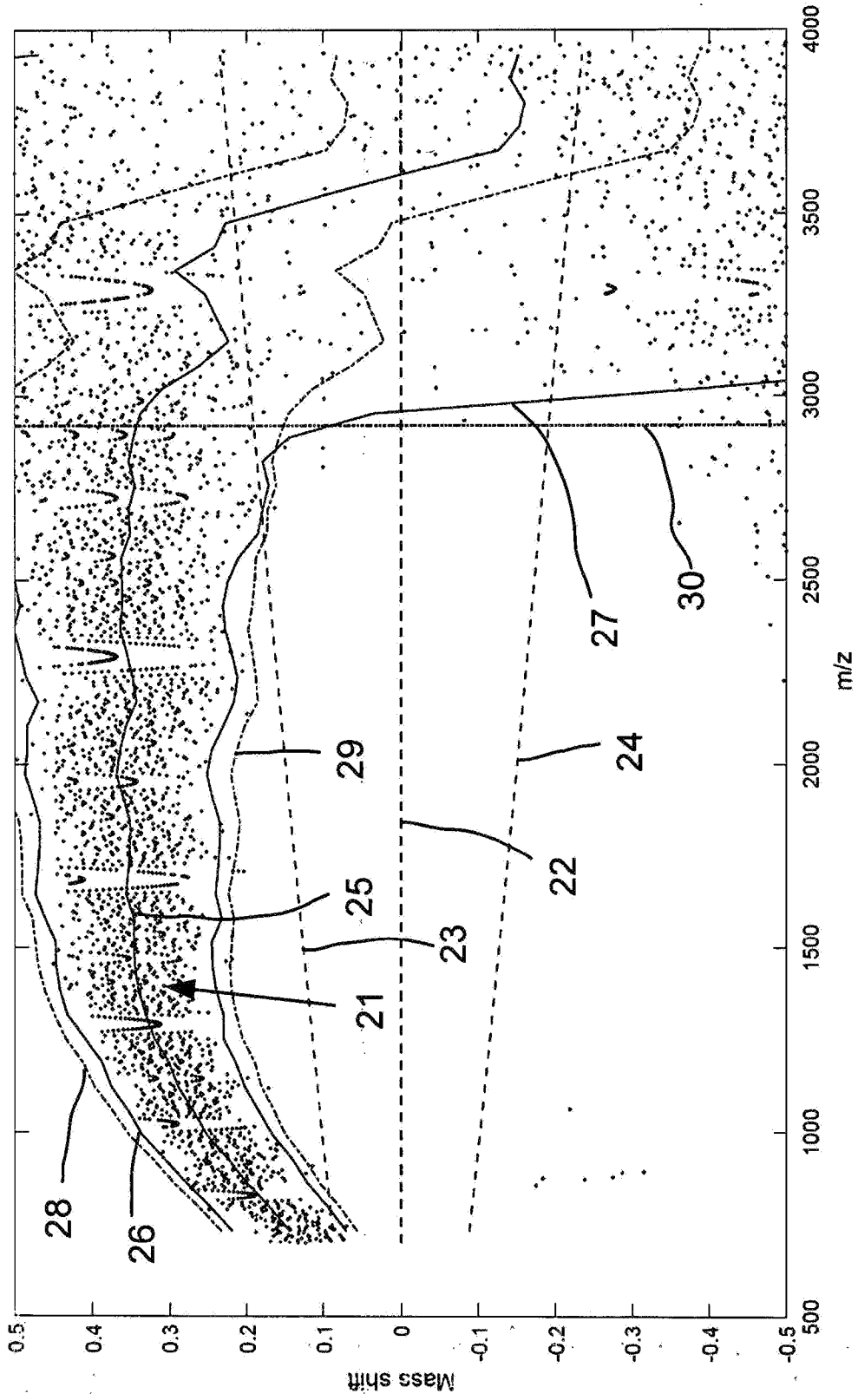


Fig. 5

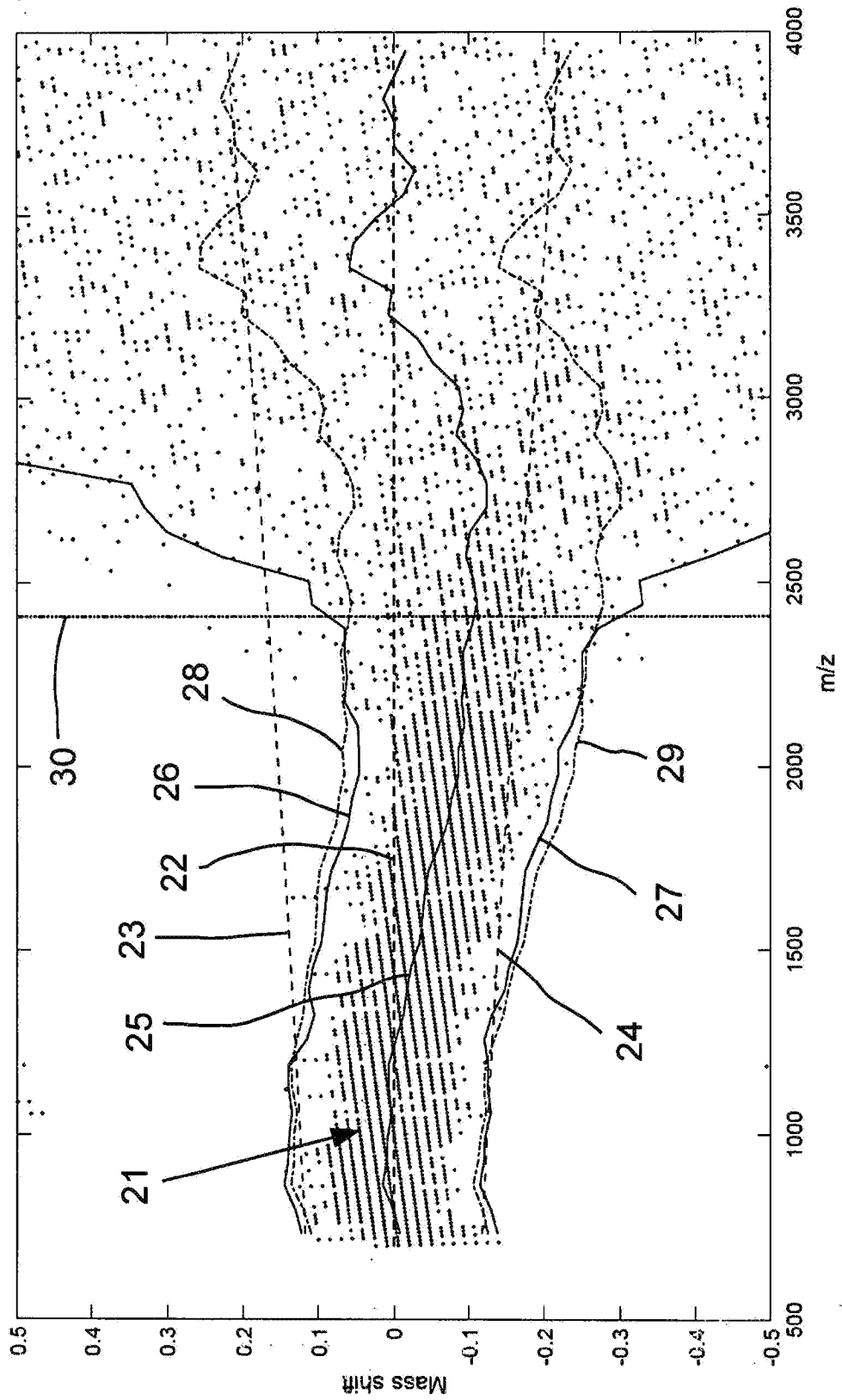


Fig. 6

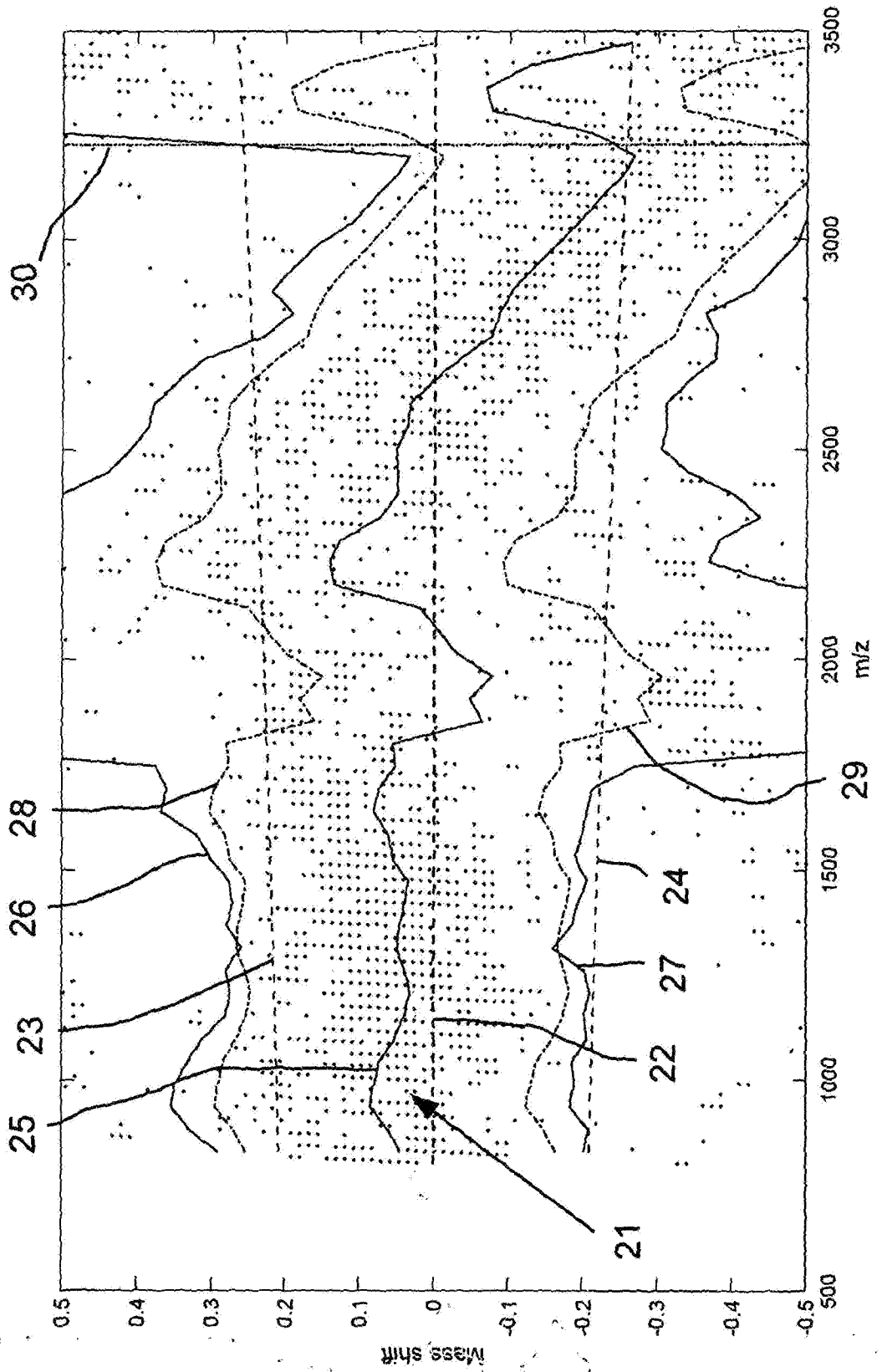


Fig. 7

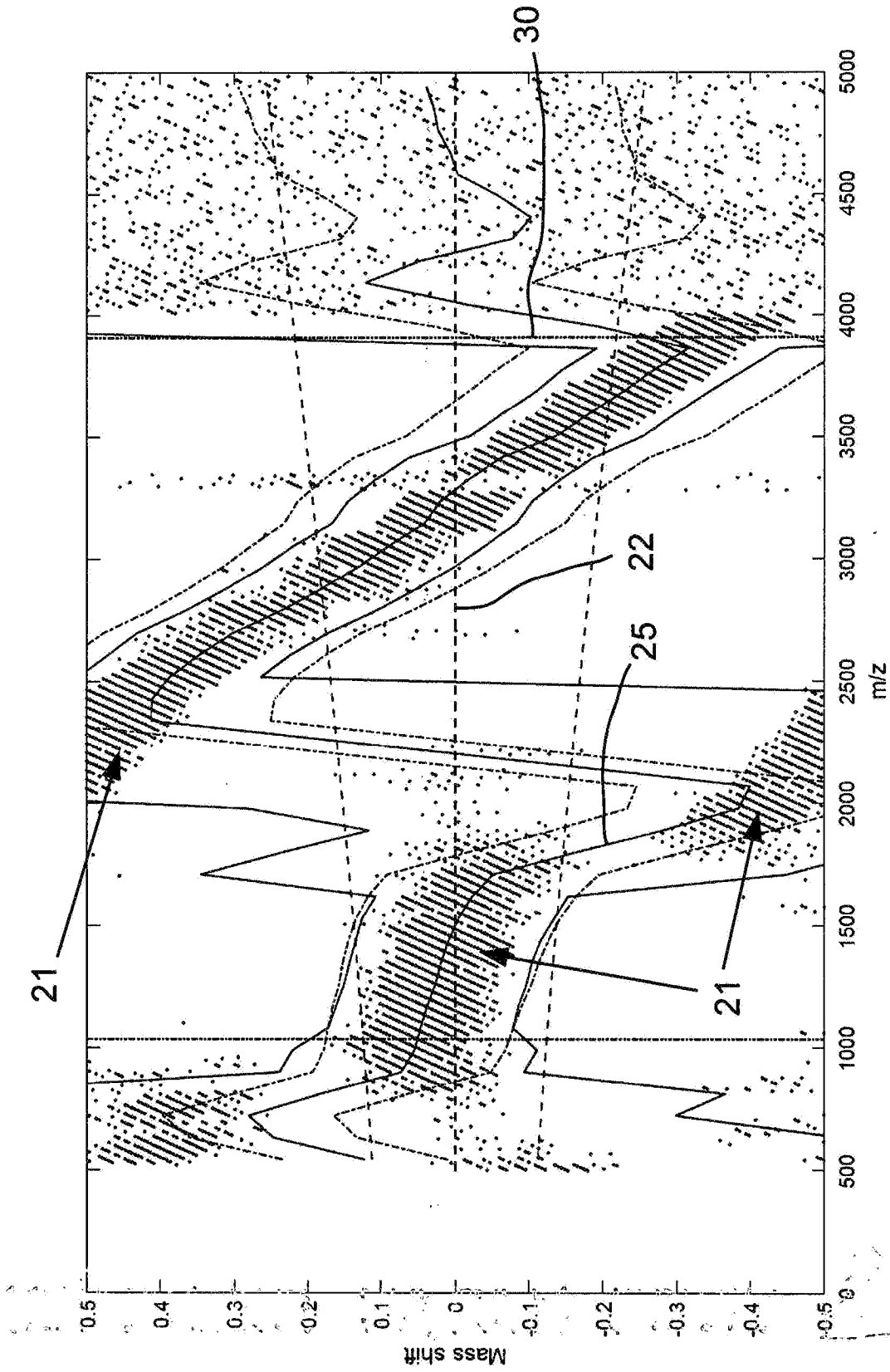


Fig. 8