

Goethe Universität

Fachbereich 14

Pharmazie

Dissertation

**Methodenentwicklung zur Extraktion,
Modifikation und Analyse proteomischer
Proben auf Silicaoberflächen**

Yannik Lewin

Frankfurt am Main (2019)

Vom Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Michael Karas

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jochen Klein

Abgabetermin: 28.11.2019

Bearbeitungszeit: 10 Semester

Datum der Disputation: 26.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung	13
1.1 Proteinanalytik.....	13
1.1.1 Proteine	13
1.1.2 Analytik.....	15
1.2 Proteinadsorption.....	16
1.2.1 Grundlagen der Adsorption	16
1.2.2 Einflussfaktoren der Adsorption.....	16
1.2.3 Kosmotrope und chaotrope Reagenzien.....	17
1.2.4 Thermodynamik der Proteinadsorption.....	18
1.2.5 Protein-Silica-Interaktion	19
2 Methoden der Analytik.....	21
2.1 Methoden der Probenvorbereitung.....	22
2.1.1 Probengewinnung/Zell-Lyse.....	22
2.1.2 Extraktion und Aufreinigung.....	22
2.1.3 Ermittlung der Ausbeute	25
2.1.4 Modifizierung	25
2.1.5 Proteolytischer Verdau.....	27
2.2 Chromatographische Methoden.....	29
2.2.1 Gelelektrophorese (GE).....	29
2.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	31
2.3 Massenspektrometrie.....	32
2.3.1 Ionisierungsverfahren.....	32
2.3.2 Massenanalysatoren	34
2.3.3 Peptidfragmentierung.....	38
2.4 Bioinformatics, Datenanalyse.....	39
2.4.1 Dateiprozessierung.....	39
2.4.2 Datenbanksuche	40
2.4.3 Datenanalyse.....	42
2.5 Quantitative Massenspektrometrie.....	43
2.5.1 Markierung mit schweren Isotopen.....	44
2.5.2 Normalized Spectral Abundance Factor - NSAF.....	44
3 Zielsetzung der Arbeit.....	46

4	Material und Methoden	48
4.1	Materialien, Geräte und Programme	48
4.1.1	Modellproteine und Proteome	48
4.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	49
4.1.3	Geräte	50
4.1.4	Software	50
4.2	Probenvorbereitung	51
4.2.1	Enzymatischer Verdau gelöster Proteine.....	51
4.2.2	Zellkultur und Zellernte.....	51
4.2.3	Zell-Lyse	52
4.2.4	Acetonfällung	52
4.2.5	Filter Aided Sample Preparation (FASP)	53
4.2.6	Kovalentes Binden an paramagnetische Beads.....	54
4.2.7	Unspezifische Adsorption an paramagnetische Silica-Beads	55
4.2.8	Alternative Proteinmodifikation	56
4.2.10	Peptidaufreinigung und Aufkonzentration	57
4.3	Biotechnologische Probenanalyse.....	58
4.3.1	Bicinchoninic acid (BCA) assay	58
4.3.2	Tryptophan Assay	59
4.3.3	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.....	59
4.4	SDS-PAGE.....	60
4.4.1	Polyacrylamid Gele.....	60
4.4.2	Elektrophorese	61
4.4.3	Detektionsmethoden.....	61
4.5	Massenspektrometrische Analyse	62
4.5.1	MALDI LTQ-Orbitrap XL.....	62
4.5.2	ESI: HPLC-MS/MS	62
4.6	Datenanalyse.....	64
4.6.1	Dateiprozessierung.....	64
4.6.2	Datenbanksuche	64
4.6.3	Protein- und Peptidlistenanalyse.....	66
5	Ergebnisse	69
5.1	Adsorption von Proteinen auf magnetischen Silica-Beads.....	69
5.1.1	Mikroskopische Untersuchung der Protein-Silica Adsorption	69
5.1.2	Optimierung der Extraktion auf Silica Beads	74
5.1.3	Diskussion	81
5.2	Tryptischer Verdau auf Silicabeads	82
5.2.1	SDS-PAGE Analyse der Probenvorbereitung	82
5.2.2	Finales Protokoll und Diskussion	85
5.3	ArgC-analoger Verdau auf Silicabeads	86
5.3.1	Probenvorbereitung für ArgC-analogen Verdau auf Silicabeads.....	86
5.3.2	Immobilisierungsrate im Vergleich zu Trypsin	87
5.4	ArgC-analoger Verdau nach Extraktion aus Zell-Lysaten	88

5.4.1	Vergleich der Probenvorbereitungen von <i>E. coli</i> zur LC-MS/MS Analyse	89
5.4.2	Diskussion	98
5.5	Probenvorbereitung mit Silica Beads im Vergleich zu FASP und Verdau in Lösung	99
5.5.1	Arbeits- und Zeitaufwand der Probenvorbereitung.....	100
5.5.2	Vergleichende MS-Analyse.....	101
5.5.3	Weiterführende Datenanalyse der Peptidlisten	104
5.5.4	Diskussion	110
5.6	Propionylierung auf Peptidebene	111
5.6.1	Quantitative Umsetzung mit Propionsäureanhydrid	111
5.6.2	Optimierung der Propionylierung	112
5.7	Vergleich von tryptischem Verdau nach ABP und ArgC-analogen Verdau	113
5.7.1	Vergleich der ArgC-analogen Ansätze.....	114
5.7.2	Interludium: Carbamylierung von Lysin durch Harnstoff	116
5.7.3	Vergleich identifizierter Proteine nach optimiertem ArgC-analogen und tryptischem Verdau	118
5.7.4	Analyse der identifizierten Peptide nach tryptischem und ArgC-analogen Verdau 124	
5.7.5	Fragmentierungsverhalten der Vorläuferionen	126
5.7.6	Zusammenfassung und Diskussion	129
5.8	Limits des adsorptionsbasierten Protokolls	130
5.8.1	Hintergrund.....	130
5.8.2	Einfluss auf Identifikationszahlen.....	131
5.8.3	Zusammenhang zwischen Identifikationszahl und Abundanz.....	132
5.8.4	Diskussion	134
5.9	Simultane Proteinmodifikation	135
5.9.1	Versuchsaufbau.....	136
5.9.2	Auswertung.....	136
5.9.3	Proteinidentifikationen	136
5.9.4	Zusammenhang zwischen Abundanz und Identifikationszahl.....	138
5.9.5	Ionscores.....	139
5.9.6	Diskussion	140
6	Diskussion.....	142
6.1	Ergänzende Diskussion	142
6.2	Ausblicke.....	146
7	Zusammenfassung.....	147
Anhang	VII
Anhang 1: Quantifizierung via Propionylierung		VII
Anhang 2: Verwendete Geräte		VIII
Anhang 3: Verwendete Chemikalien		IX
Anhang 4: Verwendete Software.....		X
Literaturverzeichnis.....		VII

Wissenschaftliche Publikationen und Vorträge	XX
Publikationen in Fachzeitschriften.....	XX
Wissenschaftliche Vorträge.....	XX
Postervorstellungen.....	XXI
Tagungsbesuche.....	XXI
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Eidesstattliche Versicherung	XXII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Proteinogene Aminosäuren	14
Abb. 1.2: Komplexität des Proteoms im Vergleich zum Genom.....	15
Abb. 2.1: Proteomische Ansätze zur LC-MS/MS Analytik	21
Abb. 2.2: Workflow des enhanced FASP Protokolls	23
Abb. 2.3: Beispiel einer Bead-basierte Immunopräzipitation	24
Abb. 2.4: Carbamylierung von Cystein am Thiol.....	25
Abb. 2.5: Acetylierung des primären Amins am Lysin.....	26
Abb. 2.6: Derivatisierung von Lysin mittels NHS-Ester.....	26
Abb. 2.7: Derivatisierung von Cystein durch Maleimidverbindungen	26
Abb. 2.8: Mechanismus des ArgC-analogen Verdau	28
Abb. 2.9: Vereinfacht dargestellter Aufbau einer HPLC-MS Kopplung	31
Abb. 2.10: Schematischer Aufbau MALDI.....	33
Abb. 2.11: Schematischer Aufbau der Elektrospray Ionisierung.....	34
Abb. 2.12: Aufbau TOF Massenanalysator mit Reflektor (ReTOF).....	35
Abb. 2.13: Vereinfachter Aufbau eines Quadrupols.....	36
Abb. 2.14: Schematischer Aufbau des Orbitrap Massenanalysators	37
Abb. 2.15: Fragmentierung der Vorläuferionen	38
Abb. 2.16: Ablauf des Peptide Mass Fingerprintings	40
Abb. 2.17: Strategien zur relativen Quantifizierung in der Massenspektrometrie.....	43
Abb. 2.18: MALDI-Spektren des Peptids AAAAKAAAAR.....	44
Abb. 4.1: Funktionsweise des BCA-Assays	59
Abb. 4.2: Beispiel eines KNIME-Workflows.....	66
Abb. 5.1: Tryptophan-Fluoreszenzmessung magnetischer Silicapartikel	70
Abb. 5.2: 10-fache Vergrößerung der Aggregate aus BSA und Silicabeads	72
Abb. 5.3: Fluoreszenzmarkiertes BSA auf Silicabeads.....	73
Abb. 5.4: Proteingehalt im Überstand nach Inkubation von <i>E. coli</i> Lysat auf Silicabeads .	74
Abb. 5.5: Wiederfindungsrate von apo-Serotransferrin	76
Abb. 5.6: Wiederfindungsrate des adsorbierten AST auf Silicabeads	78
Abb. 5.7: Zeitabhängigkeit der Adsorption von AST auf der Silicaoberfläche.....	80
Abb. 5.8: Mit Coomassie Blau eingefärbtes Polyacrylamid-Gel.....	83
Abb. 5.9: SYPRO Ruby gefärbtes PAA Gel	84
Abb. 5.10: Workflow der kompletten Probenvorbereitung mit Silicabeads	85
Abb. 5.11: Wiederfindungsrate nach Propionylierung.....	87
Abb. 5.12: Vereinfachte Übersicht zum ArgC-analogen Verdau auf Silicabeads ¹²⁰	88
Abb. 5.13: Auswertung des BBA- und UL-Protokolls für <i>E. coli</i> Lysat.....	91
Abb. 5.14: IDs und Ionscores von BBA und UL für humanes Proteom	94
Abb. 5.15: Ausgewertete MS/MS-Signale (Hits)	95
Abb. 5.16: Eigenschaften aller identifizierten Proteine	96
Abb. 5.17: Eigenschaften der Proteine der Differenzmengen,	96
Abb. 5.18: Histogramm der GRAVY-Scores	97
Abb. 5.19: Prognostizierte Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle.	98
Abb. 5.20: Zeitstrahl für die praktische Anwendung der zu vergleichenden Methoden	100

Abb. 5.21: Identifikationen aus den Methoden zur Probenvorbereitung	101
Abb. 5.22: Venn-Diagramm der Proteinidentifikationen mit AP/IS und ABP (A);	103
Abb. 5.23: Histogramm der Größenverteilung nach Länge der Aminosäuresequenz.....	104
Abb. 5.24: Verteilungen von GRAVY-Scores und isoelektrischer Punkte.....	105
Abb. 5.25: Verteilungen der Aminosäuren pro Peptid nach physikochem. Eigenschaft ...	107
Abb. 5.26: Anteil an methioninhaltigen Peptiden mit mindestens einer Oxidation.....	108
Abb. 5.27: Eisenkatalysierte Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid.	109
Abb. 5.28: MALDI Spektren des Peptids AAAAKAAAAR	111
Abb. 5.29: Entstehung von Methylestern durch PA	112
Abb. 5.30: Venn-Diagramme der identifizierten Proteine	115
Abb. 5.31: Identifikationen und zugrundeliegende PSMs.....	118
Abb. 5.32: Scatterplots der Zuweisungen von Peptiden zu MS/MS-Spektren.....	120
Abb. 5.33: GRAVY-Scores und isoelektrische Punkte der Proteine	123
Abb. 5.34: Verteilung der Massen der Vorläuferionen	124
Abb. 5.35: Verteilung des Aminosäureanteils nach Eigenschaft ihrer Seitenketten.....	125
Abb. 5.36: Überschüsse der y-Fragmentionen nach Massenbereich	127
Abb. 5.37: Intensity Coverage mit Berücksichtigung des Neutralverlusts.....	128
Abb. 5.38: Darstellung der Abhängigkeit der von der eingesetzten Probenmenge.	131
Abb. 5.39: Zusammenhänge zwischen Identifikationen, eingesetzter Probenmenge und Protein-Abundanz	132
Abb. 5.40: Boxplots der NSAF-Werte in Abhängigkeit der eingesetzten Probenmenge...	133
Abb. 5.41: Vergleich von FASP, SP3, iST hinsichtlich Protein IDs	133
Abb. 5.42: Timelines der zu vergleichenden Methoden.....	135
Abb. 5.43: IDs der Ansätze als Venn-Diagramm (A) und im Mittel pro Replikat (B).....	137
Abb. 5.44: NSAF-Werte im Vergleich	137
Abb. 5.45: Verteilung von GRAVY Score und IP der identifizierten Proteine.....	138
Abb. 5.46: Absolute Ionscore-Verteilung der drei Präparationsansätze	139
Abb. 5.47: Verkürztes Protokoll für den ArgC-analogen Verdau	140
Abb. 6.1: Proteinadsorption an Silica ohne aktive Denaturierung.....	143
Abb. 6.2: Proteinadsorption mit chemischer Denaturierung und Modifizierung.....	144
Abb. 0.1: Relative Signalintensität in Abhängigkeit der Peptidkonzentration.	VII
Abb. 0.2: Signale des schwer und leicht gelabelten Peptids.....	VII

Tabellenverzeichnis

Tab. 4-1: Verwendete Proteine und Proteome.....	48
Tab. 4-2: Verwendete Python Module.....	67
Tab. 5-1: Versuchsansatz zum Vergleich von Reagenzien zur Zell-Lyse.....	75
Tab. 5-2: Ansatz zum Einfluss von Harnstoff auf die Adsorption.....	78
Tab. 5-3: Legende zur Analyse mit SDS-PAGE	82
Tab. 5-4: Identifizierte Peptide und Proteine inkl. False Discovery Rates (FDR).....	90
Tab. 5-5 Identifizierte Proteine nach ihrer Herkunft in der Zelle	90
Tab. 5-6 Identifikationen von Peptiden und Proteinen	93
Tab. 5-7: Identifizierte Peptide und Proteine, <i>False Discovery Rate</i>	102
Tab. 5-8 Peptide der Differenzmengen separiert nach <i>Missed Cleavages</i>	105
Tab. 5-9: Probenansätze der Protokolle Tryptisch, ArgC-MeOH und ArgC-ACN.....	113
Tab. 5-10 Identifikationen, False Discovery Rates, Missed Cleavages	114
Tab. 5-11 Carbamylierungsrate von Lysinen der Replikate von ArgC-ACN	117
Tab. 5-12: Identifizierte Histone.....	121
Tab. 5-13: Identifizierte Proteine nach Zellstruktur.....	122
Tab. 5-14: Einteilung Vorläuferionen (VLI) in Massenbereiche.....	126
Tab. 5-15: Downscaling Ansatz	130
Tab. 5-16: Identifikationen und FDR.....	136
Tab. 0-1 Verwendete Geräte.....	VIII
Tab. 0-2 Verwendete Gefäße.....	VIII
Tab. 0-3: Verwendete Chemikalien	IX
Tab. 0-4: Verwendete Softwares	X

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
ACN	Acetonitril
AGC	Automatic Gain Control
AST	apo-Serotransferrin
BCA	Bichinoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CID	Collision Induced Decay
CIAA	Chloracetamid
CRM	Charged Residue Model
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOE	Design of Experiment
DTT	Dithiothreitol
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure
FASP	Filter-Aided Sample Preparation
FDR	False Discovery Rate
FWHM	Full Width at Half Minimum
HAc	Essigsäure
HCD	High energy Collisional Dissociation
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Iodacetamid
IEM	Ion Evaporation Model
ISD	In-Source Decay
k	Kilo
LTQ	Linear Ion Trap Quadrupole
M	Molar
m/z	Masse/Ladung
MALDI	Matrix Assistierte Laser Desorptions Ionisierung
MeOH	Methanol
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
n	nano
NHS	N-Hydroxy-Succinimid

P	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PFF	Peptide Fragment Fingerprinting
ppm	Parts per Million
PTM	Posttranslationale Modifikation
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Tetrafluoressigsäure
TOF	Time of Flight

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Proteinanalytik

1.1.1 Proteine

Das noch relativ junge Forschungsgebiet der Proteomik - welches einen direkten Nachkommen des Human-Genome-Projects darstellt - beschäftigt sich mit der Aufklärung der Gesamtheit der Proteine und erhielt seinen Namen in Anlehnung an die Genomik. Allgemein lassen sich biogene Makromoleküle in drei Klassen aufteilen: Während Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus 4 Nukleotiden aufgebaut ist und Kohlenhydrate aus Zuckereinheiten bestehen, stellen Proteine die dritte Gruppe biogener Makromoleküle dar, welche sich aus 21 biologisch vorkommenden Aminosäuren (AS) zusammensetzen. Die Beschreibung des humanen Proteoms ist gegenüber der des Genoms weit komplexer, da sich Proteine nicht nur in Isoformen, Lokalisation und Abundanz unterscheiden, sondern - bedingt durch ihre Primär-, Sekundär-, Tertiär- teilweise Quartärstruktur - sehr verschiedene Eigenschaften in Größe, Ladung und Polarität aufweisen. Dies ist durch die physikochemisch stark diversen Aminosäuren bedingt, deren Seitenketten ihre Eigenschaften in Ladung, Polarität und Reaktivität definieren. Die Sequenz der Aminosäuren bildet die sogenannte Primärstruktur. Die Sekundärstruktur beschreibt lokale Strukturen innerhalb des Makromoleküls und geht aus intramolekularen Wechselwirkungen zwischen einzelnen AS der Primärstruktur hervor. Die Tertiärstruktur beschreibt den gesamten Aufbau des Proteins im Raum, während die Quartärstruktur den Aufbau eines Komplexes aus zwei oder mehreren Tertiärstrukturen beschreibt. Die Primärstruktur bestimmt damit direkt und indirekt die physikochemischen Eigenschaften des Proteins, indem sie einerseits direkt mit der Komposition aus Aminosäuren die Lipophilie und Acidität bestimmt, andererseits indirekt durch die Faltung in Sekundär- und Tertiärstruktur beeinflusst, welche Sektionen des Proteins exponiert und welche nach innen gekehrt vorliegen.

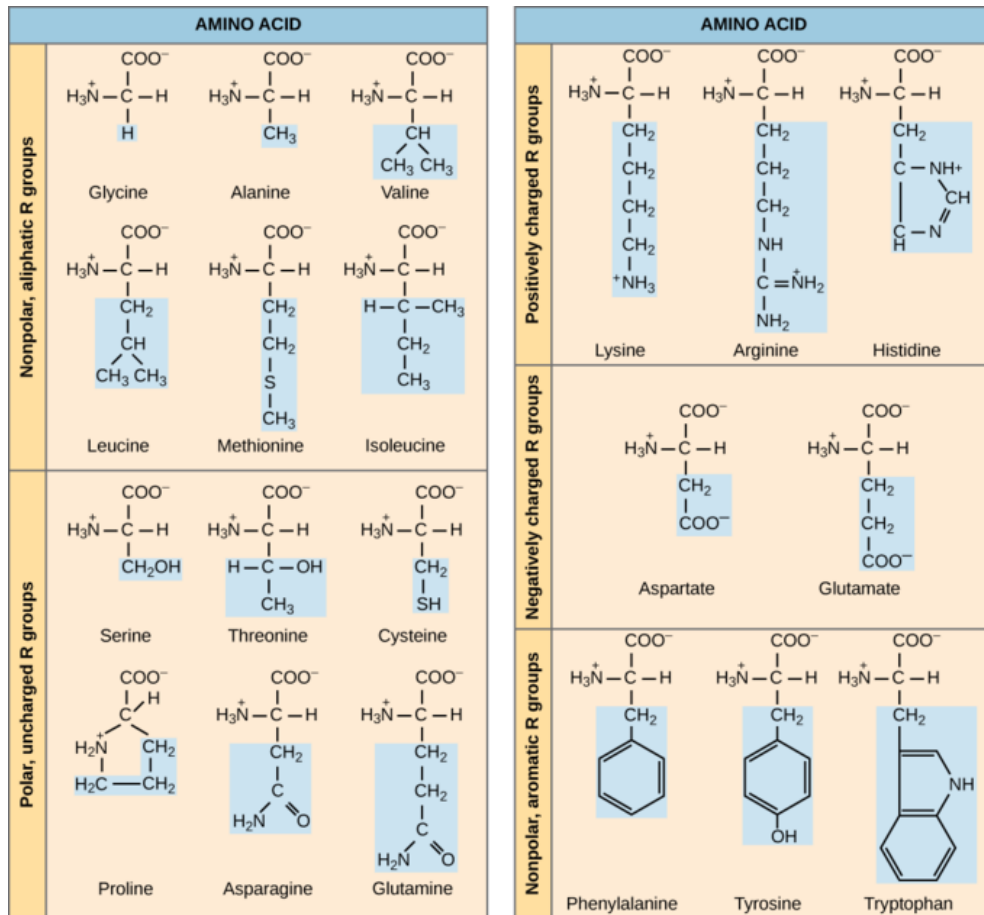


Abb. 1.1: Proteinogene Aminosäuren

sortiert nach physikochemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten
(Biology Libre Texts, April 2019. Web. CC BY-NC-SA 3.0 US)

1.1.2 Analytik

Während das Genom mit einer gleichbleibenden Anzahl Chromosomen konstant ist, ist das Proteom durch variierende Expression der Proteine sowie deren Abbau weit dynamischer und mehr als eine Momentaufnahme unter definierten Bedingungen zu betrachten. Das zwischen Transkription der DNA in RNA und Translation der RNA in Protein existierende Transkriptom ist beeinflusst von den Mechanismen der Epigenetik und des alternativen Spleißens, welche genauso zu Veränderungen innerhalb des Proteoms beitragen, wie die Vielzahl von äußeren Faktoren: Zu diesen zählen das Zellmedium bzw. die Ernährung, Stress, Temperatur und mögliche co- bzw. posttranslationale Modifikationen (PTM)^{1,2}. Die zur Proteinanalyse nötige Extraktion und Aufreinigung von Proteinen aus Lysaten lebender Gewebe oder Zellkulturen stellt einen kritischen Schritt auf dem Weg zur massenspektrometrischen Analyse dar. Um eine Aussage über die Zusammensetzung des Proteoms treffen zu können, bedarf es einer vollständigen oder zumindest repräsentativen Extraktion der Proteine aus dem Lysat.

Klassische Ansätze, wie die sogenannte ‚in-gel digestion‘³ von aufgetrennten Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen, Fällung von Proteinen durch z.B. Aceton oder Chloroform/Methanol aus ihrer gelösten Form, gehen mit hohen Probenverlusten einher⁴. Ähnlich verhält es sich bei der gut etablierten *Filter Aided Sample Preparation* (FASP)⁵. Neuere Methoden, wie die *Single-Pot Solid-Phase-Enhanced Sample Preparation* (SP3) sind limitiert in der Verwendung von Puffern und Reagenzien⁶. Daher stellt es nach wie vor eine Herausforderung dar, ein Protokoll zur Probenvorbereitung zu entwickeln, das universell und robust einsetzbar ist und dabei zeit- und kosteneffizient bleibt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer solchen Methode.

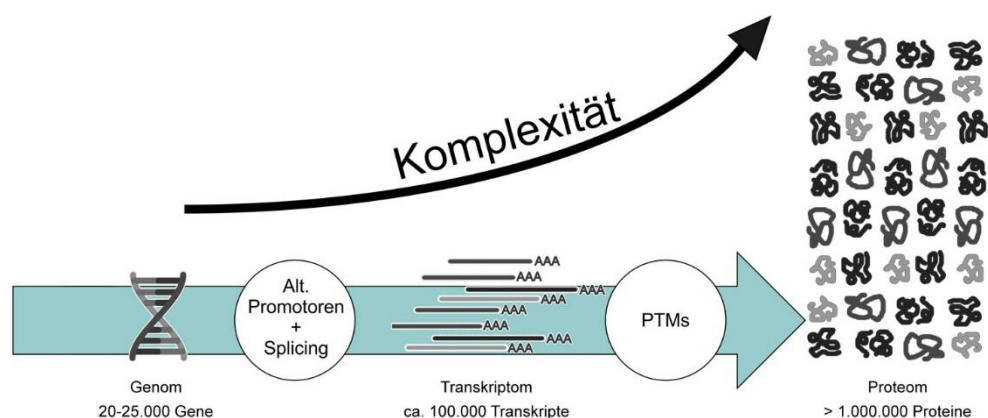


Abb. 1.2: Komplexität des Proteoms im Vergleich zum Genom

1.2 Proteinadsorption

Wesentliche Grundlagen für die entwickelte und untersuchte Proteinextraktion über magnetische Partikel auf Silicabasis sind die Adsorptionsmechanismen von Proteinen auf einer solchen Oberfläche, sowie die Protein-Protein-Adsorption in mehreren Schichten. Diese Phänomene sind gut untersucht, jedoch meist in dem Kontext unerwünschter Proteinadsorption im Zuge von Probenverlusten bei proteomischen Untersuchungen, Arzneimitteln oder Diagnostika.^{7,8} Der aktuelle Stand der Wissenschaft soll hier zunächst dargelegt werden.

1.2.1 Grundlagen der Adsorption

Allgemein lässt sich die Adsorption von Proteinen an Oberflächen mit den Wechselwirkungen der Seitenketten proteinogener Aminosäuren mit Oberflächenmolekülen zurückführen. Hier können verschiedene Arten von Wechselwirkungen unterschieden werden: Elektrostatische von geladenen Aminosäuren mit gegensätzlich geladenen Oberflächen, hydrophile über Wasserstoffbrückenbildungen, Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe basierend auf Van-der-Waals Kräften. Zusätzlich spielen Oberflächeneigenschaften wie Homogenität, Porosität und Morphologie eine wichtige Rolle.⁹⁻¹³

1.2.2 Einflussfaktoren der Adsorption

Im Gegensatz zu kleinen Molekülen spielt die komplexe dreidimensionale Struktur von Proteinen und deren Potential zur räumlichen Neuorientierung eine wichtige Rolle, so dass sich Proteinadsorption nicht alleinig durch die klassische Langmuir'sche Adsorptionsisotherme beschreiben lässt. Durch Denaturierung können einerseits Seitenketten zur Adsorption zur Verfügung stehen, die im nativen Zustand vor Wechselwirkungen sterisch abgeschirmt vorliegen, andererseits vergrößert sich durch Entfaltung der Tertiärstruktur ebenfalls die - zu Wechselwirkungen bereitstehende - Oberfläche des Moleküls. Parameter, die die Proteinadsorption beeinflussen, haben stets auch ein denaturierendes Potential und sind daher besonders außerhalb ihrer physiologischen Bereiche von großem Einfluss.

Der pH-Wert bestimmt die Nettoladung des Proteins, die wiederum bei gegensätzlicher Ladung von Sorbens und stationärer Phase zu hohen elektrostatischen Anziehungskräften führt. Zusätzlich kann der pH-Wert Proteine denaturieren, indem er mit der Ladung intramolekulare, strukturegebende Wechselwirkungen verändert.¹⁴ Temperatur ist von hoher Relevanz für Proteine, die bei erhöhten Werten ebenfalls ihre Struktur verlieren, direkt bedingt durch die Temperaturabhängigkeit der Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals Kräfte.¹⁵

1.2.3 Kosmotrope und chaotrope Reagenzien

Komplexer verhält sich der Einfluss der Ionenstärke des Solvens auf die Proteinlöslichkeit und damit auf die Tendenz zur Adsorption. Unterschieden werden muss dabei zwischen Kosmo- und Chaotropen¹⁶. Kosmotrope vermögen Proteine in Lösung zu stabilisieren, Konformationsänderungen und thermische Denaturierung zu verhindern¹⁷. Chaotrope wirken einerseits denaturierend, andererseits erhöhen sie auch die Löslichkeit hydrophoberer Strukturen, indem sie Wasserstoffbrücken aufbrechen¹⁸. Diese Eigenschaft korreliert bei ionischen Chaotropen primär mit deren Ionengröße¹⁹, wodurch beispielsweise Guanidiniumchlorid häufige Verwendung findet²⁰. Nicht-ionische Chaotrope wie Harnstoff brechen ebenfalls Wasserstrukturen auf²¹, was zu einer erhöhten strukturellen Freiheit für Makromoleküle führt. In Kombination mit den aktiv denaturierenden Effekten des Harnstoffs, die gleichwohl intramolekulare Wasserstoffbrücken als auch hydrophobe Wechselwirkungen aufzuheben vermögen^{20,22}, findet somit eine Entfaltung der Tertiärstruktur bei gleichzeitiger Stabilisierung dieser in Lösung statt.

1.2.4 Thermodynamik der Proteinadsorption

Die spontane Adsorption von Proteinen ist dann möglich, wenn bei dem Adsorptionsprozess Energie frei wird, bzw. $\Delta(ads)G$ einen negativen Wert annimmt:

$$\Delta(ads)G = \Delta(ads)H - T \times \Delta(ads)S$$

$\Delta(ads)$ = Änderung der Werte durch Adsorption

G = freie Enthalpie (Gibbs-Energie)

H = Enthalpie

T = Temperatur

S = Entropie

Dadurch wird ersichtlich, dass auf eine Adsorption hin eine Desorption folgen kann, im Besonderen dann, wenn eine Verdrängung durch ein stärker bindendes, um die stationäre Phase konkurrierendes Protein stattfindet. Der sogenannte Vroman-Effekt beschreibt die initiale Adsorption der höchstabundanten Proteine aus einem komplexen Gemisch und deren sukzessive Verdrängung durch Proteine von höherer Affinität.^{23,24}

Die anfängliche Orientierung des Proteins auf der Oberfläche kann im Verlauf des Adsorptionsprozesses Änderungen erfahren, die durch steigende Dehydrierung der Proteinzwischenräume, Beeinflussung durch adsorbierte Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft und fortschreitende Denaturierung bedingt wird.²⁵⁻²⁷ Hieraus ergibt sich eine Zeitabhängigkeit, nach der die Reversibilität der Adsorption über die Dauer der Inkubation abnimmt, bis ein quasi-irreversibler Zustand erreicht ist.²⁸

Gemäß ihrer Tendenz zur Adsorption und Konformationsänderung werden Proteine häufig in die Kategorien „hart“ und „weich“ sortiert, wobei sich diese Einteilung ausschließlich auf den nativen Zustand des Proteins bezieht und die, in der proteomischen Probenvorbereitung üblichen, chemischen Modifikationen nicht mit berücksichtigt.²⁹ Darüber hinaus besitzen Proteine die Fähigkeit zur Aggregation, was zur Ausbildung von mehreren Adsorptionsschichten führen kann, ohne kompetitives Adsorbieren auszuschließen.^{30,31}

1.2.5 Protein-Silica-Interaktion

Zur Vermeidung unerwünschter, omnipräsenter Adsorption an Oberflächen aus Silica bzw. Quarz, wird dieses in der Praxis häufig an seinen Hydroxylgruppen silanisiert, um die Adsorbate zu minimieren. Freie Silanolgruppen auf hochporösen Oberflächen, wie in dieser Arbeit verwendet, eignen sich dagegen hervorragend zur Immobilisierung von Proteinen durch unspezifische Adsorption. Silicat offeriert nicht nur die offensichtliche Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit polaren Seitenketten der Aminosäuren, bei pH-Werten > 3 stehen ebenfalls die teilweise deprotonierten Hydroxylgruppen der Kieselsäure zur ionischen Interaktion zur Verfügung. Exponierte hydrophobe Substrukturen der Proteine können zudem mit den lipophileren Siloxanketten (Si-O-Si) interagieren.³²

Methoden der Proteomanalytik

2 Methoden der Analytik

Im Zuge der Erforschung der Zusammenhänge und Zusammensetzung der Proteome in ihrer hohen Komplexität hat sich eine globale Community der Proteomforschenden entwickelt, die sich in ihrer Arbeit auf vier Säulen der Analytik stützt:

1. Probenvorbereitung: Gewinnung, Extraktion/Aufreinigung, (ggf. Quantifizierung und Modifikation) und enzymatischem Verdau
2. Chromatographische Methoden
3. Massenspektrometrische Instrumentierung
4. Bioinformatische Lösungen zur Datenprozessierung

Diese Herangehensweise lässt sich ebenfalls in Top-Down, Middle-Down den sogenannten Bottom-Up Approach unterteilen. Bei letzterem erlaubt die Analyse von Peptiden Rückschluss auf vorhandene Proteine. Den proteomischen Ergebnissen dieser Arbeit liegt ausschließlich der Bottom-Up Ansatz zugrunde.

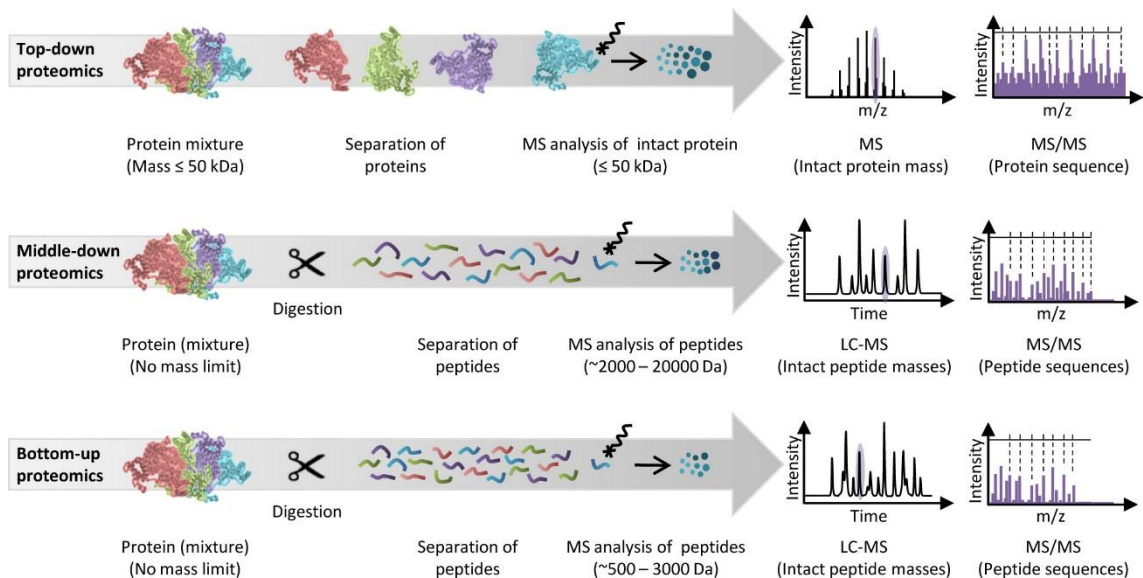


Abb. 2.1: Proteomische Ansätze zur LC-MS/MS Analytik

(Abbildung aus Switzar et. al³³)

2.1 Methoden der Probenvorbereitung

2.1.1 Probengewinnung/Zell-Lyse

Die Wahl der Methode zur Lyse biologischer Proben, wie Bakterien- oder Hefestämme, humane HeLa oder HEK 293T Zelllinien aus Zellkultur oder tierische Gewebeproben aus Tierversuchen entscheidet nicht nur über die Ausbeute und die Konzentration des Lysats³⁴ sondern auch über dessen Zusammensetzung³⁵.

Eine weitere Herausforderung ist die Homogenisierung des Lysats, da DNA- und RNA-Moleküle Proteine binden und konglomerieren und andere Zellrückstände und Verunreinigungen die weitere Analyse stören können. Zur Zerstörung von Polynucleotidketten werden entweder Nuclease-Reagenzien oder Ultraschall verwendet. In stark denaturierenden Lysisreagenzien kommt durch die Inhibierung der Nucleasen nur letztere Methode in Betracht. Für die Entfernung anderer Lysatbestandteile bietet sich eine Reihe an Aufreinigungsmethoden an, die im Folgenden erörtert werden sollen.

2.1.2 Extraktion und Aufreinigung

Die Proteinextraktion kann gezielt erfolgen um spezielle Proteine mittels Antikörper zu isolieren, was via Immunpräzipitation oder mit Hilfe magnetischer Beads und darauf assoziierten Antikörpern erfolgen kann.

In dieser Arbeit ruht der Fokus jedoch auf einer unspezifischen, möglichst vollständigen Extraktion aller im Lysat befindlichen Proteine. Klassische Ansätze hierzu sind die Fällung mittels Aceton oder Chloroform/Methanol, hoher Salzkonzentrationen oder Säurezusätzen⁴, die weiterhin Anwendung finden, aber durch neuere Ansätze, wie *Filter Aided Sample Preparation (FASP)*⁵ oder *Single-Pot Solid-Phase-Enhanced Sample Preparation (SP3)*⁶ an Bedeutung verlieren. In vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe wurden dafür unter Anderem NHS-aktive, paramagnetische Beads verwendet.³⁶

2.1.2.1 Acetonfällung

Proteinfällung mittels einem 1:10 Überschuss an kaltem Aceton von in Lösung befindlichen Proteinen erfolgt über Nacht bei -20°C . Nach anschließender, kalter Zentrifugation kann der Überstand samt sonstiger Lysatbestandteile dekantiert und das erhaltene Proteinpellet getrocknet werden. Das mithilfe eines Puffers wieder in Lösung gebrachte, Pellet kann anschließend proteolytisch verdaut werden.

2.1.2.2 FASP (*filter aided sample preparation*)

Die auf Größenausschluss basierte Methode nach Mann et al. erlaubt die Separation von tensidhaltigen, polynukleotidfreien Medien und Protein nach Zelllyse^{5,37}. Kleine Moleküle und Ionen passieren dabei den Filter, Makromoleküle, wie Proteine, verbleiben auf dem Filter, wo sie durch zusätzliche Waschschriffe weiter von Tensiden und anderen Verunreinigungen befreit werden können. Der Enzymatische Verdau erfolgt anschließend auf dem Filter, wonach die resultierenden, kleineren Peptide durch die Filterporen eluiert werden können. Durch einen relativ hohen Probenverlust innerhalb des Filters leidet FASP jedoch unter geringerer Reproduzierbarkeit im Vergleich zu Verdauprotokollen in Lösung oder auf Beads^{38,39}.

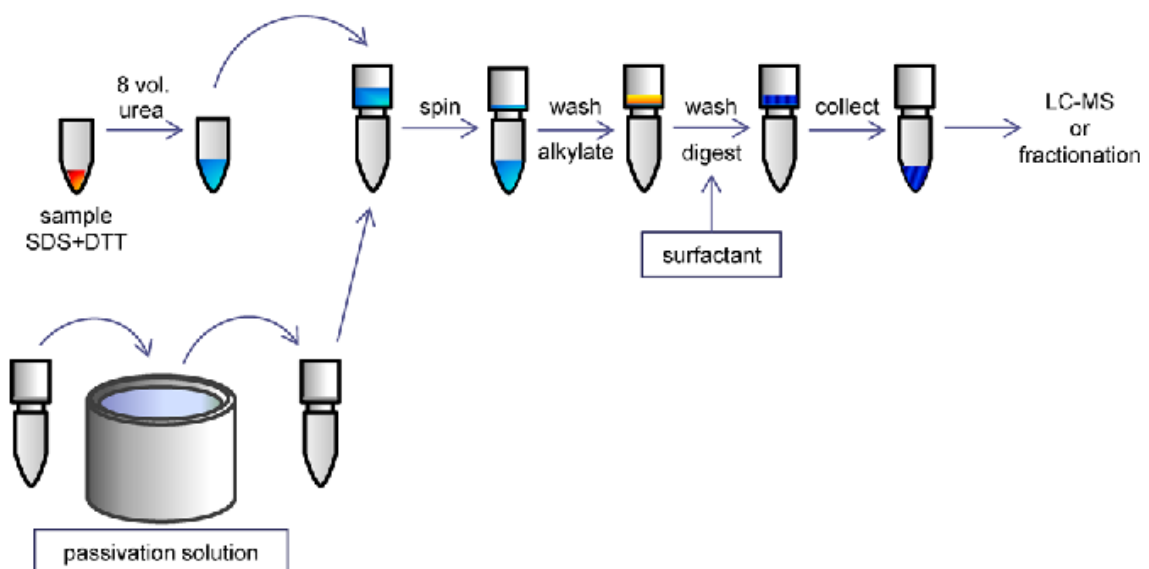


Abb. 2.2: Workflow des enhanced FASP Protokolls
(Abbildung aus „*Enhanced FASP [...]*“, Erde et. al⁴⁰)

2.1.2.3 Bead-basierte Probenvorbereitung

Bei Beads handelt es um Partikel, auf deren Oberfläche Proteine oder Peptide immobilisiert werden können. In biologischen Methoden, wie der Immunopräzipitation, werden diese Beads durch ihre Masse leicht vom Medium mittels Zentrifugation getrennt. In dieser Arbeit kommen Partikel mit einem paramagnetischen Kern aus Eisen mit unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten und Durchmessern zum Einsatz. Diese können mit magnetischen Racks für die Reaktionsgefäße aus der Suspension an die Oberfläche des Vials gebracht werden, wodurch der flüssige Überstand entfernt werden kann, die Beads können anschließend in neuem Medium resuspendiert werden.

Proteine wurden mittels unterschiedlicher Methodik auf den Partikeln immobilisiert, modifiziert und anschließend proteolytisch verdaut. Die nach Ende des Verdaus im Überstand befindlichen Peptide wurden aufkonzentriert und massenspektrometrisch analysiert.

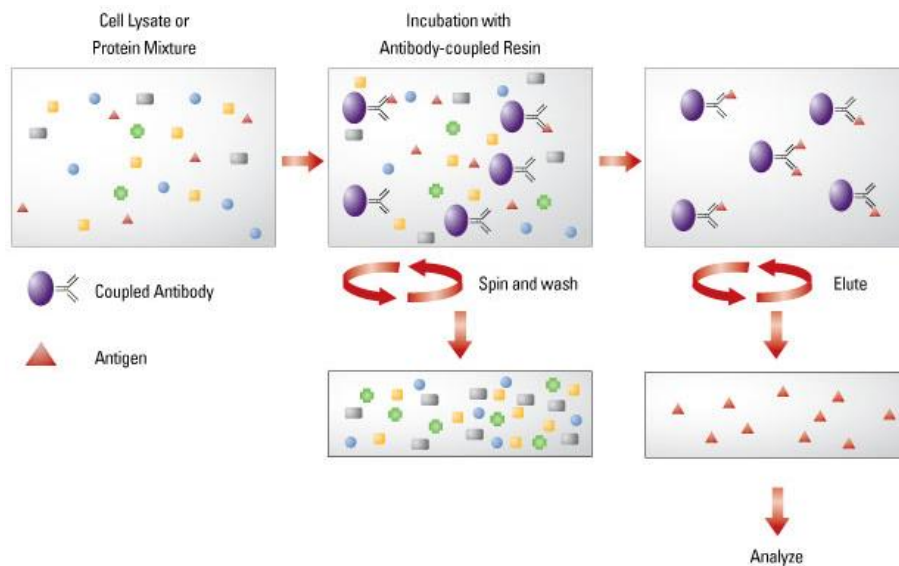


Abb. 2.3: Beispiel einer Bead-basierte Immunopräzipitation
(Thermo Fisher, April 2019. Web. <https://www.thermofisher.com/>)

2.1.3 Ermittlung der Ausbeute

Um den Probengehalt an Protein abschätzen zu können, sollte eine Quantifizierung durchgeführt werden. Als Standardmethoden sind hier Bradford- und Bicinchoninsäure-Assay^{41,42}, sowie Fluoreszenzmessung für tryptophanhaltige Proben⁴³ zu nennen.

2.1.4 Modifizierung

Proteinmodifikation im Proteomik-Workflow beschränkt sich häufig auf die Reduktion der Disulfidbrücken⁴⁴ mittels Dithiothreitol (DTT) oder Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) und anschließende Carbamidomethylierung der Cysteine mit Hilfe von Iodacetamid oder Chloracetamid. Diese routinemäßig angewandte Modifikation wird im Folgenden als Reduzierung/Alkylierung bezeichnet. Weiterführende Modifikationen umfassen aber auch die Markierung bestimmter Aminosäuren zu Zwecken der Quantifizierung oder zur Kontrolle des enzymatischen Verdaus³⁶.

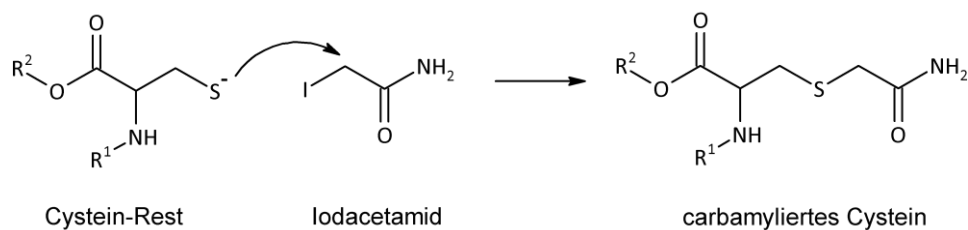


Abb. 2.4: Carbamylierung von Cystein am Thiol

Derivatisierungen von Aminogruppen werden im Zuge dieser Arbeit werden mit Carbonsäureanhydriden - Propionsäureanhydrid (PA) im Speziellen - durchgeführt. Die damit erreichte Acylierung von primären Aminofunktionen in Proteinen und Peptiden ist eine etablierte Methode zur Analyse von Histonen⁴⁵ und wird hier zum ArgC-analogen (ArgC-like) Verdau verwendet. Die unerwünschten Nebenreaktionen an (phenolischen) Hydroxyl-, Carbonsäure- und Imidazolgruppen sind reversibel und können quantitativ mittels Hydroxylamin entfernt werden.

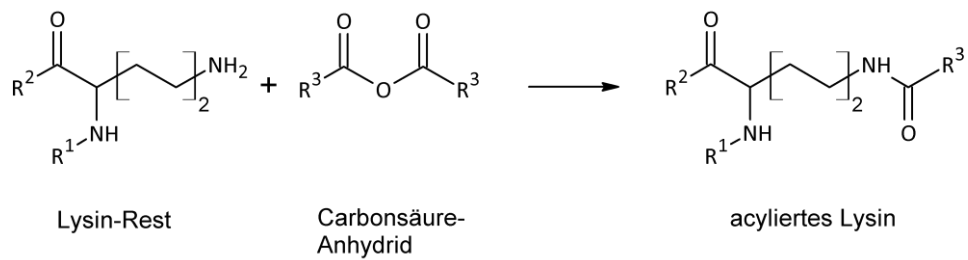


Abb. 2.5: Acetylierung des primären Amins am Lysin

Die kovalente Bindung von Proteinen an NHS-Beads kann ebenfalls als Derivatisierung betrachtet werden und basiert auf quantitativer Acylierung von Lysinen. Dieses findet vor allem Anwendung zur Immobilisierung von Antikörpern auf Beads z.B. zur Immunopräzipitation oder zur Quantifizierung mittels TMT (Tandem Mass Tag, Thermo Scientific).

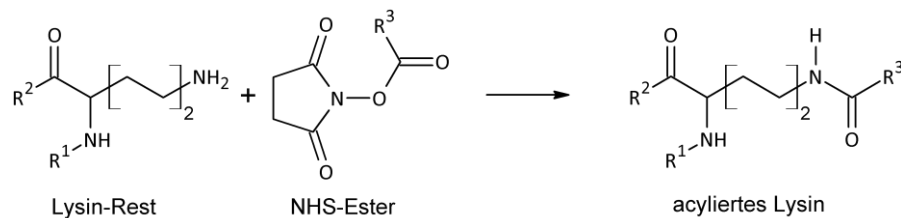


Abb. 2.6: Derivatisierung von Lysin mittels NHS-Ester

Zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen wurde Fluorecein-5-Maleimid (Thermo Fisher) verwendet, welches primär mit den freien Thiolen der Cysteine, aber auch in geringerem Ausmaß mit den Aminen der N-Termini und Lysine reagiert. Die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgt mit TCEP oder DTT nach der Immobilisierung von Protein auf magnetischen Beads, um die anschließende Entfernung des Reduktionsmittels zu ermöglichen.

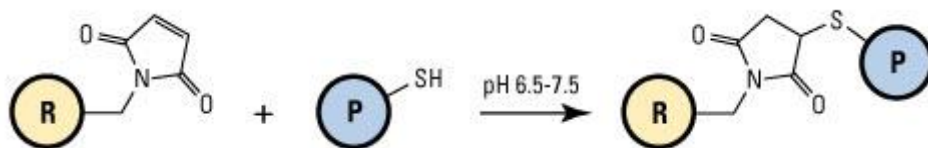


Abb. 2.7: Derivatisierung von Cystein durch Maleimidverbindungen
(Thermo Fisher, April 2019. Web. <https://www.thermofisher.com/>)

2.1.5 Proteolytischer Verdau

Im Allgemeinen werden in der Bottom-Up Proteomik Endoproteasen verwendet, welche Peptidbindungen an charakteristischen Stellen innerhalb der Aminosäuresequenz hydrolytisch spalten. Im Gegensatz dazu lösen Exoproteasen Aminosäuren sukzessive ausgehend von N- oder C-Terminus aus der Sequenz ab. Somit lassen sich N- und C-terminale Proteasen unterscheiden. Der Mechanismus der hydrolytischen Spaltung der Säureamide offeriert eine weitere Möglichkeit der Proteasencharakterisierung. Ein nukleophiler Angriff der Carbonylgruppe durch ein reaktives Serin oder Cystein determiniert ob es sich um eine Serin- oder Cysteinprotease handelt. Des Weiteren existieren Metalloproteasen, in deren aktiven Zentrum ein Metallion katalytisch fungiert. Essenziell für das Resultat ist jedoch vor allem die Spezifität der Protease. Diese ergibt sich aus der Anzahl der Aminosäuren, die dem Enzym als Angriffspunkt dienen und der Selektivität für diese.

2.1.5.1 Tryptischer Verdau

Trypsin hydrolysiert selektiv die Peptidbindungen C-Terminal hinter Arginin und Lysin und besitzt damit eine Schnittstelle (cleavage site) mehr als beispielsweise ArgC, welches C-Terminal hinter Arginin schneidet. Durch die niedrigere Selektivität sind die Resultate von ArgC jedoch von niedrigerer Reproduzierbarkeit⁴⁶.

Obwohl andere Proteasen sich als gute Alternativen oder Ergänzungen erwiesen haben⁴⁷, dominiert Trypsin als Standardenzym die Proteomik. Es wird zumeist aus dem porcinen Pankreas gewonnen und in reduktiv methylierter Form eingesetzt, um die Autoprotolyse zu vermeiden. Die spezifischen *cleavage sites* von Peptidbindungen C-terminal nach den Aminosäuren Lysin und Arginin produzieren gut ionisierbare und fragmentierbare Peptide, die im Mittel in einem idealen Größenbereich von ca. 14 Aminosäuren⁴⁸ liegen. Übersprungene Schnittstellen, *Missed Cleavages (MC)*, kommen vorhersehbar bei Prolin, Asparaginsäure und Glutaminsäure in unmittelbarer Nachbarschaft vor, liegen aber in akzeptablem Größenbereich und können bei der Datenbanksuche problemlos berücksichtigt werden.

2.1.5.2 ArgC und ArgC-analoger Verdau

Die Endoprotease ArgC besitzt die namensgebende Eigenschaft C-terminal hinter Argininen proteolytisch zu schneiden und besitzt damit im Vergleich zu Trypsin nur eine *cleavage site*. Zur massenspektrometrischen Analyse sind die resultierenden Peptide ebenfalls gut geeignet, da auch sie eine gute Ionisierbarkeit aufweisen. Jedoch mangelt es ArgC an der hohen Spezifität von Trypsin, sodass hier vermehrt Peptide generiert werden, die aufgrund ihrer unspezifischen Schnittstelle zwar Signale im Massenspektrometer erzeugen, jedoch nicht identifiziert werden⁴⁶. Die von Golghalyani et al. etablierte Methode des ArgC-analogen Verdau hingegen nutzt Trypsin, welches die zuvor propionylierten Lysine als Schnittstellen ignoriert und damit Peptide analog von ArgC, bei gleichzeitigem Erhalt der hohen Spezifität von Trypsin, produziert.³⁶ Als Vorteile dieser Peptide in der Analyse sind u.a. eine Verbesserung der Proteomabdeckung, höhere Schnittstellenspezifität und gutes Fragmentationsverhalten zu nennen. Zusätzlich wurde die Technik von Schröder et al. als Quantifizierungsmethode weiterentwickelt.⁴⁹

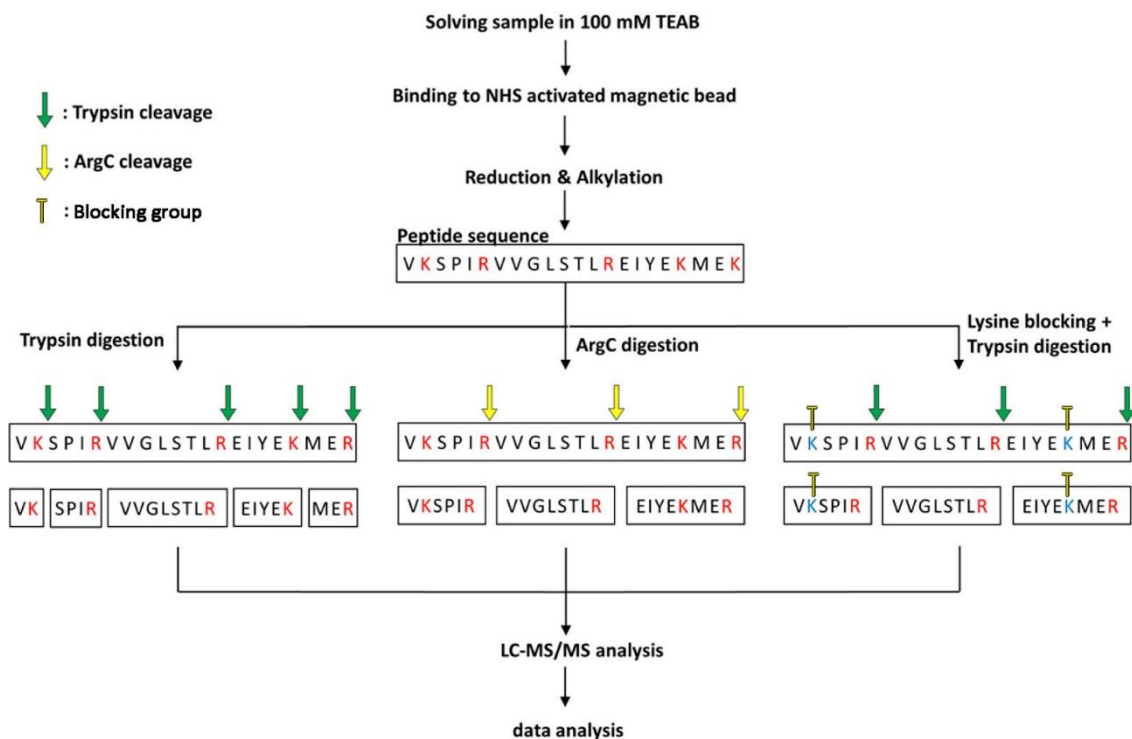


Abb. 2.8: Mechanismus des ArgC-analogen Verdau
(aus "ArgC-Like Digestion [...]", Golghalyani et. al.³⁶, modifiziert)

2.2 Chromatographische Methoden

Die zur Auftrennung komplexer Proben nötigen Separationsmethoden lassen sich grob in Gelelektrophoretische und Hochleistungs-Flüssigchromatographische (HPLC) Methoden einteilen, wobei die gelbasierten Methoden gewöhnlich vor dem Probenverdau zum Einsatz kommen, die HPLC dagegen meist zur Trennung der aus dem Verdau resultierenden komplexen Peptidgemische eingesetzt wird.

2.2.1 Gelelektrophorese (GE)

In der Gelelektrophorese werden ionische Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Felds zur Wanderung durch ein Gel angeregt, welches seinerseits als Molekularsieb wirkt. Hieraus erfolgt eine Trennung nach Ladung und Größe des Moleküls. Für nicht-sphärische Makromoleküle wie RNA und DNA kommt dabei meist über Agarose-Gel zum Einsatz, in der Proteinanalytik finden jedoch fast ausschließlich Gele aus Polyacrylamid (PA) Verwendung. Diese Methodik wird daher meist als PAGE (Polyacrylamide-Gelelectrophoresis) abgekürzt und kennt verschiedene Unterkategorien, die relevantesten werden im Folgenden dargestellt.

2.2.1.1 Nativ-PAGE

Als native Gelelektrophorese wird die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer isoelektrischen Punkte (IP) und ihrem hydrodynamischen Volumen ohne Denaturierung bezeichnet. Kationen bewegen sich in diesem Feld in Richtung der Kathode, Anionen in Richtung der Anode.⁵⁰

2.2.1.2 IEF-PAGE

Bei der Isoelektrischen Fokussierung bewegen sich die zuvor denaturierten Proteine, entsprechend ihres IP, werden jedoch dank eines zuvor etablierten pH-Gradienten im Gel an der Stelle fokussiert, an der pH-Wert dem proteinspezifischen IP gleicht.⁵¹

2.2.1.3 SDS-PAGE

Die am häufigste angewendete Gelelektrophorese basiert auf der denaturierenden Wirkung des ionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS), welches im Überschuss eingesetzt die Eigenladung der Proteine maskiert und somit eine unilaterale Wanderung im Gel von der Kathode zur Anode forciert⁵². Zusätzlich erfolgt meist eine Spaltung von Disulfidbrücken mittels Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT). Damit erfolgt die Trennung der Proteine ausschließlich nach ihrer Größe über das Molekularsieb des Gels. Die Porengröße des Gels kann dabei durch Variation von Acrylamid-Monomer- und Vernetzer-Konzentration eingestellt werden. Häufig kommt ein Gemisch aus Proteinen definierter Molekulargewichte als Größenmarker zum Einsatz.

2.2.1.4 2D-PAGE

Eines der ältesten Verfahren der Proteomik ist die Kombination aus IEF- und SDS -PAGE zu einer zweidimensionalen Entwicklung von PA Gelen. Zunächst werden hierfür die Proteine ihrem IP entsprechend eindimensional über einen Gelstreifen aufgetrennt und fokussiert. Disulfidbrücken der Proteine werden reduziert, die entstehenden Thiole mittels Iodacetamid (IAA) alkyliert und das Gel im Überschuss mit SDS versetzt. Die Entwicklung der zweiten Dimension erfolgt nach SDS-PAGE.⁵³

Die Detektion von Proteinen innerhalb der Gele nach PAGE kann durch Einfärbung (staining) der Proteine mittels Proteinfarbstoffen, wie Coomassie Brilliantblau oder SYPRO Ruby, bewerkstelligt werden.^{54,55} Die Stärke der Färbung korreliert dabei mit der Menge an Protein, so dass quantitative Aussagen möglich sind. Die Kombination mit massenspektrometrischen Methoden ist nach enzymatischem Verdau aus dem Gel ein übliches Verfahren. Weiterhin kann mittels Western-Blot eine Übertragung auf eine Membran erfolgen, welche die Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper erlaubt.

2.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Allgemein werden in der Chromatographie Substanzgemische mit Hilfe mobiler Phasen anhand ihrer Wechselwirkungen mit einer stationären Phase getrennt⁵⁶. In der HPLC geschieht dies auf Säulen der stationären Phase, die durch poröse Beschaffenheit eine stark vergrößerte Oberfläche aufweist. Historisch wurden zuerst Materialien von hydrophiler Eigenschaft, wie Silicagele, verwendet und diese als Normalphase bezeichnet. Zur Auftrennung von Peptiden in der Proteomik kommen jedoch hauptsächlich lipophile, mit Kohlenwasserstoffketten von C-4 bis C-18 modifizierte Oberflächen zum Einsatz, die üblicherweise als Umkehrphase oder Reversed Phase (RP) bezeichnet wird. Der Einsatz von HPLC vor der Analyse im Massenspektrometer reduziert die Komplexität der analysierten Peptidgemische drastisch und erhöht die Anzahl identifizierter Proteine enorm⁵⁷. Eine Kopplung mit Quellen zur Elektrospray-Ionisation wird zur kontinuierlichen Analyse eingesetzt, aber auch eine diskontinuierliche Kopplung mit einem Spotter zur Vorbereitung von Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) ist möglich⁵⁸.

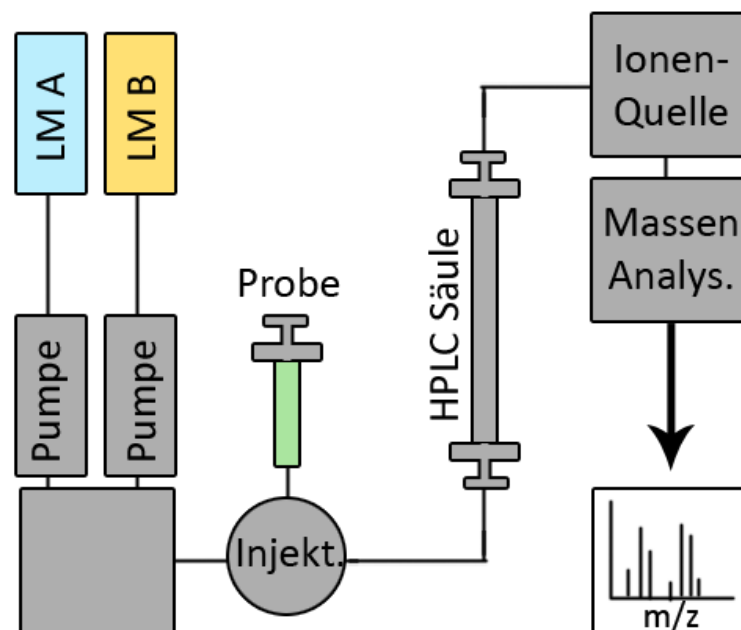


Abb. 2.9: Vereinfacht dargestellter Aufbau einer HPLC-MS Kopplung

2.3 Massenspektrometrie

Ein klassisches Massenspektrometer lässt sich grob in folgende drei Hauptkomponenten unterteilen: Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor. Während die Anzahl verfügbarer Massenanalysatoren mit jüngeren Innovationen deutlich zugenommen hat, sind die Methoden der Ionisierung seit den 1980er Jahren weitestgehend gleichgeblieben.

Typischerweise sind Massenspektrometer zur Proteinanalytik entweder mit Ionenquellen basierend auf Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)⁵⁹ oder Elektrospray Ionisation (ESI)⁶⁰ ausgestattet. Im Gegensatz zum klassischen „harten“ Ionisationsverfahren der Elektronenstoßionisation oder dem Fast Atom Bombardment (FAB)⁶¹ ermöglichen beide Verfahren „weiche“ Ionisierung, die intakte, unfragmentierte Molekülionen von Peptiden, Proteinen und Nucleinsäuren in die Gasphase zu befördern vermögen.

2.3.1 Ionisierungsverfahren

2.3.1.1 Matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI)

MALDI ist eine von Karas und Hillenkamp entwickelte, sanfte Ionisierungsmethode, bei der gelöste Analyt- und Matrixmoleküle auf einem Probenhalter co-kristallisiert werden^{59,62}. Als Matrix dienen hierbei meist vakuumstabile, azide, UV-absorbierende Moleküle, wie 2,5-dihydroxy-Benzoesäure⁶³ oder Zimtsäurederivate⁶⁴. Diese übertragen nach Absorption des ns-gepulsten Laserlichts Energie auf die kristallisierten Analytmoleküle und führen zusätzlich, im Fall von azider Matrix, zu einer Protonierung basischer Peptide und Proteine. In dem vorherrschenden Hochvakuum ($p < 10^{-6}$ mbar) führt der Laserimpuls neben der Energieübertragung zu einer Desorption der Mischkristalle und befördert so Analyten, wie auch Matrix, als Teilchenwolke („Plume“) in die Gasphase und damit in den Massenanalysator. Durch Anlegen einer Hochspannung werden die Ionen in Richtung des Massenanalysators beschleunigt⁶⁵. Charakteristisch für Ionen aus MALDI-Quellen ist eine einfache Ladung, da eine gegenseitige Neutralisation höher geladener Ionen innerhalb der Teilchenwolke erfolgt (Abb. 2.10)⁶⁶.

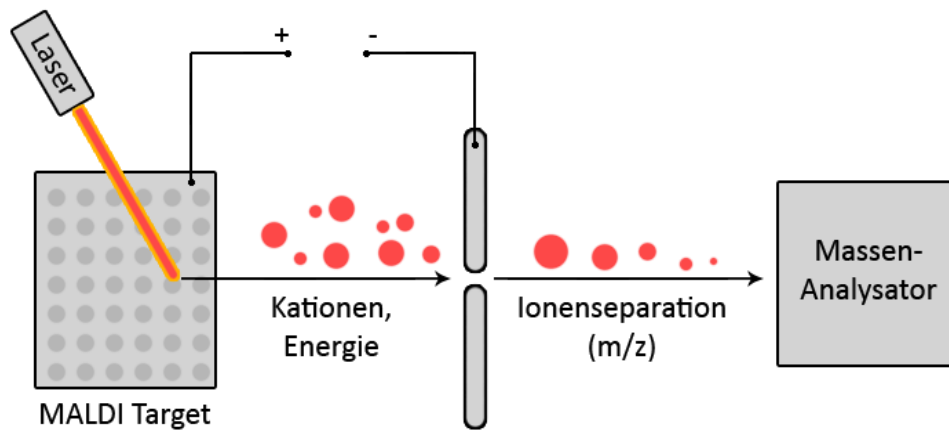


Abb. 2.10: Schematischer Aufbau MALDI

Durch gepulsten Laserbeschuss werden Matrixmoleküle, Analytationen u. Neutralteilchen durch Bildung einer Teilchenwolke in die Gasphase überführt

2.3.1.2 Elektrospray Ionisation (ESI)

Zur Ionisation durch die, von Fenn et al. entwickelte Methode, werden gelöste Analyten mittels eines elektrischen Feldes aus einer Kapillare unter Atmosphärendruck versprüht⁶⁰. Im elektrischen Feld verlässt die austretende Flüssigkeit die Nadel unter Ausbildung eines Taylor Konus und formt zunächst einen filamentartigen Flüssigkeitsjet^{67,68}. Die daraus gebildeten, positiv geladenen Tröpfchen schrumpfen unter Evaporation des Lösungsmittels bis zur Erreichung einer kritischen Ladungsdichte. Übersteigt die Ladungsabstoßung die Oberflächenspannung erfolgt eine Coulomb Explosion, die zum Zerfall in mehrere kleine Tröpfchen führt und damit einen dichten Nebel hochgeladener Tröpfchen generiert. Diese Reaktion wiederholt sich solange, bis als Endprodukt lösungsmittelfreie, meist mehrfach geladene, Analytionen als feinstes Aerosol vorliegen. Entlang des Druck- und Potentialgefälles werden die erzeugten Ionen entlang Transfermodulen zum Massenanalysator geleitet. Die so erreichten, hohen Ladungen ermöglichen die Analyse großer Analyten durch die Verringerung des Verhältnisses Masse zu Ladung. Der exakte Mechanismus der Ionisierung ist nicht vollständig geklärt. Bei niedrigen Molekulargewichten führen elektrostatische Kräfte zu einer Separation von Tropfen und Ionen, wie im *ion evaporation model* (IEM) beschrieben⁶⁹. Bei größeren Molekülen ist laut des *charged residue model* (CRM) die Ladung des Analytions innerhalb der Lösung essentiell⁷⁰.

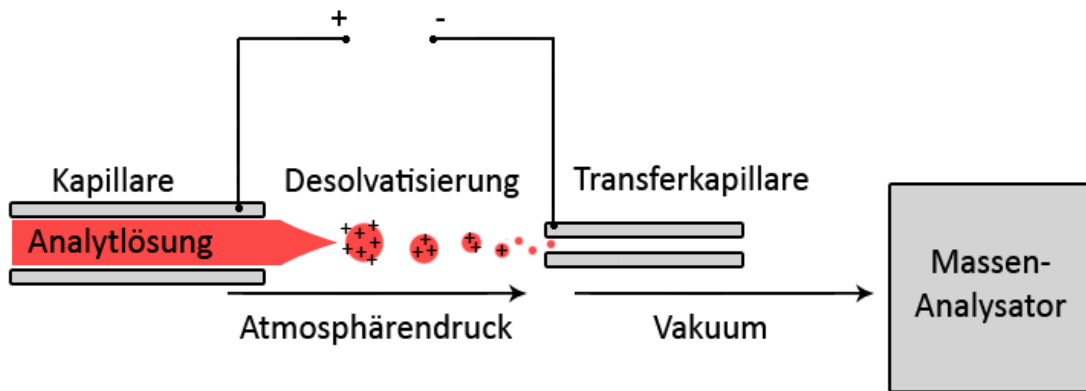


Abb. 2.11: Schematischer Aufbau der Elektrospray Ionisierung

2.3.2 Massenanalysatoren

2.3.2.1 Time of Flight (TOF) Analysatoren

Mit der in 1946 frühen Beschreibung von TOF Analysatoren durch Stephens⁷¹ 1946 und der Einführung der ersten modernen Instrumente 1955 durch Wiley und McLaren⁷², stellt dieses Verfahren einen Meilenstein in der Massenspektrometrie dar, wurde aber erst durch die Einführung von MALDI zu einer Standardmethode und einem weltweiten wissenschaftlichen und kommerziellen Erfolg. Der lineare Flugzeitanalysator erlaubt die Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von Ionen, nachdem sie in die Gasphase überführt und zur Driftrecke hin beschleunigt wurden. Die gemessenen Werte ergeben sich aus der größenabhängigen Flugzeit von ihrer Desorption bis zum Auftreffen auf den Detektor. Durch die unterschiedliche Anfangsenergie der Ionen nach Desorption, ihrer anfänglichen Bewegungsrichtung, Kollisionen und unterschiedliche Startpunkte besitzt das System jedoch eine begrenzte Auflösung, da die Ionen bereits kurz nach der Ablation einer komplexen Verteilung orthogonal zum Proben spot unterliegen, die sich in der Verteilung um die entsprechenden Flugzeit- und damit m/z -Werte widerspiegelt.

Die konsequente Weiterentwicklung mittels Delayed Extraction (DE) erreicht eine Kompensation der durch die Anfangsgeschwindigkeitsverteilung bedingten Flugzeitunterschiede für den Ort des Detektors, indem die aktive Beschleunigung der Ionen durch einen verzögerten Hochspannungsimpuls erfolgt. Zusätzlich nimmt die Dichte der Ablationswolke bis zu diesem Zeitpunkt ab, sodass der Einfluss von Kollisionen sinkt und die Auflösung steigt^{73,74}. Eine weitere Verbesserung der Massenauflösung ist durch den Einsatz eines Reflektors erreichbar⁷⁵, die auch als ReTOF bezeichnet wird. Die Spannung am Reflektor ist dabei 5-10% höher als die Beschleunigungsspannung: Ionen höherer Energie dringen dabei tiefer in den Reflektor ein, verbleiben also länger im Reflektor als energieärmere. Die so erzielte Flugzeitkorrektur führt zu erheblich besseren Auflösungen. Die Weiterentwicklung zum TOF/TOF Massenanalysator erlaubt zudem Tandem-Massenspektrometrie durch Einführung eines CID-Elements (Collision Induced Dissociation).

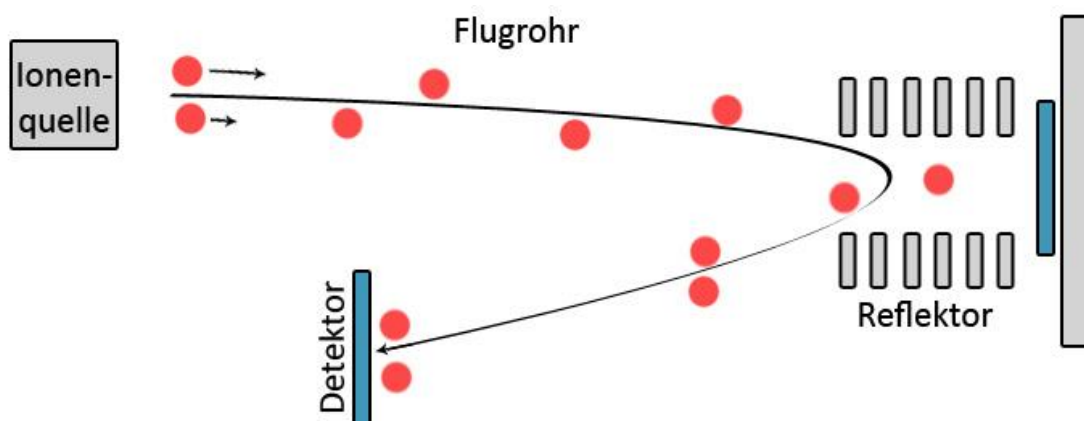


Abb. 2.12: Aufbau TOF Massenanalysator mit Reflektor (ReTOF)

Ionenfokussierung nach unterschiedlicher Ausgangsgeschwindigkeit bei $t=0$.

2.3.2.2 Quadrupol Massenfilter

Eine Quadrupol-Einheit kann im Massenspektrometer bei exklusiver Verwendung unter Wechselspannung als Transferoptik und CID-Element eingesetzt werden und kann alternativ bei zusätzlichem Anlegen von Gleichspannung auch als Massenfilter Anwendung finden. Der Quadrupol, wie von Wolfgang Paul⁷⁶ erstmalig beschrieben, besteht aus 4 zylindrischen Stabelektroden (6 für Hexa⁷⁷- und 8 für Octapole⁷⁸), die symmetrisch angeordnet werden. Gegenüberliegende Elektroden werden dabei auf dem gleichen Potential, unter Verwendung als Massenfilter variierend als Gleich- und Wechselspannung, also jeweils negativ oder positiv betrieben. Bei einem Scanvorgang, also der Verwendung als Massenfilter, haben nur Ionen bestimmter m/z -Werte eine stabile Bahn, indem Potential und Frequenz der Elektroden so eingestellt werden, dass Ionen größerer oder kleinerer Masse/Ladung-Verhältnisse mit den Elektroden kollidieren und somit aus dem Ionenstrom entfernt werden. Kompensiert werden kann die mangelnde Auflösung durch wiederholte Durchläufe oder hohe Frequenzen⁷⁹. Mehrere Quadrupole lassen sich mit unterschiedlichen Aufgaben z.B. als Triple-Quadrupol kombinieren. Ein weiterer Verwendungszeck als lineare Ionenfalle (LIT) ergibt sich nach Einführung zweier weiterer Elektroden an den axialen Enden des Quadrupols⁸⁰. Hierin gespeicherte und fokussierte Ionen können radial oder axial ausgeworfen werden, wodurch sich unterschiedliche Elemente im Massenspektrometer verknüpfen lassen.

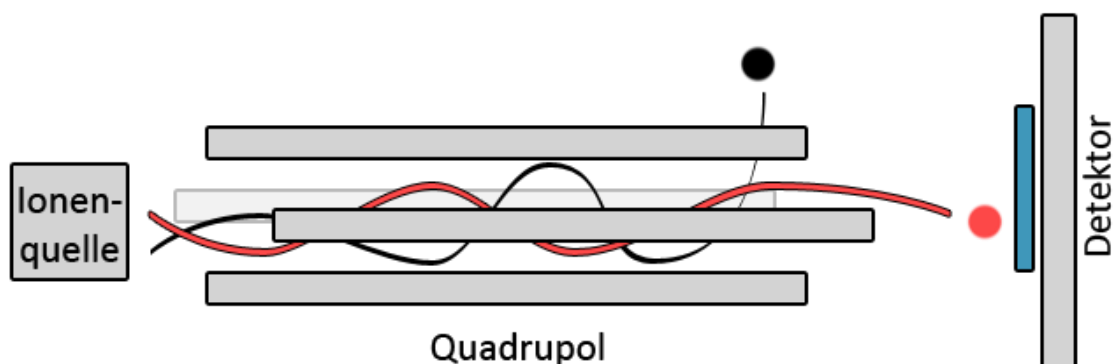


Abb. 2.13: Vereinfachter Aufbau eines Quadrupols

Ausschließlich Ionen eines ausgewählten Masse-Ladungsverhältnis erreichen den Detektor oder das nachgeschaltete Element des Massenspektrometers

2.3.2.3 Orbitrap

Zu den modernsten Analysatoren mit sehr hoher Auflösung und Massengenauigkeit gehört die von Alexander Makarov entwickelte Orbitrap⁸¹. Diese spezielle Ionenfalle besteht aus einer inneren, spindelförmigen Zentralelektrode und einer umschließenden zweigeteilten, zylindrischen Elektrode. Das elektrostatische Feld leitet eingebrachte Ionenpakete in eine Umlaufbahn entlang der inneren Elektroden. Die Ionen sind durch ihre Trägheit einerseits und die elektrostatische Anziehungskraft der Spindel andererseits in rotierenden Flugbahnen stabilisiert. Abhängig vom Verhältnis der Ionenmasse (m) zu ihrer Ladung (z) entsteht neben der rotierenden Bewegung auch eine axiale entlang der inneren Elektrode. Die so resultierende Oszillationsbewegung induziert einen Strom in der äußeren Elektrode, dessen Fluktuation mittels Fourier Transformation (FT) in diskrete m/z Signale übersetzt wird^{82,83} (Abb. 2.14).

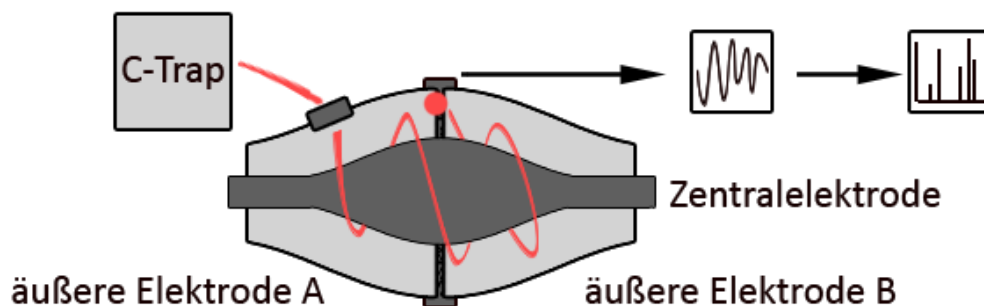


Abb. 2.14: Schematischer Aufbau des Orbitrap Massenanalysators

Durch die hohe Auflösung, die parallele Entwicklung der HCD Fragmentierung und die hohe Messgeschwindigkeit des Massenanalysators ist dieser im Laufe seiner Weiterentwicklung zu einem essenziellen Werkzeug der modernen Proteomik geworden⁸⁴. Aktuelle Modelle, wie die in dieser Arbeit verwendete Q-Exactive, werden in der Routine der Proteinanalytik mit Auflösungen um bei 70.000 (bei 200 m/z) eingesetzt⁸⁵. High-End Geräte, wie die Orbitrap Elite, erlauben weitaus höhere Auflösungen von 240.000 (bei 400 m/z)⁸⁶ bis hin zu über 1 Million bei neusten Anwendungen⁸⁷. Die Auflösung (R , Resolution) errechnet sich nach IUPAC^{88,89} aus dem Quotienten aus m (m/z des Ions) und Δm (FWHM oder der Distanz zum nächstkleineren Signal)

2.3.3 Peptidfragmentierung

Fragmentierte Analytionen sind unter anderem Nebenprodukte von älteren Ionisationsverfahren, die als Fragmentpeaks in Massenspektrum zu beobachten sind. Bei einfachen Analyten ist im Spektrum das Signal des unfragmentierten Ions jedoch deutlich erkennbar (Quasi-Molpeak) und die Signale der Fragmente daher vernachlässigbar. Bei Gemischen, wie proteomischen Proben muss eine Fragmentierung während der Ionisation vermieden werden, da die resultierenden Spektren von enormer Komplexität wären und eine Zuordnung der Fragmentionen zu ihren Vorläuferionen nicht möglich wäre. Dies geschieht mit den bereits beschriebenen, „sanften“ Ionisationsverfahren wie MALDI und ESI. Hier kann die Peptidfragmentierung gezielt für einzelne Ionen (Vorläuferionen, precursor ions) nach deren Ionisierung stattfinden um, diese in einem zweiten Schritt erneut massenspektrometrisch zu untersuchen. Diese Methodik wird als MS/MS oder MS² bezeichnet und kann mit denselben (Tandem-MS)⁹⁰ oder unterschiedlichen (Hybrid MS/MS)^{82,91} Massenanalytoren erfolgen.

Die Aufnahme eines Fragmentionenspektrums dient primär der Identifizierung von Peptiden, die mittels De-novo-Sequenzierung oder Datenbankabgleich erfolgt (siehe Kapitel Datenbanksuche). Als Basis für die Identifizierung ist das allen Peptiden gemeinsame Rückgrat aus Peptidbindungen, dessen Fragmentierung mittels der von Roepstorff und Folmann eingeführten Nomenklatur beschrieben werden kann⁹². Voraussetzung für die Detektion eines Fragmentions ist dessen positive Ladung. Befindet sich die Ladung nach der Spaltung auf dem Teil des N-Terminus, spricht man je nach Bruchstelle von a, b oder c-Ionen. Geladene Fragmente mit C-Terminus werden als x, y oder z-Ionen beschrieben. Ein zusätzlicher Zahlenindex beschreibt die mit der Bruchstelle assoziierte Aminosäure gezählt vom jeweiligen Terminus aus.

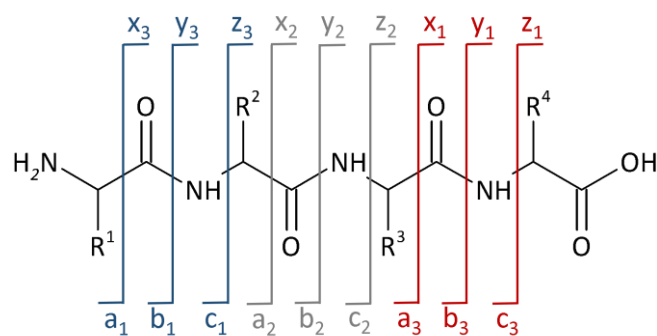


Abb. 2.15: Fragmentierung der Vorläuferionen

2.4 Bioinformatics, Datenanalyse

Mit steigender Potenz der Massenanalytoren und den damit produzierten Daten, deren Größe keinerlei manuelle Auswertung mehr zulässt, wachsen auch die Ansprüche an Softwarelösungen zur Auswertung proteomischer Daten. Hierzu stehen sowohl, von Forschungsinstituten bereitgestellte, kostenlose *Open Source* Programme als auch zahlreiche kommerzielle Produkte zur Verfügung.

2.4.1 Dateiprozessierung

Die Vorgehensweise bei zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen ist dabei meist gleich und lässt sich grob in Dateikonversion, Signalprozessierung und Datenbanksuche unterteilen. Diese Arbeit wird meist nicht von einem einzigen Programm übernommen, sondern bedarf einer schrittweisen Verarbeitung der Daten mit Hilfe unterschiedlicher Software unterschiedlicher Hersteller.

2.4.1.1 Dateikonversion

Abhängig von den verwendeten Massenanalytoren bzw. deren Hersteller werden die erhaltenen Daten in herstellerspezifischen Dateiformaten gespeichert. Diese sind jedoch nicht universell auswertbar und können von den meisten *Open Source* Programmen wie Mascot Daemon⁹³ nicht gelesen werden. Eine Konvertierung das Format mzML^{94,95}, wie von der Human Proteome Organisation (HUPO) als einheitlich festgelegt, muss daher zumeist erfolgen. Abhilfe schaffen auch hier *Open Source* Programme, wie MSConvert⁹⁶.

2.4.1.2 Signalprozessierung

Ziel der Signalprozessierung ist die Extraktion von Peaks inklusive der Werte für ihre Signalthöhe, der Breite auf halber Höhe und ihrer exakten Position im Massenspektrum als m/z. Um die Selektion von Rauschsignalen zu verhindern, wird zuvor meist eine Glättung der Basislinie vorgenommen und gegebenenfalls eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Für Tandem-MS-Analysen sind diese Daten dementsprechend für Precursor- und die resultierenden Fragment-Ionen vorhanden.

2.4.2 Datenbanksuche

2.4.2.1 Datenbanksuche MS: *Peptide Mass Fingerprint*

Abhängig von der Komplexität der Probe gestaltet sich die Datenbanksuche unterschiedlich. Für die Identifikation und Analyse eines einzelnen oder einiger weniger Proteine wird in einem Bottom-Up Experiment meist nur eine *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) Suche durchgeführt. Hierzu wird von der Suchmaschine ein Verdau - analog dem experimentell durchgeführtem - simuliert und die, in silico erzeugten, m/z Signale mit den gemessenen verglichen. Voraussetzung hierbei ist, dass die Aminosäuresequenz des gesuchten Proteins bekannt und in der Datenbank als solche hinterlegt ist. In Abhängigkeit von der Übereinstimmung des theoretischen und des praktischen Massenspektrums kann so eine Aussage zur Identität des Proteins und der Wahrscheinlichkeit zu dessen Richtigkeit getroffen werden. Der Quotient aus der Anzahl der gemessenen Signale, die ihrem theoretischen Äquivalent zugewiesen werden konnten, wird als Sequenzabdeckung oder *Sequence Coverage* (SC) bezeichnet. Diese Methode ist seit ihrer Entwicklung in den neunziger Jahren⁹⁷⁻⁹⁹ sehr gut etabliert und bildet in Kombination mit MALDI eine schnelle Methode zur qualitativen Analyse. Die SC wird in dieser Arbeit auch zur Ermittlung der Vollständigkeit des tryptischen Proteinverdaus herangezogen. Als Suchmaschine wurde z.B. Mascot⁹³ (Matrix Science) verwendet.

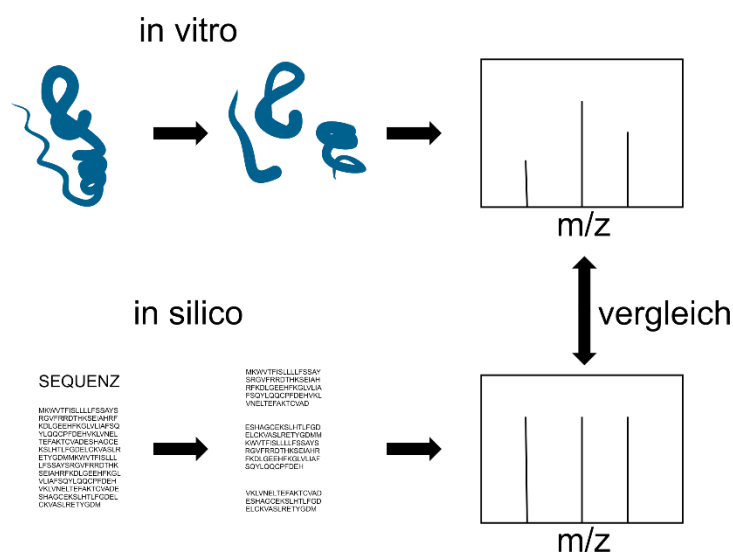


Abb. 2.16: Ablauf des Peptide Mass Fingerprintings

2.4.2.2 Datenbanksuche MS/MS: *Peptide Fragment Fingerprint*

Für die Identifikation von Proteinen aus komplexen Peptidgemischen wird zunächst die Komplexität der Probe via HPLC reduziert und anschließend mit Aufnahme von MS/MS Spektren analysiert. Somit werden in der Datenbanksuche die Muster der erzeugten Peptidfragmente (Peptide Fragment Fingerprint, PFF) verglichen. Für Proteine mit unbekannter Sequenz existiert die Möglichkeit der De-Novo Sequenzierung, bei der Algorithmen Ionenserien anhand von Signalabständen berechnen¹⁰⁰. Diese sehr rechen- und zeitintensive Vorgehensweise wird selten verwendet, bildet aber die Grundlage für Spektren von Datenbanken. Diese fungieren als Fingerprint Datenbank, bei der das aufgenommene Spektrum mit denen der Datenbank auf Kongruenz geprüft wird. Dieses Verfahren ist sehr schnell und zuverlässig, ist jedoch auf eine möglichst vollständige Datenbank angewiesen, was sich vor allem bei Verwendung von anderen Proteasen als Trypsin als schwierig erweist.

2.4.2.3 Datenbanksuche MS/MS: Mascot

In dieser Arbeit wurde mit Mascot⁹³ (Matrix Science) gearbeitet, die zu den Protein-Datenbank Suchmaschinen zählt. Hierzu müssen Proteinsequenz und Modifikationen¹⁰¹ bekannt sein. Ein in-silico Verdau inklusive anschließender, theoretischer Fragmentierung aller ermittelten Precursor-Ionen ergibt theoretische Fragmentationenspektren, die mit den aufgenommenen Massenspektren verglichen werden, analog zu der Vorgehensweise im PMF. Zur Beschleunigung der Suche und zum Eingrenzen falsch positiver Ergebnisse werden dazu im Vorhinein Parameter wie Spezies des Proteoms, chemische Modifikationen, tolerierte MC, aber auch gerätespezifische Angaben wie erwarteter Ladungszustand, verwendeter Massenanalysator und Massentoleranz definiert.

2.4.2.4 Datenbanksuche MS/MS: Target-Decoy-Search

Parallel dazu wird eine Target-Decoy-Suche durchgeführt. Bei dieser wird nach Übereinstimmungen zwischen den aufgenommenen Spektren und einer Datenbank Attrappe (Decoy) gesucht, die willkürlich generierte, nicht biogene Sequenzen enthält. Diese kann z.B. durch Mischen von Teilsequenzen oder durch Umkehren der Aminosäuresequenzen erzeugt werden. Übereinstimmungen mit dieser Decoy-Datenbank werden als falsch-positive Ergebnisse gewertet. Der Quotient aus Anzahl der Treffer in der Decoy Suche und der Funde in der regulären Datenbanksuche¹⁰² wird als False Discovery Rate (FDR) bezeichnet und beschreibt die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Resultate¹⁰³. Zumeist wird eine Peptid-FDR von maximal 1% gefordert¹⁰⁴, die Berechnung der Protein-FDR ist ein weniger verbreitetes Konzept¹⁰⁵.

2.4.2.5 Datenbanksuche MS/MS: *Mascot Percolator*

Das von Matrix Science zur vertriebene Programm *Percolator* basiert auf einem Algorithmus zur Unterscheidung von richtig und falsch identifizierten Spektren. Hierzu wird „Machine Learning“, eine Form der künstlichen Intelligenz (KI) verwendet^{106–108}. Ergebnisse einer *Percolator* Suche sind die Werte wie u.a. Mascot Score, Massenabweichung der Vorläuferionen und Fragmente, sowie Anzahl variierender Modifikationen.

2.4.3 Datenanalyse

Die tiefgreifende Datenanalyse ist stark abhängig von der Fragestellung der jeweiligen Forschungsarbeit. So können zum Beispiel Proteine auf ihre Lokalisation in der Zelle, ihre physikochemischen Eigenschaften oder ihre Abundanz hin untersucht werden. Weiterhin können die identifizierten Proteine auch zum Vergleich von Methoden der Probenvorbereitung dienen, wie es in dieser Arbeit der Fall ist. Die verwendeten Analysemethoden werden im Kapitel Material und Methoden ausführlich beschrieben.

2.5 Quantitative Massenspektrometrie

In den bisherigen Kapiteln wurde primär die Identifikation von Proteinen und damit die Möglichkeit zu qualitativen Aussagen erläutert. Da die Signalintensität in Abhängigkeit zur Anzahl detektierter Ionen steht, ist die Massenspektrometrie naturgemäß zur Quantifizierung, geeignet. Allgemein wird zwischen absoluter und relativer Quantifizierung unterschieden. Absolute Quantifizierungsmethoden wie QconCAT¹⁰⁹ arbeiten mit Zugabe eines internen Standards vor der Probenvorbereitung. Relative Quantifizierungen vergleichen Proteinkonzentrationen zweier Proben und es bieten sich heute eine Vielzahl von Methoden¹¹⁰ an, wie in Abb. 2.17 dargestellt. Die quantitative Auswertung erfolgt dabei ebenfalls über Softwarelösungen, wie z.B. MaxQuant¹¹¹.

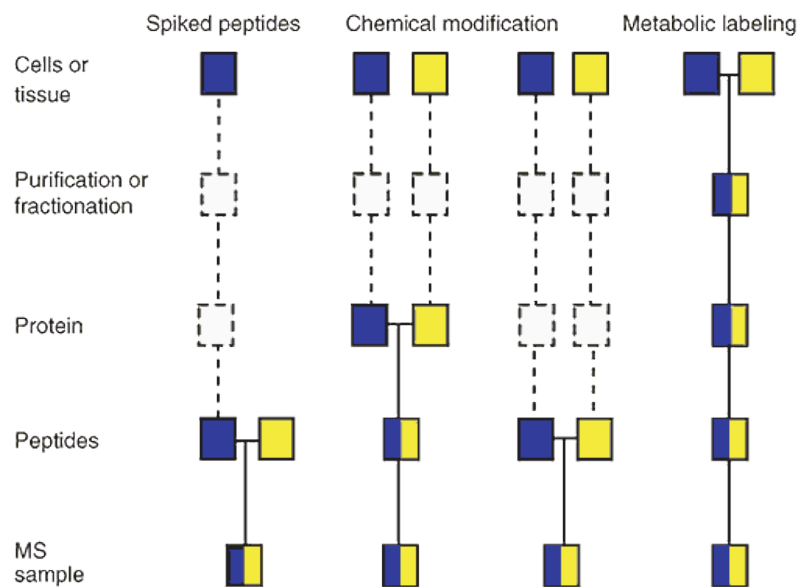


Abb. 2.17: Strategien zur relativen Quantifizierung in der Massenspektrometrie

(Abb. von Mann et. al¹¹²)

2.5.1 Markierung mit schweren Isotopen

Alternativen Verdaustrategien, wie dem ArgC-analogen Ansatz, die auf der Einführung chemischer Modifikationen basieren, ist das Potential zur relativen Quantifizierung inhärent. Dafür muss jedoch eine ausreichend hohe Massendifferenz zwischen leichtem und schwerem Peptid erreicht werden, deren Mindestgröße in Abhängigkeit des Auflösungsvermögens des Massenanalysators steht. Die Verwendung von MALDI zur Ionisierung produziert dabei Ionen von einfacher Ladung, die auch bei geringen Massendifferenzen und mit Detektoren von relativ niedrigerer Auflösung differenziert dargestellt werden können.

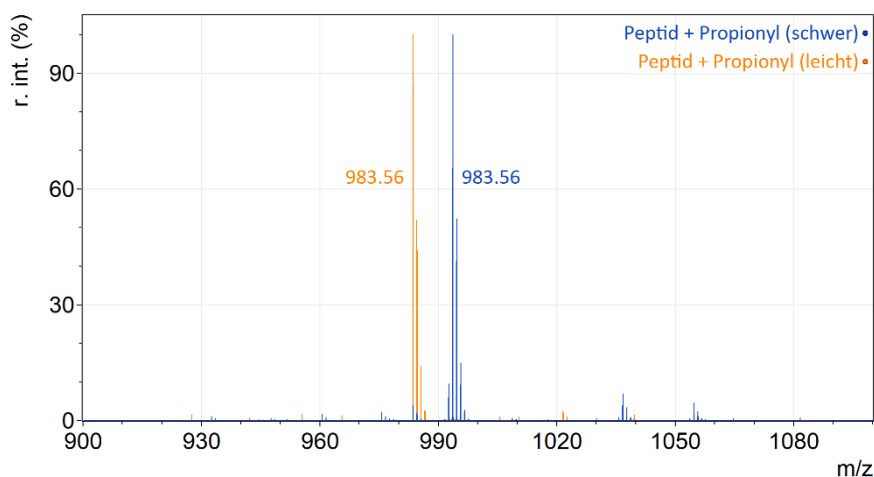


Abb. 2.18: MALDI-Spektren des Peptids AAAAKAAAAR
Lysin und N-Terminus propionyliert mit leichtem und deuteriertem PA

2.5.2 Normalized Spectral Abundance Factor - NSAF

Zur Berechnung der Abundanz der mittels MS/MS identifizierten Proteine wurde der NSAF herangezogen. Dieser Faktor wird für je ein Protein k aus dem Quotient der Zahl aller k -identifizierenden MS²-Spektren und dessen Länge (L) dividiert durch den Quotienten der Summe aller n Proteine und L ¹¹³.

$$NSAF_k = \left(\frac{SpC}{L}\right)_k / \sum_{t=1}^N \left(\frac{SpC}{L}\right)_f$$

Ziele der Arbeit

3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zur proteomischen Probenvorbereitung, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Karas hervorgebracht wurden, aufzugreifen und weiterzuentwickeln. Die Motivation dabei war es, ein Protokoll zu entwickeln, mit dem sich das Proteom unmittelbar aus einem Zell-Lysat extrahieren lässt, verlustfreie chemische Modifikation der immobilisierten Proteine erlaubt und reproduzierbar hohe Identifikationszahlen liefert.

Der proteolytische Verdau auf Silicabeads soll dazu zunächst weiter untersucht werden, da er eine vielversprechende Basis für eine Proteomextraktion aber auch chemische Modifikation bietet. Dafür soll zunächst ein Reagenz zur Zell-Lyse gefunden werden, das die Extraktion der Proteine aus dem Lysat nicht kompromittiert und im Idealfall begünstigt. In diesem Zuge soll der Einfluss der Reduktion und Carbamidomethylierung, als Teil der Routine zur proteomischen Probenvorbereitung analysiert werden, um anschließend die Formulierung eines kombinierten Aufreinigungs- und Verdauprotokolls zu ermöglichen. Dieses soll mit Standardmethoden der Proteomik verglichen werden und auf mögliche Vor- und Nachteile gegenüber diesen hin untersucht werden. Dabei soll das Verfahren gering in Kosten, Zeitaufwand und Fehleranfälligkeit bleiben bei gleichzeitiger Verbesserung der Leistung hinsichtlich Identifikationen, Reproduzierbarkeit und Zugänglichkeit schwerlöslicher Proteine.

Ergänzend soll die Anwendbarkeit des ArgC-analogen Verdaus auf das entwickelte Protokoll getestet und beschrieben werden. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Synergie beider Verfahren.

Abschließend gilt es die Grenzen der Anwendbarkeit der Methode zu beschreiben und gegebenenfalls weitere Verbesserungen und Vereinfachungen zu testen.

Material und Methoden

4 Material und Methoden

4.1 Materialien, Geräte und Programme

4.1.1 Modellproteine und Proteome

Anfängliche Experimente wurden zur besseren Reproduzierbarkeit mit kommerziellen Proteinproben durchgeführt. Anwendbarkeit der Methoden im proteomischen Alltag wurde mit lebenden Zelllinien und frischen Lysaten überprüft.

Tab. 4-1: Verwendete Proteine und Proteome

Modellpeptide	Lieferant
AAAAKAAAAR	JPT Peptide Tech. GmbH, Berlin, DE
AAAASAAAAR	JPT Peptide Tech. GmbH, Berlin, DE
AAAACAAAAR	JPT Peptide Tech. GmbH, Berlin, DE
AAAAYAAAAR	JPT Peptide Tech. GmbH, Berlin, DE
Modellproteine	
Bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Apo-Serotransferrin (<i>bovin, human</i>)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Alkohol-Dehydrogenase (<i>human</i>)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Proteome	
<i>Escherichia coli</i>	AK R. Marschalek, Inst. für Pharm. Bio., Frankfurt
<i>Human</i> (HEK 293T Zellen)	AK R. Marschalek, Inst. für Pharm. Bio., Frankfurt

4.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Einzelne Chemikalien befinden sich unter Angabe der Hersteller im Anhang als Tabelle (Tab. 0-3). An dieser Stelle sind die daraus hergestellten Reagenzien beschrieben.

4.1.2.1 Puffer

Puffer für SDS-PAGE Experimente sind in Kapitel 4.4.1 gelistet.

L-Glutamin-Stock (10 %)	
L-Glutamin (Carl Roth)	0,5 g
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (GE Healthcare)	4,5 mL
Lämmli-Puffer (reduktiv)	
Wässrige SDS –Lösung 10%	4,0 mL
Tris-HCl Lösung (1M, pH 6,8)	1,2 mL
Bromphenolblau 1% in Wasser	0,2 mL
MilliQ Wasser	2,6 mL
DDT-Stock Lösung (frisch vor Anwendung)	2 mL
Phosphatpuffer pH 4	
Natriumdihydrogenphosphat (Carl Roth)	1,2g
Salzsäure 10%	Ad pH 4
MilliQ Wasser	Ad 100ml
Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) Puffer 100mM	
Triethylammonium bicarbonate buffer 1M (Sigma Aldrich)	10ml
MilliQ Wasser	90ml
Verdaupuffer (Trypsin)	
Trypsin, dimethyliert, proteomics grade (Sigma Aldrich)	20µg
TEAB 0,1M	200µl
Zellmedium	
HyClone (DMEM/high glucose) (GE Healthcare)	500 mL
Bovine Calf Serum (GE Healthcare)	50 mL
L-Glutamin Stock (10%)	5,0 mL
Penicillin/Streptomycin Lösung (Biochrom/Merck)	5,5 mL

4.1.2.2 Reaktive Lösungen

Chloracetamid (CIAA)-Stock	
Chloracetamid (Sigma Aldrich)	60 mg
MilliQ Wasser	AD 1 mL
Coomassie Färbelösung	
Brilliantblau G 250 (Carl Roth)	0,25 g
Eisessig	10 mL
Methanol	45 mL
MilliQ Wasser	45 mL
Dithiothreitol (DTT)-Stock	
Dithiothreitol (Carl Roth)	30 mg
MilliQ Wasser	AD 1 mL
Hydroxylaminlösung 10 %	
Hydroxylaminlösung 50 % (Sigma Aldrich)	200 µL
MilliQ Wasser	800 µL
Iodacetamid (IAA)-Stock	
IAA (Sigma Aldrich)	60 mg
MilliQ Wasser	AD 1 mL
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)-Stock (0,5 M)	
TCEP-HCl (Sigma Aldrich)	143 mg
MilliQ Wasser	AD 1 mL
Urea (8M)	
Harnstoff (Carl Roth)	48 g
MilliQ Wasser	AD 100 mL

4.1.3 Geräte

Die verwendeten Geräte sind im Anhang tabellarisch gelistet (Tab. 0-1), detaillierte Information zu den verwendeten Massenspektrometern und Flüssigchromatographieanlagen sind in Kapitel 4.5 enthalten.

4.1.4 Software

Ergänzend zu den datenanalytischen Softwares aus Kapitel 2.4.3 sind alle weiteren Programme die zur Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden im Anhang gelistet (Tab. 0-4).

4.2 Probenvorbereitung

4.2.1 Enzymatischer Verdau gelöster Proteine

Angaben beziehen sich auf 0,1 mg Protein gelöst in Puffersystemen pH 6,8-7,4

- 1 Reduzieren der Disulfidbrücken mit 5 μ L DTT Stammlösung (30 mg/mL) über 45 min bei 57°C.
- 2 Alkylieren der Thiole mit 5 μ L IAA-Lösung (60 mg/mL) bei RT über 45 min im Dunkeln.
- 3 Inaktivierung von IAA mit 5 μ L DTT Stammlösung bei RT über 15 min.
- 4 Zugabe von Trypsin (Enzym/Protein 1:100) und Inkubation über Nacht bei 37°C
- 5 Zugabe von TFA (10%) zur Einstellung auf pH 3.

4.2.2 Zellkultur und Zellernte

E. coli Kulturen werden in selektivem Wachstumsmedium aufgetaut und über Nacht in 50ml bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend bei 10000g für 10min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und verworfen.

Adhäsive *Humane Embryotic Kidney* (HEK) Zellen der Variante 293T, zur Kultur bereitgestellt vom Arbeitskreis für Pharmazeutische Biologie, Prof. Dr. Rolf Marschalek, werden in Zellmedium (siehe 4.1.2.1) auf 10 cm Platten ausgebracht und bei 37°C inkubiert bis zu gleichmäßigem, dichten Zellrasen. Medium wird bei Bedarf gewechselt.

Zellmedium wird abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und der Überstand entfernt. Die Zellen werden mit 5ml PBS vom Schalenboden gespült und in Suspension gebracht. Die Zellsuspension wird in ein 15ml Falcon überführt und bei 300 rpm suspendiert. Der Überstand wird entfernt, und das Pellet erneut mit 1ml PBS resuspendiert, aufgenommen und in ein Eppendorf Tube überführt. Nach erneuter Sedimentation und entfernen des Überstands wird das Zellpellet lysiert.

4.2.3 Zell-Lyse

E. coli Zellpellets werden mit BugBuster® Protein Extraction Reagent im Verhältnis 1ml Reagenz per 200mg Zentrifugat lysiert. 3µl Lysonase™ pro ml BugBuster werden zur Zersetzung von Polynucleotiden und damit zur Verringerung der Viskosität eingesetzt. HEK 293T Zellen werden je nach Vorbereitungsprotokoll mit BugBuster, 8M Harnstofflösung oder 6M Guanidinhydrochloridlösung unter Zusatz von 3µl Lysonase pro ml Lysat bei Raumtemperatur über 15 Minuten lysiert.

4.2.4 Acetonfällung

- 1 Versetzen des sedimentierten Zellpellet mit dem 10-fachen Überschuss an eisgekühltem Aceton (-20°C)
- 2 Ausfällen des Proteoms bei -20°C über Nacht, mindestens aber 4 h
- 3 Pelletieren des Proteoms bei 18×10^3 g über 5 min
- 4 Trocknen des Pellet bei 37°C und anschließendes Wiegen
- 5 Auflösen des Pellet bei 37° unter Schütteln mit TEAB 1 M zu einer Endkonzentration von 1mg/mL
- 6 Ggf. Kontrolle der Proteinkonzentration mittels BCA Assay
- 7 Aliquotierung der Lösung zu Proben von je 100 µg Protein.
- 8 Weiterverarbeitung als Probe gelöster Proteine

4.2.5 Filter Aided Sample Preparation (FASP)

- 1 Reduzierte (s.o.) Proteinlösung entsprechend 100 µg Protein versetzt mit 200 µL Harnstofflösung (mitgeliefert) auf den Spin Filter gegeben und zentrifugiert bei 14×10^3 g für 15 min.
- 2 Waschen des Filters durch Zentrifugation mit weiteren 200 µL Harnstofflösung bei 14×10^3 g für 15 min.
- 3 Verwerfen des Durchflusses im Sammelgefäß
- 4 Vortexen des Filters mit 10 µL 10-facher Iodacetamid Lösung (mitgeliefert) und 90 µL Harnstofflösung für 1 min und anschließende Inkubation für 20 min im Dunkeln.
- 5 Zentrifugieren bei 14×10^3 g für 15 min.
- 6 Zweimaliges Waschen des Filters durch Zentrifugation mit weiteren 100 µL Harnstofflösung bei 14×10^3 g für 15 min.
- 7 100 µL Ammonium Bicarbonate Lösung 50 mM (mitgeliefert) auf den Filter geben, Zentrifugieren bei 14×10^3 g für 10 min. (2x wiederholen)
- 8 Zugabe von 75 µL Trypsinlösung (Enzym/Protein 1:100), vortexen für 1 min. Abdichtung der Filtertubes mit Parafilm um Flüssigkeitsverlust zu vermeiden. (Zur Vergleichbarkeit der Methoden wurde die gleiche Charge Trypsin im gleichen Verhältnis Protein/Enzym (100:1) für alle Experimente verwendet.)
- 9 Inkubation des Spin Filters bei 37°C über Nacht
- 10 Überführen des Spin Filters auf ein Eppendorf Tube.
- 11 Elution der Peptide mit 40 µL Ammonium Bicarbonate Lösung (50 mM). Zentrifugieren bei 14×10^3 g für 10 min. (1x wiederholen)
- 12 50µL NaCl Lösung (0.5 M, mitgeliefert), Zentrifugieren bei 14×10^3 g für 10 min
- 13 Ansäuern des Peptidgemischs mit 8-10 TFA µL (10%) bis zu einem pH von 3.

4.2.6 Kovalentes Binden an paramagnetische Beads

4.2.6.1 NHS-Beads

1. Mischen der Proteinlösung und der magnetischen Beads durch vortexen im Eppendorf Gefäß. Inkubation unter Schütteln für 4-6 Stunden oder über Nacht.
2. Platzieren der Eppendorf Tubes auf magnetischem Ständer für 1-3 Minuten bis zur vollständigen Trennung von Beads und Überstand.
3. Entfernen des klaren Überstands und Waschen der Beads mit TEAB 100 mM durch vortexen und anschließendes magnetisches Separieren. (2x wiederholen)
4. Inkubation mit 0.5-1ml blocking buffer (Ambic 1M) zur Inaktivierung über 1 h.
5. Entfernen des Überstands auf magnetischem Ständer und Resuspendierung in TEAB 1 M.
6. Weiterverarbeitung als Probe gelöster Proteine

4.2.6.2 Aldehyd-Beads

1. Unter einem Abzug werden Proteinlösung, Beads und 10 μL NaCNBH_3 Lösung (10 μL pro mL; Endkonzentration 50 mM) gemischt.
2. Inkubation für 1 h bei RT or 4° über Nacht unter Schütteln.
3. Dreimaliges Waschen mit 1 ml Coupling Buffer (0.1 M Na_3PO_4 , pH 7.0)
4. Inkubation mit 0.5-1ml Blocking Buffer (1 M Tris•HCl, 0.05% NaN_3 , pH 7.4) und 5-10 μL NaCNBH_3 Lösung (Endkonzentration 50 mM) für 1 h bei RT.
5. Fünfmaliges Waschen mit 1 ml Washing Buffer (1 M NaCl, 0.05% NaN_3)
6. Entfernen des Überstands auf magnetischem Ständer und Resuspendierung in TEAB 1 M.
7. Weiterverarbeitung als Probe gelöster Proteine

4.2.7 Unspezifische Adsorption an paramagnetische Silica-Beads

- 1 Volumen einer Proteinlösung entsprechend 100 µg Protein werden mit 10 µL magnetischer Silica Beads (40mg/mL) gemischt und mit Phosphatpuffer bei pH 4 zu 0,1 mL kombiniert und für 15min inkubiert.
- 2 Reduzieren der Disulfidbrücken mit 5 µL DTT-Lösung (30 mg/mL) bei 57°C über 45min.
- 3 Alkylieren der Thiole mit 5 µL IAA-Lösung (60 mg/mL) bei RT über 45 min im Dunkeln.
- 4 Entfernung des Überstands auf magnetischem Eppendorf Tube Ständer
- 5 Zweimaliges Waschen der Beads mittels Vortexer mit 0,2 mL TEAB 0,1 M
 - a) (nur bei ArgC-like): Resuspendierung der Beads in 0,5 mL MeOH/TEAB 1M (4:1) oder 0,5 mL Acetonitril.
 - b) (nur bei ArgC-like): Zugabe von 6 µL Propionsäureanhydrid und Inkubation für 2-4 h bei 4°C
 - c) (nur bei ArgC-like): Quenching über 5 min mit 0,1 mL Hydroxylaminlösung (50%) nach Entfernen des organischen Überstands
 - d) (nur bei ArgC-like): Zweimaliges Waschen der Beads mittels Vortexer mit 0,2 mL TEAB 0,1 M nach Entfernen des Überstands
- 6 Verdau über Nacht bei 37°C auf den Beads mit Trypsin (Enzym/Protein 1:100) nach Resuspendierung in 90 µL TEAB (0,1 M).
- 7 Überführen des Überstands in frisches Eppendorf Tube; Abstoppen des Verdaus mit 8-10 µL TFA (10%) bis zu pH 3

4.2.8 Alternative Proteinmodifikation

Angaben für 100 µg Protein - Ersetzt 4.2.7 Schritte 1-5b

4.2.8.1 Simultan

- Lysat in Urea (8M) AD 50 µL mit Urea (8M)
- Acetonitril (100 %) AD 100 µL
- 2 µL TCEP-Stocklösung (0,5 M)
- 5 µL CIAA-Stocklösung (0,73 M)
- 1µL Propionsäureanhydrid (100 %) (PA)

Inkubation auf Silicabeads für 2h bei RT im Dunkeln.

4.2.8.2 Semi-Sukzessive

- Lysat in Urea (8M) mit Phosphatpuffer pH 4 AD 100 µL
- 2 µL TCEP-Stocklösung (0,5 M)
- 5 µL CIAA-Stocklösung (0,73 M)

Inkubation auf Silicabeads für 1h bei RT im Dunkeln.

- Überstand entfernen
- 0,5 mL Acetonitril (100 %)
- 5 µL PA

Inkubation bei 4°C über 2h

4.2.10 Peptidaufreinigung und Aufkonzentration

Die proteolytisch erzeugten Peptide sollten vor dem Überführen in ein HPLC System oder der Co-Kristallisation für MALDI von Pufferrückständen und Silicapartikeln (nach On-Bead Verdau) befreit werden.

4.2.10.1 Stage-Tips

Eine 200 µL Pipettenspitze wird, je nach Probenmenge, mit 2-5 ausgestochenen C18 Membranscheiben (Ø ca. 1mm) bestückt. Aktivierung erfolgt mit 50 µL Methanol durch hindurchpressen der Flüssigkeit mithilfe einer Multipette® (Eppendorf). Äquilibriert wird im ersten Schritt mit 50 µL Acetonitril/Wasser/Essigsäure (80:19,5:0,5) und im zweiten mit 50 µL Essigsäure (0,5%). Peptidlösung angesäuert auf pH 3 wird anschließend mit der Multipette durch die Membranschichten gepresst. Bei niedrig konzentrierter Probenlösung oder großen Volumina kann dies in mehreren Schritten erfolgen. Nach Waschen mit 50 µL Essigsäure (0,5%) wird mit 30 µL Acetonitril/Wasser/Essigsäure (80:19,5:0,5) in ein Eppendorf Tube eluiert.

4.2.10.2 C18 Spin Columns

Aufreinigung über kommerziell erhältliche C18 Säulchen erfolgte exakt nach Herstellerangaben (Pierce® C18 Spin Columns, Thermo Scientific).

4.2.10.3 Vakuumzentrifugation

Aufgereinigte, mit ACN/Essigsäure eluierte Peptide können anschließend mittels Vakuumzentrifuge eingetrocknet werden um Verlängerung der Haltbarkeit, Versand oder Pufferaustausch zu ermöglichen.

4.3 Biotechnologische Probenanalyse

4.3.1 Bicinchoninic acid (BCA) assay

BCA Assays („Pierce™ BCA Protein Assay Kit“, Thermo Fisher Scientific) wurden zur Ermittlung des Proteingehalts in Zell-Lysaten und zur Quantifizierung von auf Beads immobilisiertem Protein durchgeführt. Für ersteres wurde strikt nach Herstellerangaben eine Kalibriergerade mittels des mitgelieferten BSA-Standards erstellt und die Probenkonzentration anhand dieser berechnet.

Dabei werden 10µl Standard bzw. Probenlösung mit 200µl frisch hergestellter Reagenzlösung gemischt, bei 37°C für 30min inkubiert und colorimetrisch in einer 96 Well Microtiterplatte via TECAN infinite M200 bei 562nm vermessen. Zell-Lysate wurden zuvor 1:10 mit MilliQ-Wasser verdünnt um im, durch den externen Standard vorgegebenen, linearen Bereich der Lambert-Beer'schen Funktion messen zu können.

Zur relativen Quantifizierung auf Beads wurden 3 Ansätze frischer Reagenzlösung mit den reinen magnetischen Beads (blank), mit darauf immobilisiertem Protein (sample), sowie einmal mit der reinen Proteinlösung (stock) inkubiert. Magnetische Beads wurden vor der Vermessung entfernt. Die Berechnung der prozentualen Extraktionseffizienz (EE) wurde wie folgt mittels der Absorption (A) berechnet:

$$EE(\%) = 100 * \frac{A(\text{sample}) - A(\text{blank})}{A(\text{stock})}$$

Die Extraktionseffizienz findet Verwendung bei der Untersuchung unterschiedlicher potentieller Einflussfaktoren auf die Bindekapazität der Silicapartikel.

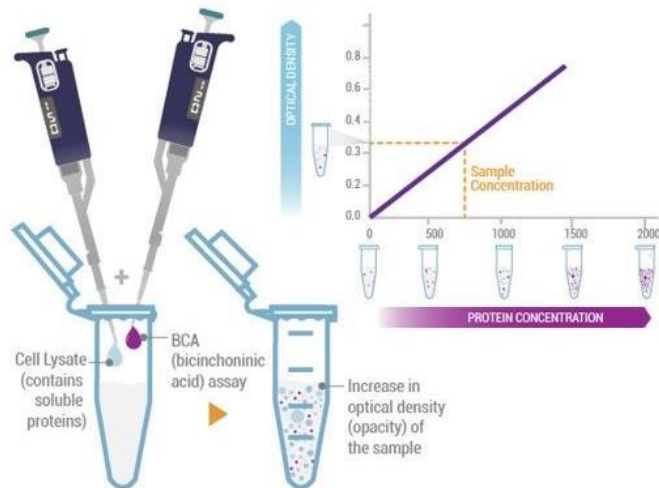


Abb. 4.1: Funktionsweise des BCA-Assays
(Abb. von Boster, Web, <https://www.bosterbio.com>)

4.3.2 Tryptophan Assay

Proteinquantifizierungen wurden teilweise auch mittels Gehalt an Tryptophan (W) fluorimetrisch ermittelt⁴³. Reine Tryptophanlösungen werden als Standard zur Erstellung einer Kalibriergeraden verwendet. Tryptophan variiert in seinem Vorkommen in menschlichen Zellen nur gering ($1,19\% \pm 0,06\%$). Probenlösungen in Mikrotiterplatten mit 96 Wells wurden hierzu mittels TECAN infinite M200 bei 295 nm angeregt, die Emission wurde bei 350nm gemessen. Analog wurde immobilisiertes Protein auf magnetischen Beads unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

4.3.3 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Als Fluoreszenzmarker wurde Fluorescein-5-Maleimid (Thermo Fisher) verwendet, welches, nach Reduktion der Proteindisulfidbrücken durch DTT ($150 \mu\text{g}/100\mu\text{g}$ Protein) und anschließender Entfernung des Reduktionsmittels, in 100 mM TEAB Puffer bei pH 6,8 an die freien Thiole der Cysteine gebunden wurde. Unter Anregung von 460 nm Wellenlänge kann unter dem Mikroskop eine intensive Fluoreszenz gemessen werden.

4.4 SDS-PAGE

4.4.1 Polyacrylamid Gele

4.4.1.1 Trenngel

Trenngele wurden frisch auf einem PROTEAN-Mini Gel Caster gegossen und anschließend sofort mit 1-Butanol überschichtet um ein vorzeitiges Auspolymerisieren durch Luftsauerstoffradikale zu unterbinden und eine gerade Oberkante zu gewährleisten.

10%

Rotiphorese® Gel 30 (Carl Roth)	4.9mL
Trenngelpuffer pH 8.8	3.75mL
MilliQ Wasser	6.2mL
TEMED (Carl Roth)	15µL
Ammoniumperoxodisulfat (10%)	150µL

12%

Rotiphorese® Gel 30 (Carl Roth)	6mL
Trenngelpuffer pH 8.8	3.75mL
MilliQ Wasser	4.7mL
TEMED (Carl Roth)	15µL
Ammoniumperoxodisulfat (10%)	150µL

4.4.1.2 Sammelgel

Nach 45 min wurden die Trenngele mit Sammelgel überschichtet, mit einem Gelkamm verschlossen und nach vollständiger Polymerisation luftdicht verschlossen über Nacht bei 8°C gelagert um radikalische Produkte aus Protein und Acrylamiden zu vermeiden.

Rotiphorese® Gel 30 (Carl Roth)	1.3mL
Sammelgelpuffer pH 6.8	2.5mL
MilliQ Wasser	6.1mL
TEMED (Carl Roth)	10µL
Ammoniumperoxodisulfat (10%)	100µL

4.4.2 Elektrophorese

Zelllysate, sowie deren Überstände nach Extraktion und Verdau wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Trenngele zu 10% und 12% wurden hierzu mit 8%igen Sammelgelen überschichtet. Proben entsprechend 20 µg Protein wurden parallel zu den Größenmarkern Precision Plus Protein (10% Gele) bzw. Precision Plus Protein Dual Xtra (12% Gele) in einer PROTEAN Elektrophoresekammer aufgetrennt. Zur Verbesserung der Auflösung wurde eine erniedrigte Spannung von 35V beim Durchlaufen des Sammelgels angelegt. Die Trennung erfolgte bei konstanten 100V. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel einer Lösung aus Methanol/Wasser/Eisessig (40:50:10) fixiert.

4.4.3 Detektionsmethoden

4.4.3.1 Coomassie Staining

Fixierte PAA Gele wurden mit Coomassie Blue Staining Solution über Nacht bei RT geschüttelt, anschließend mit Destaining Solution entfärbt bis zum Erhalten eines maximalen Kontrasts zwischen Proteinbanden. Die Gelmatrix wurde weiter in Washing Solution inkubiert bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds. Gele wurden mit Untergrundbeleuchtung gescannt oder fotografiert.

4.4.3.2 SYPRO Ruby Staining

Färbung mit fluoreszenzaktivem SYPRO Ruby erfolgte über Nacht mit fixierten Gelen unter Schütteln. Nach mehrmaligem Waschen mit „Washing Solution“ wurde das Gel mittels ChemiDoc XRS+ mit Image Lab Software (BioRad) unter der Voreinstellung für SYPRO Ruby unter UV-Licht fotografiert.

4.5 Massenspektrometrische Analyse

4.5.1 MALDI LTQ-Orbitrap XL

Peptidlösungen werden hierzu mit Spotting Lösung (70% ACN, 0,1% TFA) im Verhältnis 1:5 gemischt und anschließend 1:1 mit Matrixlösung (α -Cyano-4-hydroxycimtsäure 3mg in 1mL Spotting Lösung) versetzt. Nach Trocknung der Spots aus je 1 μ L auf einem 384-Well Probensteller wird erneut mit 1 μ L Spotting Lösung umkristallisiert, um eine gleichmäßige Kristallisation zu erhalten. Eine Vormessung zur Einstellung der optimalen Laserenergie wird vor der Probenanalyse durchgeführt. Die Messungen erfolgen im Fourier-Transformations- und Positiv-Modus bei einer Auflösung von 30 000 (FWHM) im Massenbereich von 800 - 4000 m/z, wobei 50 Einzelmessungen eines Spots zur Generierung einer Datei akkumuliert werden.

4.5.2 ESI: HPLC-MS/MS

Proben für zur Analyse mit ESI werden nach dem Eintrocknen (4.2.10.3) in ESI Lösung A aufgenommen (1% ACN, 0,5% FA).

4.5.2.1 Dionex Ultimate 3000 LC, Q Exactive

Für LC-MS/MS Analysen auf einer Q Exactive mit vorgeschalteter Dionex Ultimate 3000 LC und Nanospray Flex Ion-Source (alle Thermo Scientific) erfolgt die Peptidseparation auf einer Vorsäule mit C18 Umkehrphase (Thermo Scientific) und einer Hauptsäule (Pico frit Emitter Tip, New Objective, \emptyset 100 μ m, Länge 15 cm) gepackt mit Reprosil C18 Material (2,4 μ m, Dr. Maisch).

Der Gradient entwickelt sich von 5% mobiler Phase A (4% ACN, 0.1% FA) zu 30% mobiler Phase B (80% ACN, 0.1% FA) über 70min bei einer Flussrate von 300nL/min. Ein zweiter Gradient von 60% Phase B für 30min bei gleicher Flussrate ist vor die finalen 99% Phase B geschaltet.

Letztere läuft für 5min und geht dem Reäquilibrieren mit 1% Phase B voraus. MS Spektren werden im positiven Ion Mode im Massenbereich 300 bis 2000m/z (MS, MS/MS), und einer Auflösung (FWHM) von 70 000 (MS) bzw. 17 500 (MS/MS) aufgenommen. Automatic gain control (AGC) Limits werden auf 3×10^6 (MS) und 10^5 (MS/MS) Ladungszahlen festgelegt. Maximale Ioneneinjektionszeit von 160 ms (MS) und 150 ms (MS/MS) werden eingestellt, wobei die häufigsten 15 Ionen mit positiver Ladung (2+ oder höher) mit einem Zeitfenster von 2m/z für MS/MS Scans isoliert wurden und im Anschluss für 30s nach ihrer Fragmentierung von erneuter Selektion ausgeschlossen wurden. Zur Dateigenerierung dient XCalibur (Thermo Scientific, Waltham, USA).

4.5.2.2 EASY 1000 nLC, Q-Exactive Plus

Komplexe Peptidgemische, analysiert mittels Q-Exactive Plus in Kombination mit einer EASY 1000 Nano-LC, werden über eine Hauptsäule (\varnothing 75 μ m, Länge 500mm) gepackt mit C18 Material (2.7 μ m, Poroshell EC120, Agilent, USA) separiert. Gradienten variieren je nach Analyse zwischen 1-4h beginnend mit Lösung A (0.1% FA) zu 50% Lösung B (0.1% FA in 80% ACN) bei einer konstanten Flussrate von 250 nL/min. MS-Scans erfolgen bei einer Auflösung von 70 000, gefolgt von 10 MS/MS Scans bei 17 500 (AGC 5×10^5 , Maximale Ioneneinjektionszeit von 160 ms und Isolationsfenster von 1.8m/z).

4.6 Datenanalyse

4.6.1 Dateiprozessierung

LC-MS/MS Dateien von Thermo Instrumenten werden via MSConvert in das mzML Dateiformat konvertiert, um die Datenbanksuche mit Mascot zu ermöglichen. Python Module des MS Parser *Open Source* Pakets (Matrix Science, London) werden verwendet, um Peptid- und Proteinlisten aus den Mascot-generierten dat-Dateien zu extrahieren. Diese und weitere Operationen werden mithilfe von KNIME verknüpft und zur Automatisierung der Datenanalyse eingesetzt. Sehr große mzML-Dateien resultierend aus LC Läufen von >3h wurden initial manuell mit Mascot DAEMON prozessiert und die erhaltenen dat-Dateien anschließend dem Workflow in KNIME zugeführt. Detaillierte Abläufe der Datenanalyse werden im entsprechenden Kapitel 4.6.3 erläutert.

4.6.2 Datenbanksuche

Wie im Kapitel 2.4.2 beschrieben, werden Proteine oder Peptide mithilfe von unterschiedlichen Suchalgorithmen identifiziert. Die von Mascot (Matrix Science, London, UK) entwickelte Software erlaubt PMF- und PFF-Suchen innerhalb ihrer Datenbank. Zusätzlich kann eine Datenbank-Attrappe durchsucht werden bei einer sogenannten Decoy Suche. Hierzu wird eine randomisierte Datenbank erzeugt, indem die Aminosäuresequenzen zufällig gemischt oder umgekehrt werden. Die bei einer solchen Suche identifizierten Peptide sind als Decoys zu bezeichnen und sind, statistisch betrachtet, gleich den falsch-positiven Identifikationen bei einer regulären Datenbanksuche. Die aus den identifizierten Peptiden der regulären Suche (Targets) und den Decoys errechnete *False Discovery Rate* (FDR) dient damit als Maßzahl für die Zuverlässigkeit der von der Suchmaschine ausgegeben Ergebnisse.

$$FDR = \frac{n(Decoys)}{n(Targets)}$$

4.6.2.1 PMF – *Peptide Mass Fingerprint*

Für PMF-Experimente an Modellproteinen wird die eigens angelegte Datenbank AKK_Standard verwendet, die die Sequenzen verwendeter Proteine aus UniProt als FASTA Datei enthält. Die Datenbanksuche erfolgte entweder über die Suchmaske des Mascot-Servers oder die in einen entsprechenden KNIME-Workflow eingebettete Funktion. Variationen in den einzelnen Parametern werden im entsprechenden Ergebnisteil erörtert.

4.6.2.2 PFF – *Peptide Fragment Fingerprint*

SwissProt (Ver. 01_2018) Datenbanksuche für Taxonomie *Homo sapiens* (20,395 Einträge) wird mittels Mascot (vers. 2.6) mit je einem von zwei Parametersets durchgeführt. Für Proben von tryptischem Verdau wird dabei die Carbamidomethylierung von als fixe Modifikation definiert, N-term Acetylierung von Proteinen und Oxidation von Methionin als variable. Trypsin wird konsequent als verwendete Protease hinterlegt. ArgC-like Peptide hingegen werden, sofern nicht anders beschrieben, zusätzlich mit der fixen Modifikation von Propionylierung an Lysin und der variablen Propionylierung von Protein N-termini gesucht. Das simulierte Enzym ArgC wird dabei als Protease ausgewählt. Die Suche toleriert, je nach Experiment, bis zu 2 Missed Cleavages (MC) bei einer Abweichung bis zu 5 ppm der Vorläuferionen und bis zu 0.1 Da MS/MS Massentoleranz der Fragmente. *False Discovery Rates* (FDR) werden anhand Decoy Datenbank statistisch kalkuliert und die Ergebnisse mittels Percolator (MATRIX Science) zur Erhöhung von Spezifität und Sensitivität neu bewertet. Das von Schröder et al. identifizierte Signal von 140.107 m/z in MS/MS Spektren bei ArgC-like produzierten, propionylierten Fragmenten wird daher konsequent in den aufgenommenen MS/MS Spektren ignoriert um einen systematisch verzerrten Ionscore zu vermeiden.

4.6.2.3 Percolator

Ein zusätzliches Programm namens Percolator re-evaluiert Ergebnisse, die bei einer Datenbanksuche inklusive Decoy erhalten wurden. Die erfolgt durch teilüberwachtes, maschinelles Lernen, um die richtig-positive Zuweisung von Peptiden zu Spektren (PSM) zu verbessern und falsch-positive Ergebnisse zu minimieren.

4.6.3 Protein- und Peptidlistenanalyse

Die zur Auswertung verwendeten Programme sind hier gelistet, die vollständige Tabelle aller in dieser Arbeit eingesetzten Programme findet sich im Anhang.

4.6.3.1 MS Parser

Mascot Parser ist ein von Matrix Science bereitgestelltes Programm, das zur Extraktion der Informationen aus dat-Dateien dient. Diese Dateien sind nach erfolgreicher Datenbanksuche auf dem Mascot Server zugänglich und enthalten Details zu den identifizierten Peptiden, wie dem zugewiesenen Protein, der Masse, Peptidsequenz, Signalintensität und viele mehr.

4.6.3.2 KNIME

Knime¹¹⁴ dient als Basisplattform für die Datenanalyse der dat und MZML Dateien. Dabei werden die einfacheren Listenanalysen, Berechnungen und graphische Darstellungen direkt mittels Knime durchgeführt. Komplexere Analysen und Darstellungen erfolgen mittels Python oder R Scripts, die ihrerseits in Knime integriert werden können.

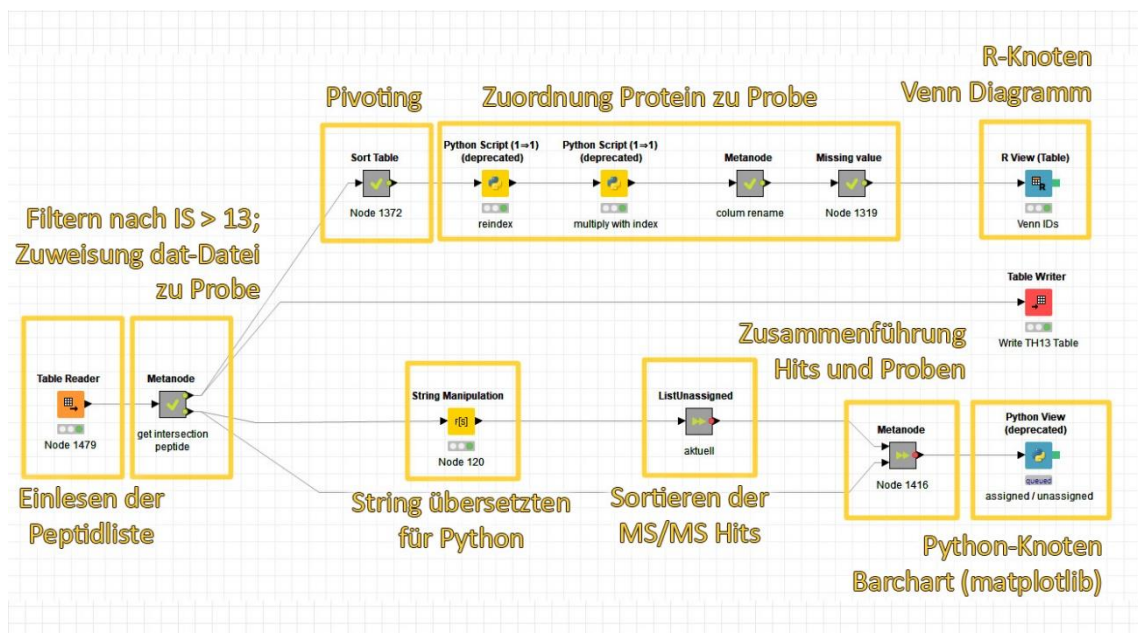


Abb. 4.2: Beispiel eines KNIME-Workflows

4.6.3.3 R

Die Programmiersprache „R“¹¹⁵ zur statistischen Auswertung der Proteinidentifikationen dient der Darstellungen von Venn Diagrammen in dieser Arbeit.

4.6.3.4 Python

Einzelne Module von Python¹¹⁶ finden Einsatz für Dateiimport, bioinformatische Kalkulationen und graphische Darstellungen als Knoten im Zuge von Knime Workflows:

Tab. 4-2: Verwendete Python Module

Modul	Version	Anwendung
BioPython ¹¹⁷	1.68	Bioinformatisches Werkzeug zur Ermittlung von GRAVY-Scores und IPs der Proteine bzw. Peptide
MS Parser	2.4	Siehe 4.6.3.1
pandas ¹¹⁸	0.19.2	Datenstrukturen für statistische Tabellenkalkulationen
matplotlib ¹¹⁹	2.0.0	Erstellung von Boxplots und Barcharts

4.6.3.5 Microsoft Excel

Für die Auswertung von BCA-Assays wird ausschließlich Excel verwendet, da die Ausgabe der Messdaten des Tecan Infinite bereits im Format XLSX erfolgt.

Einfache statistische Auswertungen und Darstellungen werden ebenfalls in Excel durchgeführt. Knime bietet ebenfalls die Möglichkeit Listen als XLSX Dateien zu exportieren, um die weitere Bearbeitung in Excel zu ermöglichen. Dies findet Anwendung bei der tabellarischen Darstellung der Identifikationen, FDR und Lokalisation der Proteine.

Ergebnisse

5 Ergebnisse

5.1 Adsorption von Proteinen auf magnetischen Silica-Beads

In der vorausgehenden Arbeit von Dr. Moritz Neupärthl wurde das Potential der Silicapartikel zur Aufreinigung beschrieben und soll hier zunächst ergänzend untersucht und charakterisiert werden.

5.1.1 Mikroskopische Untersuchung der Protein-Silica Adsorption

Zur Untersuchung der Adsorption von bovinem Serumalbumin an die Silicaoberfläche wurden 100 µg Protein mit 400 µg Silicabeads für 15 min bei pH 4 inkubiert, mit 5 µL DTT Stammlösung über 30 min reduziert und mit 5 µl IAA Stammlösung über weitere 30 Minuten alkyliert. Nach Entfernung des Überstands, einem Waschschrift und anschließender Resuspendierung mit jeweils 100 mL MilliQ Wasser, wurde ein Bild der Silicabeads bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Zur Fluoreszenzmessung von Tryptophan wurde anschließend die Lichtemission von 330 nm der Probe unter dem Mikroskop bei einer Anregung von 290 nm Wellenlänge aufgenommen (Abb. 5.1 A). Zum Vergleich wurden die Aufnahmen unter gleichen Einstellungen mit Beads ohne Protein erstellt (Abb. 5.1 B).

Die Fluoreszenz der Sorbate aus Protein und Silicapartikel ist deutlich zu sehen und ist mit der Lichtbildaufnahme kongruent. Der Direktvergleich der umgebenden Medien bei Positiv- und Negativkontrolle bestätigt die Abwesenheit sichtbarer/fluoreszierender Mengen desorbierten Proteins.

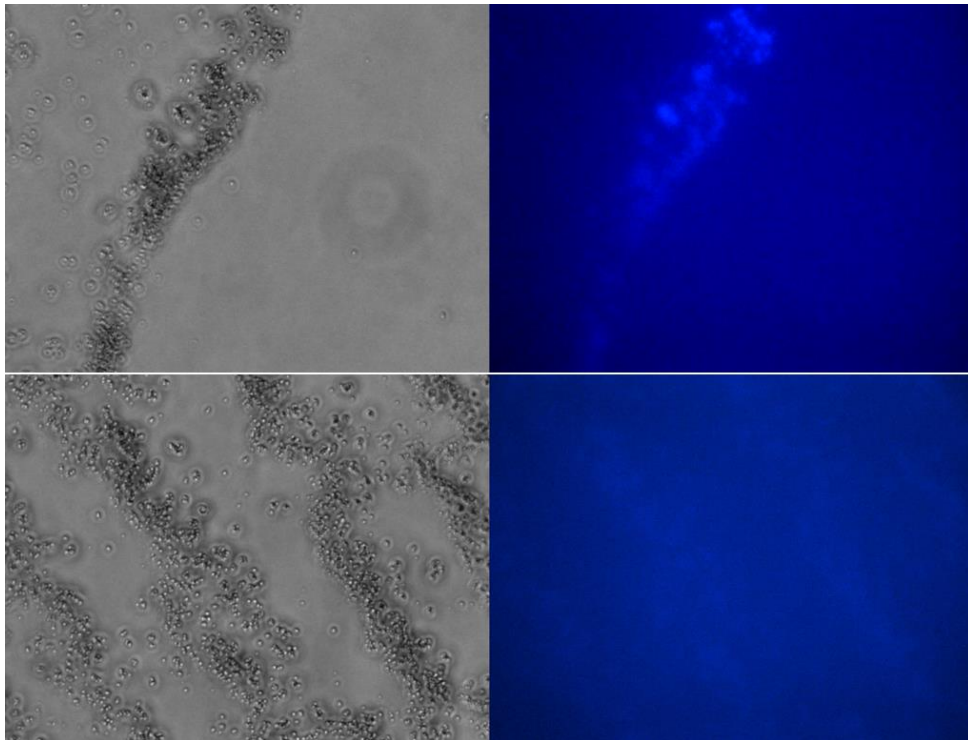


Abb. 5.1: Tryptophan-Fluoreszenzmessung magnetischer Silicapartikel mit (A) und ohne (B) immobilisiertem BSA bei 40-facher Vergrößerung, links normale Belichtung, rechts unter Anregung mit 290 nm und Detektion bei 330 nm.

Zur Verbesserung der Sensitivität wurde zusätzlich eine Messung mit einem Fluoreszenzmarker durchgeführt. Hierzu wurden die Thiole des mit DTT reduzierten, immobilisierten BSAs mit Fluorescein-5-Maleimid markiert (siehe 4.3.3) und anschließend mit TEAB 100 mM gewaschen.

Unter Anregung mit 460 nm Wellenlänge erstellte Fotografien zeigen bei 10-facher Vergrößerung neben der intensiven Fluoreszenz, die deutliche Aggregation der Sorbate aus Protein und Silicapartikeln. Nach Verdau des BSA auf den Beads mittels Trypsin über 4h, Entfernen des Überstands und erneuter mikroskopischer Fotografie bei gleichen Kameraeinstellungen ist die Fluoreszenz weitestgehend verschwunden, was eine nahezu vollständige Desorption der tryptischen Peptide nahelegt.

Eine Aggregation der Silicapartikel zeigt sich bereits während der Lagerung, jedoch ist diese durch Vortexen oder Ultraschall reversibel und tritt bei konstantem Schütteln nicht auf. Hingegen ist die Aggregation nach der Adsorption von Proteinen an ihrer Oberfläche auch während konstantem Schütteln nicht zu vermeiden und lässt sich erst nach enzymatischem Verdau der Proteine auflösen.

Inkubation, Modifikation und Verdau auf den Beads erfolgte bei 1300 rpm auf einem Eppendorf Schüttler um Sedimentation oder gar „caking“ zu vermeiden. Dies soll eine möglichst vollständige Reaktion garantieren, indem ein Abschirmen der adsorbierten Proteine von dem Medium verhindert wird.

Bei Detailaufnahmen kleinerer Aggregate bei 40-facher Vergrößerung ist die Fluoreszenz ebenfalls sehr deutlich sichtbar (Abb. 5.03 A, B). Die geringere Fluoreszenz und ausbleibende Aggregation der vereinzelt Partikel lässt bei diesen auf geringere Mengen adsorbierten Proteins schließen. Dies ist als Konsequenz des Überschusses der eingesetzten Partikel zu betrachten, da Proteinadsorption nicht homogen über eine Gesamtfläche verteilt erfolgt, sondern Protein-Protein-Interaktionen eine maßgebliche Rolle spielen¹⁴.

Zur Kontrolle möglicher falsch-positiver Fluoreszenz wurden sowohl reine Beads (Blanks) als auch mit Fluorescein-5-Maleimid behandelte und gewaschene Beads bei gleicher Belichtungsdauer abgebildet, um im ersten Fall eine Eigenfluoreszenz der Partikel und im zweiten Fall mögliche Nebenprodukte oder Adsorbate aus Silica und Fluorescein-5-Maleimid auszuschließen. (Abb. 5.3 C-G).

Bei den Kontrollen wurde zunächst bei gleicher Belichtungsdauer durch die kaum vorhandene Fluoreszenz ein vollständig schwarzes Bild erhalten. Daraufhin wurde die Aufnahme mit automatischen Einstellungen wiederholt. Diese umfassen höhere ISO-Werte (Lichtempfindlichkeit des Sensors) und stark verlängerte Belichtungszeit, was zu dem hier sichtbaren, hohen Hintergrundrauschen und geringem Kontrast führt. Die Bilder erinnern an Aufnahmen eines Restlichtverstärkers, sind aber nicht mit starker Fluoreszenz (vergleiche Abb. 5.3 B) der dargestellten Objekte zu verwechseln.

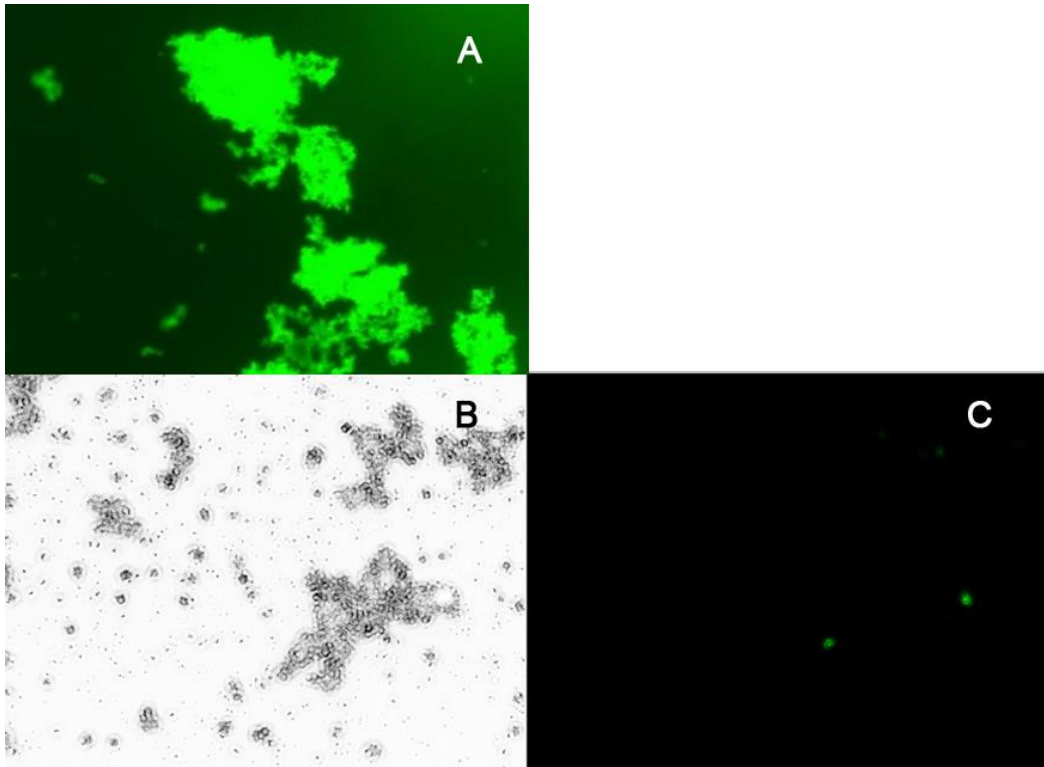


Abb. 5.2: 10-fache Vergrößerung der Aggregate aus BSA und Silicabeads unter Fluoreszenzanregung(A). Nach tryptischem Verdau und Entfernung des Überstands als licht- (B) und fluoreszenz-mikroskopische (C) Aufnahme bei gleichem Bildausschnitt. (Zeiss A-Plan, 10x)

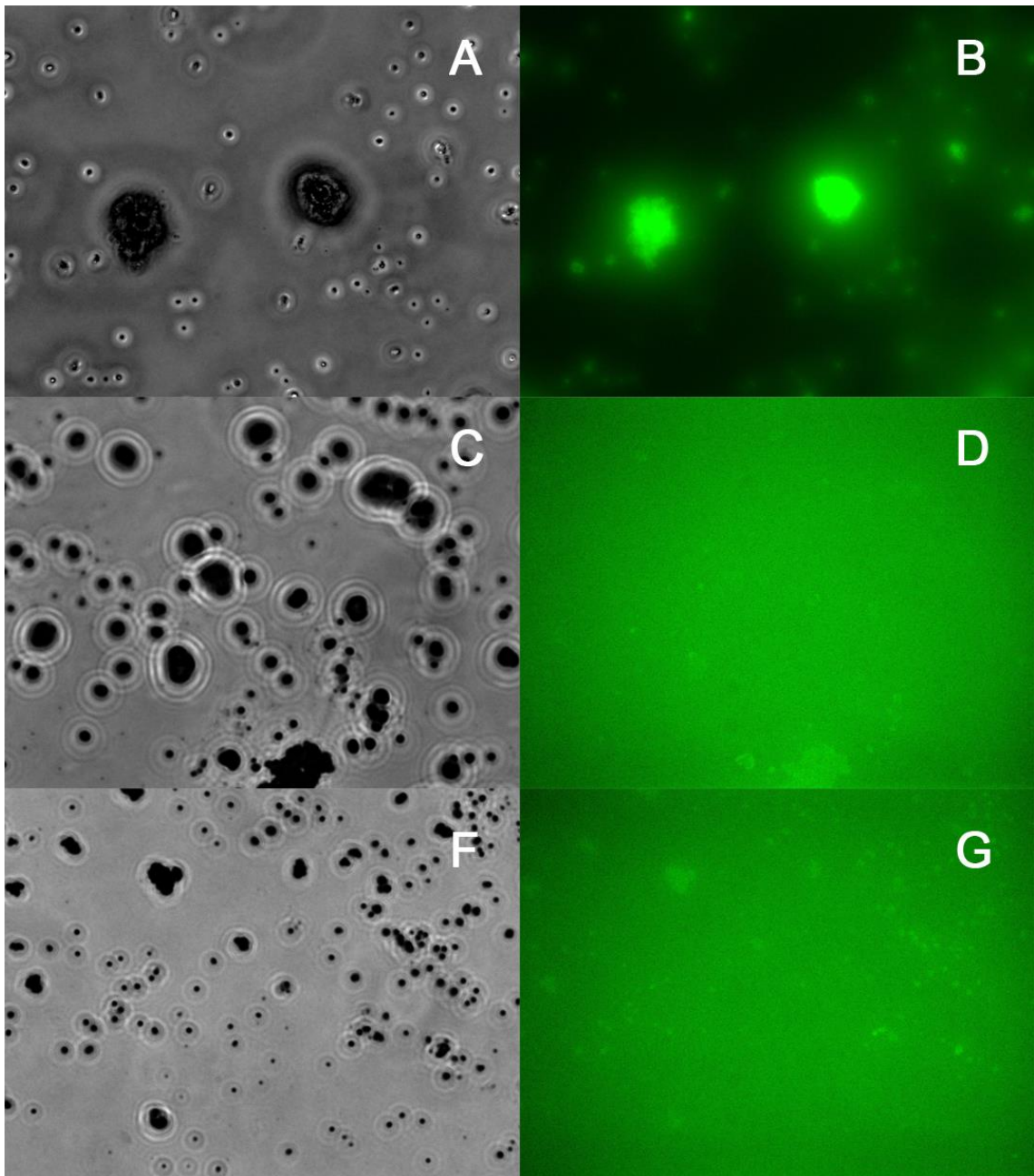


Abb. 5.3: Fluoreszenzmarkiertes BSA auf Silicabeads
Jeweils gleiche Bildausschnitte für licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen:
Silica-Beads mit fluoreszenzmarkiertem BSA (A, B), unbehandelte Beads (C, D) und
mit Fluorescein-5-Maleimid inkubierte, gewaschene Beads (F, G)
(alle Aufnahmen bei 40x Vergrößerung mit Zeiss LD-Plan)

5.1.2 Optimierung der Extraktion auf Silica Beads

5.1.2.1 Einfluss von Reagenzien zur Zell-Lyse

In Untersuchungen von Moritz Neupärtl zeigten magnetische Beads auf Silicabasis mit funktionellen Gruppen zur kovalenten Immobilisierung von Proteinen eine fast uneingeschränkte Funktionalität auch nach Inaktivierung der Bindungsgruppen (Abb. 5.4 A). Das gemeinsam publizierte, hohe Adsorptionspotential der Silicabeads in einem pH Bereich von 3-4 diente als Basis für weitere Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens, welches sich auch unter diversen, potentiell störenden Reagenzien als robust erwies. Unabdingbar für die Methode ist jedoch der Verzicht auf Tenside, welche die Proteinadsorption deutlich reduzieren (Abb. 5.4 B)¹²⁰.

In dieser Arbeit soll der zusätzliche Einfluss von Harnstoff untersucht werden, welcher ein interessantes Reagenz zur tensidfreien Zell-Lyse darstellt:

Die stark chaotrope Wirkung von hochmolaren Harnstoffkonzentrationen begünstigt sowohl die Entfaltung der Proteine, was sich bereits Wisniewski et al. für FASP zunutze gemacht haben⁵, als auch die Löslichkeit der Proteine¹²¹, was jedoch messbar die adsorbierte Proteinmenge in ungewünschtem Maße reduziert (Abb. 5.4 B).

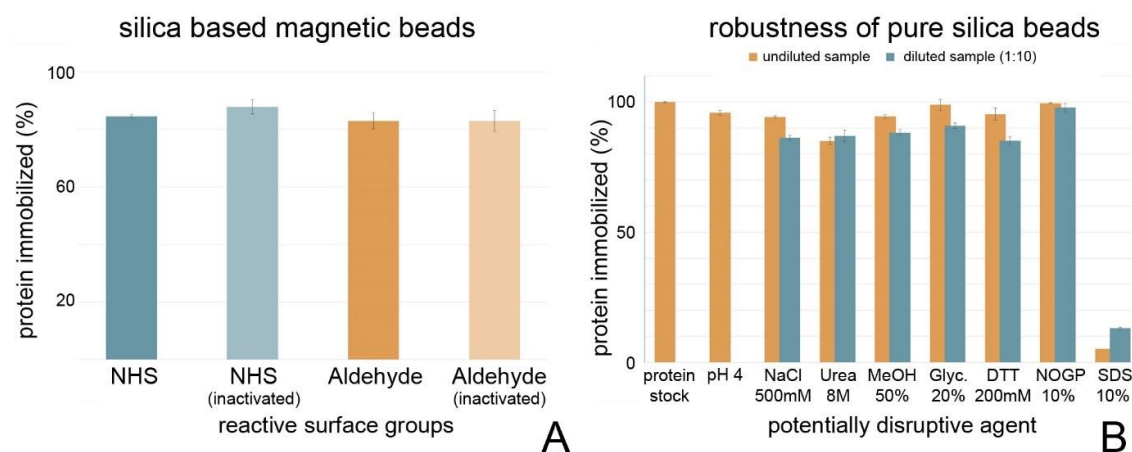


Abb. 5.4: Proteingehalt im Überstand nach Inkubation von *E. coli* Lysat auf Silicabeads bei pH 4 auf aktiven und inaktiven Silicabeads (**A**) und in Gegenwart von potentiell störenden Reagenzien (**B**) kolorimetrisch mit BCA-Assay ermittelt.¹²⁰

Weitere Kandidaten für die tensidfreie Lyse der Zellen sind Guanidinhydrochlorid (GHCl) und der kommerziell erhältliche, tensidfreie Lysispuffer BugBuster, der von Vahid Golghalyani zur Etablierung des ArgC-analogen Verdaus verwendet wurde. Zur Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Adsorption wurde Apo-Serotransferrin als Modellprotein gewählt, da es in Vorversuchen eine mittelmäßige native Immobilisierungsrate von ca. 50% aufwies, sodass sowohl positive als auch negative Einflüsse leicht detektiert werden können. Weiterhin eignet sich das Protein aufgrund seiner lysinreichen Aminosäuresequenz zum ArgC-analogen Verdau, wodurch die Umsetzungsrate mittels Propionsäureanhydrid auf Silicabeads massenspektrometrisch analysiert werden kann.

Zur Ermittlung des Einflusses der Lyse-Reagenzien auf die Adsorption wurde zunächst ein Vergleich von Guanidinhydrochlorid (6M), Urea (8M) BugBuster durchgeführt. Je 10 µL der Stammlösung von Apo-Serotransferrin (AST) (10 mg/mL) wurden mit in folgenden Inkubationsmedien auf Silicabeads immobilisiert:

Tab. 5-1: Versuchsansatz zum Vergleich von Reagenzien zur Zell-Lyse

Puffer pH 4	Lysisreagenz	Silica-Beads (40mg/mL)	AST 10mg/mL
80 µL	-	10 µL	10 µL
40 µL	40 µL Urea (8M)	10 µL	10 µL
40 µL	40 µL GHCl (6M)	10 µL	10 µL
40 µL	40 µL BugBuster	10 µL	10 µL

Die Inkubationszeit wurde mit 10 Minuten sehr kurz gewählt, einerseits mit Rücksicht auf die Zeitabhängigkeit des Adsorptionsprozesses und damit einen möglichen Verlust sichtbarer Unterschiede bei längerer Inkubation, andererseits um im Sinne der Arbeit ein schnelles Probenvorbereitungsprotokoll zu etablieren. Die Wiederfindungsrate wurde dabei relativ zu einer Positivkontrolle (BCA-Lösung direkt mit 10µL Bead-Suspension und 10 µL AST-Stammlösung) berechnet.

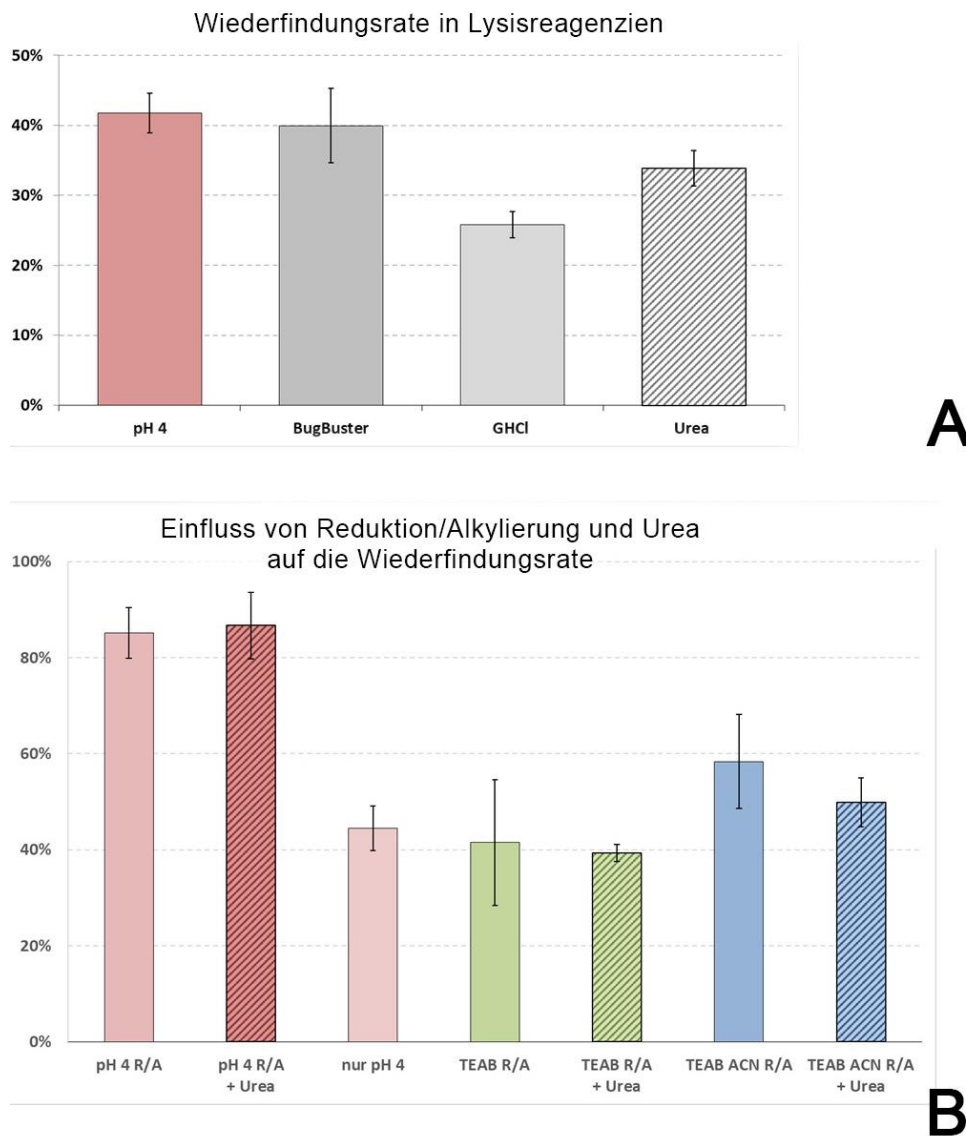


Abb. 5.5: Wiederfindungsrate von apo-Serotransferrin nach Inkubation mit unterschiedlichen Medien (A) und dem Einfluss von Reduktion und Alkylierung auf die Adsorptionsrate (B)

Es wird deutlich, dass die Immobilisierung bei Anwesenheit von GHCl unter 30% verbleibt, weshalb dieses Reagenz für weitere Versuche ausgeschlossen wird. Auch wenn sich der negative Effekt von Harnstoff bestätigt, aber vergleichsweise schwächer ausfällt, wird dieser weiter in Betracht gezogen. Der kommerziell erhältliche BugBuster liefert zwar ähnlich gute Ergebnisse wie die Inkubation bei dem etablierten Phosphatpuffer (pH 4), zeigt durch die höhere Standardabweichung allerdings auch eine leicht geringere Reproduzierbarkeit (Abb. 5.05 A).

5.1.2.2 Bedeutung der Reduktion/Alkylierung für den Adsorptionsprozess

Die generell mäßige Ausbeute von ca. 40% in den vorangegangenen Untersuchungen, repräsentiert nicht die endgültige Extraktionseffizienz der Beads, da die weiteren Präparationsschritte der Reduzierung und Alkylierung nicht miteinbezogen wurden. Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT und die anschließende Carbamidomethylierung mit IAA verdoppelt die Menge des als immobilisiert detektierten Proteins (Abb. 5.05 B) auf ca. 85%. Zur Vermeidung eines möglichen, falsch-positiven Signals durch Reduktion des Kupfer-II-Sulfats durch DTT-Rückstände wurden die Beads bei der Positivkontrolle zuerst mit DTT und IAA analog zu den Proben behandelt, der Überstand entfernt, wiederholt mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit Protein und BCA-Lösung versetzt.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit dem vorangegangenen Experiment und zur Bestätigung der Zuverlässigkeit des BCA-Assays wurde ein Set von Triplikaten nicht reduziert/alkyliert, die Wiederfindungsrate ist auch hier zwischen 40-50%. Inkubationen mit 80 μ L TEAB Puffer, 100 mM, pH 8,5 und einem Gemisch TEAB/ACN (1:1) wurden ergänzend durchgeführt. Dabei wird nicht nur die klare Überlegenheit des Phosphatpuffes bestätigt, sondern auch der positive Effekt von ACN deutlich.

Neben den beschriebenen Ansätzen wurden parallel Triplikate analysiert, bei denen 40 μ L des Inkubationspuffers durch 8M Harnstofflösung ersetzt wurden. Im Gegensatz zur Inkubation bei pH 4 mit anschließender Reduzierung/Alkylierung kann bei den TEAB bzw. TEAB/ACN Proben der negative Effekt von Harnstoff beobachtet werden. Die ursprüngliche Störung durch Harnstoff ist unter diesen Versuchsbedingungen nicht mehr festzustellen und macht diese damit geeignet für die Immobilisierung von proteomischen Proben aus harnstoffhaltigen Zell-Lysaten (Abb. 5.05 B).

5.1.2.3 Einfluss der Konzentration an Harnstoff während der Inkubation

Obwohl die Hemmung der Adsorption durch Harnstoff unter Verwendung von DTT/IAA nicht mehr festzustellen ist, soll der Einfluss von Harnstoff in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht werden. Hierzu wurden 0,1mg apo-Serotransferrin in Inkubationsmedien unterschiedlichen Harnstoffgehalts auf Beads (10 μ L Suspension) immobilisiert. Eine Reduzierung/Alkylierung erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit nicht (Tab. 5-2).

Tab. 5-2: Ansatz zum Einfluss von Harnstoff auf die Adsorption

Puffer pH 4	Harnstofflösung (8M)	Silica-Beads (40mg/mL)	AST 10mg/mL
80 μ L	-	10 μ L	10 μ L
60 μ L	20 μ L	10 μ L	10 μ L
40 μ L	40 μ L	10 μ L	10 μ L
20 μ L	60 μ L	10 μ L	10 μ L
-	80 μ L	10 μ L	10 μ L

Die Wiederfindungsrate von AST bei pH 4 entspricht der in den anderen Experimenten, während eine Verringerung der Adsorptionsrate durch Urea erst bei Anteilen von über 40% deutlich wird (Abb. 5.06).

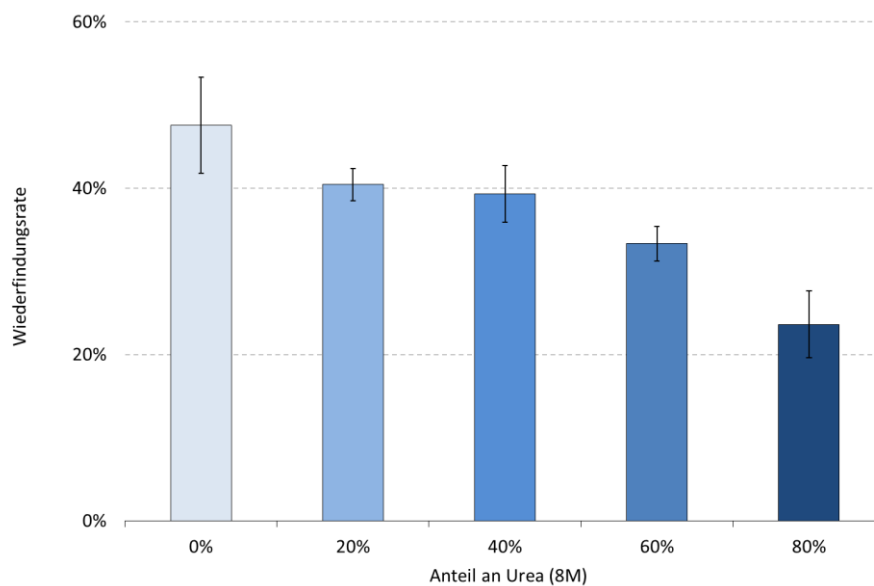


Abb. 5.6: Wiederfindungsrate des adsorbierten AST auf Silicabeads unter Einfluss von Harnstoff in steigenden Konzentrationen

Der Einfluss von 20-40 % Harnstoff bleibt vergleichsweise gering, sodass der Effekt auf die geplanten Inkubationsbedingungen minimal sein sollte, wie sich an einem Rechenbeispiel zeigt:

Theoretische Konzentration Lysat: 3 mg/mL
Eingesetzte Sollmenge Protein: 0,1 mg
Volumen zur Inkubation: 0,1 mL

$$V = \frac{0,1 \text{ mg}}{3 \text{ mg/mL}} = 33,3 \text{ }\mu\text{L}$$

Die erhaltenen 33,3 μL (33,3% bei einer geplanten Ergänzung auf 100 μL) sind ausgehend von einem sehr niedrig konzentrierten Lysat entsprechend hoch, bewegen sich jedoch selbst in den konservativ gewählten Bedingungen in einem Bereich von geringer Adsorptionsminderung durch Urea (Abb. 5.6).

Die Proteinkonzentrationen in Zell-Lysaten aus HEK 293T Zellen (siehe 4.2.3) befinden sich, empirisch ermittelt, bei 5-6 mg/mL (siehe 4.3.1), so dass der damit einhergehende Anteil Harnstoff keinen negativen Einfluss haben sollte. Der gewichtigere Effekt der stets durchgeführten Reduzierung/Alkylierung wurde in 5.1.2.2 gezeigt.

5.1.2.4 Zeitabhängigkeit des Adsorptionsprozesses

Bei der beschriebenen Zeitabhängigkeit des Adsorptionsvorgangs ist eine Gleichgewichtseinstellung zu erwarten, deren Zeitpunkt es annähernd zu ermitteln gilt. Apo-Serotransferrin wurde dazu unter nicht-reduktiven Versuchsbedingungen unterschiedlich lange zur Adsorbatbildung mit Silicabeads geschüttelt und die Menge adsorbierten Proteins wie in vorangegangenen Versuchen berechnet (Abb. 5.7). Bei 60 Minuten liegt die Adsorption bei knapp 60% und steigt in Abhängigkeit der Zeit nur noch minimal. In Anbetracht der stark erhöhten Immobilisierung durch Reduktion/Alkylierung auf ca. 85%, ist eine Inkubationsdauer > 60 min daher nicht förderlich, entspricht in günstiger Weise aber der Zeit, die zur vollständigen Reduzierung und Alkylierung der Probe benötigt wird. Eine separate Inkubationszeit ist damit redundant, so dass nach der Zusammenführung von Beads, Protein und Inkubationspuffer direkt DTT zur Reduzierung hinzugefügt werden kann.

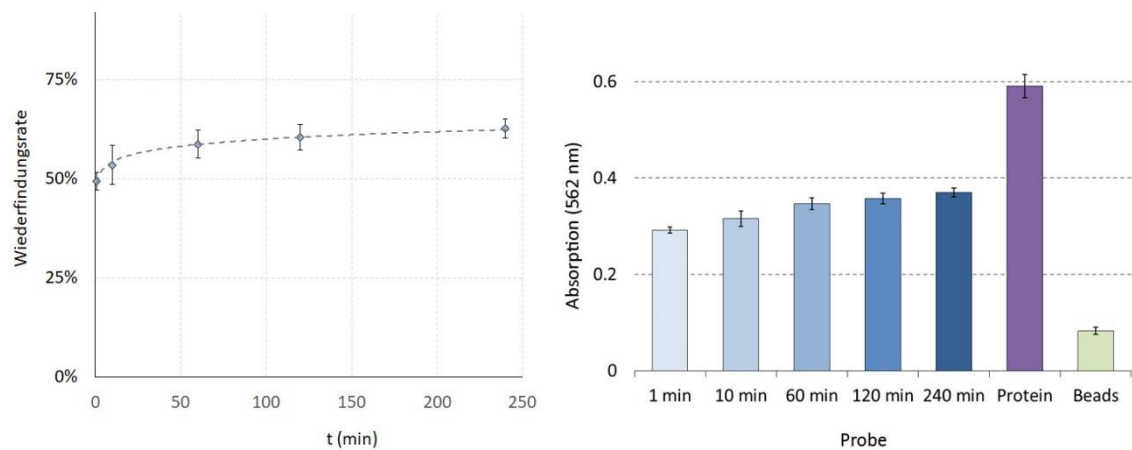


Abb. 5.7: Zeitabhängigkeit der Adsorption von AST auf der Silicaoberfläche relativ zur eingesetzten Gesamtmenge Protein (links) und totale Adsorption der kolorimetrischen Messung (rechts).

5.1.3 Diskussion

Die Untersuchung des Adsorptionsvorgangs mit anschließendem Waschen des Sorbats und dem nachfolgendem Verdau und der damit einhergehenden Desorption der resultierenden Peptide am Mikroskop erlaubt mehrere Schlussfolgerungen:

Die Adsorption von BSA ist weitestgehend vollständig, wie an der Absenz von Fluoreszenz im umgebenden Medium zu erkennen ist. Gleiches gilt für den Desorptionsprozess der tryptischen Peptide, der nach Entfernung des Überstands erneut zu nicht-fluoreszierenden Silicapartikel führt. Allgemein ist für kleinere Moleküle, hier Peptide sowie Fluoreszenzmarker, keine permanente Adsorption zu beobachten. Dies ist von enormem Vorteil, da es die Analyse der Proteinadsorption mittels Redox-basiertem BCA-Assay erlaubt, eine Methode, deren Verwendung nur nach Entfernung reduktiver Chemikalien wie DTT möglich ist. Weiterhin ist damit die Entfernung diverser Verunreinigungen mit Molekülen von geringem Molekulargewicht möglich.

Anhand des Modellproteins apo-Serotransferrin konnte das Adsorptionsverhalten auf Silicabeads unter nativen und verschiedenen Einflüssen beobachtet und beschrieben werden, wobei insbesondere mit Hinblick auf den Prozess der Zell-Lyse und der nachfolgenden Reduzierung und Alkylierung gearbeitet wurde.

Stellvertretend für ein Protein mit mittelstarker Tendenz zur Adsorption konnte eine Zeitabhängigkeit festgestellt werden, deren Maximum einerseits durch die Anwesenheit von Harnstoff gesenkt andererseits durch aktives Denaturieren des Proteins jedoch signifikant erhöht wird. Letzterer Effekt ist dabei nicht nur synergistisch mit der Verbesserung proteomischer Analysen durch Reduzierung/Alkylierung, er ist zusätzlich in der Lage, den negativen Impact der chaotropen Wirkung des Harnstoffs aufzuheben und diesen somit als potentiell Mittel zur Lyse zulässig zu machen. Da die Adsorption zudem in Konzentrationsabhängigkeit zum Harnstoff steht, erlaubt eine Verdünnung des Lysats während des Extraktionsprozesses eine potentielle Verbesserung des Ergebnisses.

5.2 Tryptischer Verdau auf Silicabeads

5.2.1 SDS-PAGE Analyse der Probenvorbereitung

Zur Analyse der Extraktion von Proteinen aus frischen Zell-Lysaten wurde die Lyse, wie in 4.2.3 beschrieben, durchgeführt. Der ungefähre Proteingehalt des Lysats wurde mittels BCA-Assay und einer BSA-Verdünnungsreihe ermittelt.

Lysat, äquivalent zu 100 µg Protein, 10 µL Beadsuspension und 80 µL Phosphatpuffer wurden vereint und Disulfidbrücken bei 57°C mit DTT-Stammlösung reduziert. Alkylierung der Thiole erfolgte bei RT im Dunkeln mittels IAA. Nach der Inkubationszeit von 1h insgesamt wurden die Beads mithilfe eines magnetischen Racks an der Gefäßwand gesammelt und der Überstand zur Analyse entnommen. Die Beads wurden mit Phosphatpuffer gewaschen und nach dessen Entfernung dessen mit 90 µL TEAB 100 mM und 10 µL Trypsinlösung (0,1 mg/mL) versetzt. Nach 18h Verdau bei 37°C wurde der Überstand gesammelt. Parallel wurde ein Verdau in Lösung bei gleichen Bedingungen zur späteren Kontrolle durchgeführt. Die gesammelten Proben wurden über eine Vakuumzentrifuge im Volumen reduziert und anschließend auf 50 µL mit TEAB 100 mM aufgefüllt. Die folgenden Proben (je äquivalent zu 20 µg Protein) wurden auf ein Polyacrylamidgel (12%) gebracht (Tab. 5.03) und anschließend entwickelt (siehe 4.4.2). Detektion erfolgte mit Coomassie Brilliantblau (4.4.3.1).

Tab. 5-3: Legende zur Analyse mit SDS-PAGE

Probe:	Marker	Lysat	Überstand nach Red./Alk.			Überstand nach Verdau			Verdau in Lösung
Symbol:	M	L	S1	S2	S3	D1	D2	D3	IS
µL:	5	8	20	20	20	20	20	20	20

Nach Färbung mit Coomassie-Blau zeigen sich, wie in Abb. 5.8 deutlich wird, keine deutlichen Banden in den Überständen nach Reduzierung/Alkylierung (S1-S3). Entsprechend der zuvor errechneten Wiederfindungsrate (siehe 5.1.2) wären hier jedoch Banden zu erwarten. Nach tryptischem Verdau (D1-D3) sind erwartungsgemäß keine Proteinbanden zu sehen: An ihrer Stelle werden hier die tryptischen Peptide im Bereich von von 20-2 kDa als blaue Schlieren sichtbar, welche die erfolgreiche Proteolyse bestätigen. Ebenso verhält es sich in der Positivkontrolle (IS), welche das Ergebnis nach dem Standardverfahren in der Proteomik zum Vergleich darstellt. Neben den identischen Schlieren der erzeugten Peptide ist hier zusätzlich bei ca. 23 kDa die Bande des Trypsins zu sehen, deren Absenz bei dem Verdau auf den Beads impliziert, dass die Protease ebenfalls adsorbiert und nicht eluiert wird, bzw. auf den Beads verbleibt.

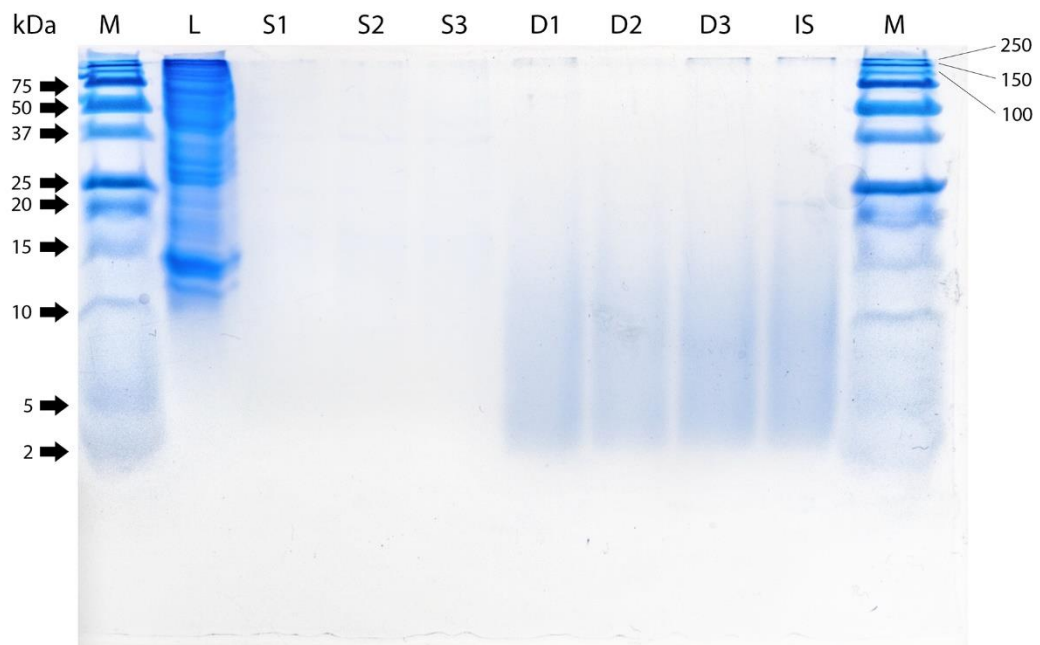


Abb. 5.8: Mit Coomassie Blau eingefärbtes Polyacrylamid-Gel mit den Fraktionen Lysat (L), Überstand nach Inkubation auf Beads (S1-3), Überstand nach Verdau (D1-3), In-Lösungsverdau zur Kontrolle (IS)

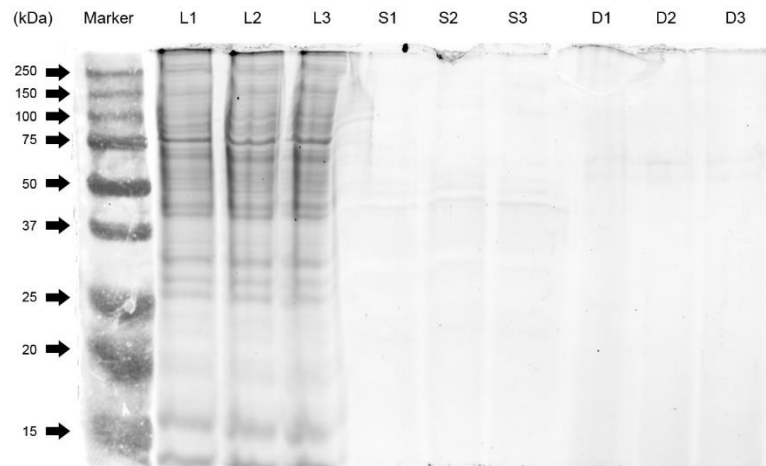


Abb. 5.9: SYPRO Ruby gefärbtes PAA Gel
mit den Fraktionen Lysat (L1-3), Überstand nach Inkubation auf Beads (S1-3),
Überstand nach Verdau (D1-3)

Ein weiteres Gel (10 %) wurde, zur besseren Separation der Proteinbanden, einer längeren Elektrophorese unterzogen. Die Schlieren der Peptide nach Verdau in D1-D3 sind daher nicht vollständig zu sehen. Die Detektion erfolgte anstelle von Coomassie Brilliantblau mit SYPRO Ruby, dessen Fluoreszenz unter UV-Licht mithilfe eines ChemiDoc XRS+ fotografiert wurde (Abb. 5.9). Das weitaus sensitivere SYPRO Ruby erlaubt die Detektion von geringen Mengen nicht adsorbierten Proteins. Schwache Banden sind im Überstand nach Reduktion und Alkylierung (S1-S3) sichtbar - im Vergleich zu der eingesetzten Menge Protein zeigt sich diese jedoch als minimal. Dies entspricht den Ergebnissen der zuvor durchgeführten BCA-Assays zur Bestimmung der Wiederfindungsrate (siehe Kapitel 5.1.2). Auch mit der sensitiveren Methode ist kein Trypsin in den Fraktionen nach Verdau zu sehen. Durch den Einsatz dimethylierten Trypsins, sollte ein Eigenverdau ausgeschlossen sein und die Vermutung des Verbleibens der Protease auf den Beads ist als wahrscheinlich zu betrachten. Diese Erkenntnis könnte die Probenvorbereitung weiter vereinfachen, da das Abstoppen des tryptischen Verdaus durch Zugabe von TFA durch die Separation von Protease und Peptidgemisch bei Abnahme des Überstands ersetzt werden könnte.

5.2.2 Finales Protokoll und Diskussion

Mit den Experimenten des Kapitel 5.1 konnten Abhängigkeiten der Proteinadsorption auf Silicabeads erfolgreich ermittelt und optimiert werden, sodass die in Kapitel 5.2 erfolgreich getestete Methode im Verlauf dieser Arbeit mit anderen etablierten Protokollen der proteomischen Probenvorbereitung verglichen werden kann. Harnstofflösung (8 M) eignet sich demnach am besten zur Zell-Lyse mit direkt anschließender Immobilisierung auf Silicabeads. Der detaillierte Workflow ist zur Visualisierung in Abb. 5.10 ausführlich dargestellt und in Kapitel 4.2.7 beschrieben.

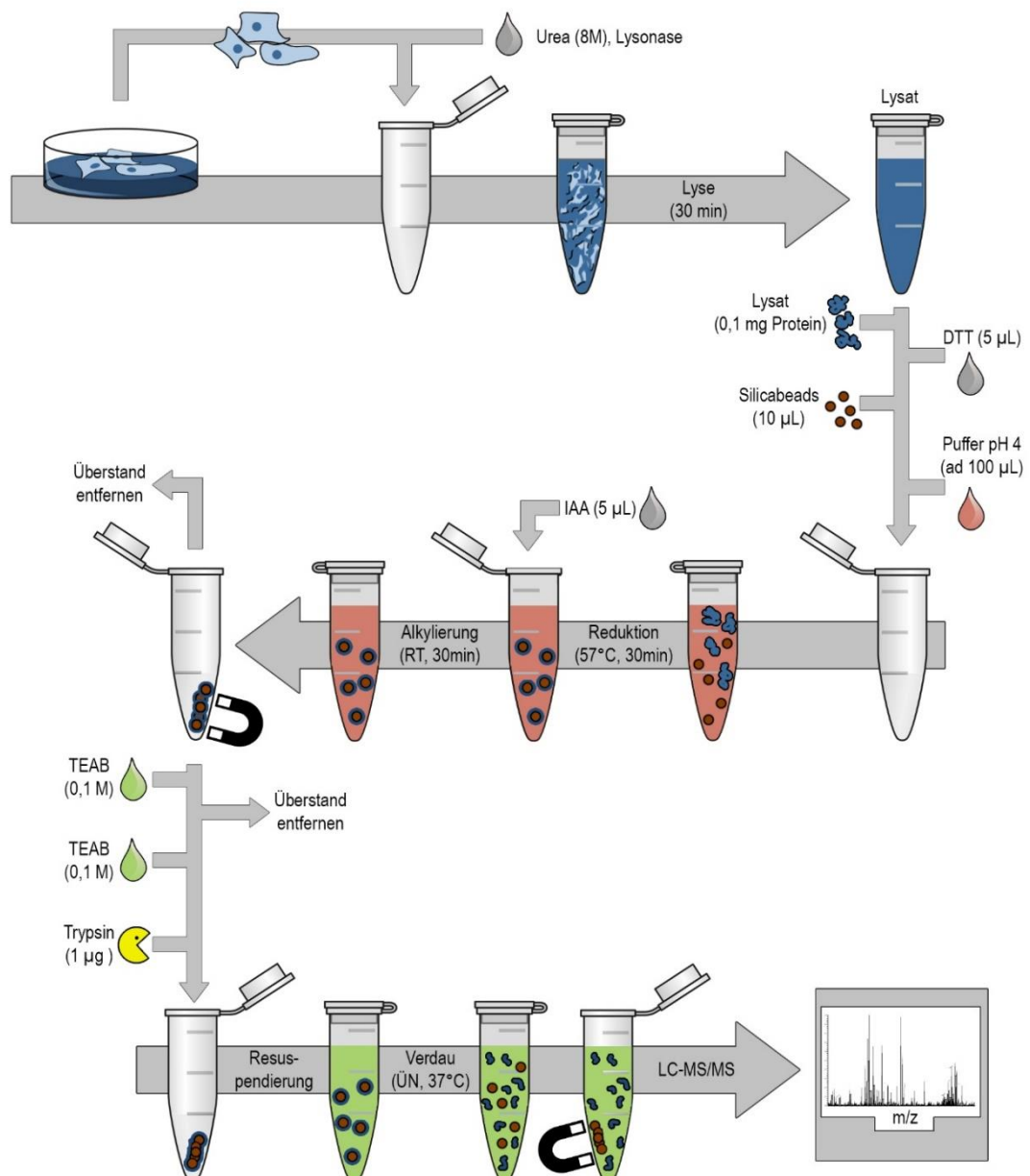


Abb. 5.10: Workflow der kompletten Probenvorbereitung mit Silicabeads

5.3 ArgC-analoger Verdau auf Silicabeads

Die bisher untersuchten Auswirkungen denaturierender Reagenzien auf die Adsorption erlauben die Hypothese, dass Denaturierung im Allgemeinen die Adsorptionsbereitschaft von Proteinen an die gegebene Oberfläche begünstigt. Die Umsetzung von Lysin zu Säureamiden mittels Propionsäureanhydrid, keinerlei negative Auswirkungen auf die Immobilisierung zeigen, was es dennoch sicherzustellen gilt.

5.3.1 Probenvorbereitung für ArgC-analogen Verdau auf Silicabeads

Zur Sicherstellung, dass die Ausbeute an immobilisiertem Protein nicht negativ von der Propionylierungsreaktion beeinflusst wird, wurden Triplikate von Proben Apo-Serotransferrins wie folgt behandelt:

100 µg AST wurden auf 10 µL Beadsuspension mit 5 µL DTT-Stammlösung über 30 Minuten reduziert und im Anschluss mit 5 µL IAA-Stammlösung alkyliert, der Überstand entfernt und die Beads mit Phosphatpuffer gewaschen. Davon wurde ein Set an Triplikaten verwahrt und als reduziert und alkyliert markiert (R, A). Ein weiteres Set wurde von seinem Überstand befreit, mit Phosphatpuffer (pH 4) gewaschen und nach Golghalyani et al. mit 120 µL TEAB (1M), 480 µl Methanol und 6 µL PA versetzt und für 2h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Reaktion mithilfe von Hydroxylaminlösung (10%) abgestoppt. Erneutes Waschen mit Phosphatpuffer beendet die Reaktion. Als Referenz wurden zwei Sets von Triplikaten ohne Protein einmal nach Standardprotokoll (tryptisch) und einmal entsprechend ArgC-analoger Probenvorbereitung behandelt und die 100 µg Apo-Serotransferrin am Ende hinzugegeben um eine vollständige Adsorption zu simulieren.

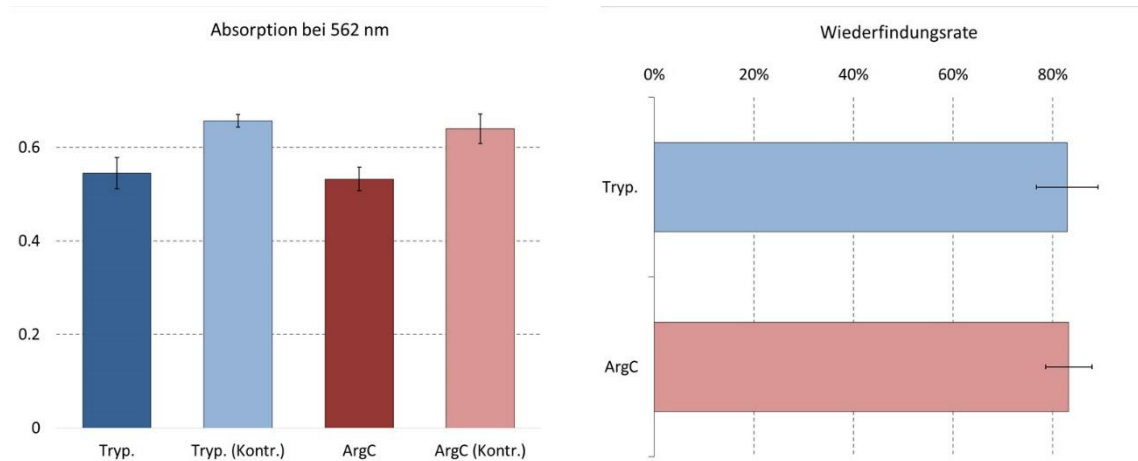


Abb. 5.11: Wiederfindungsrate nach Propionylierung

Gemessene UV-Absorption im BCA-Assay (links) und die, aus dem Quotienten der Methode und ihrer Kontrolle berechneten, Wiederfindungsrate (rechts)

5.3.2 Immobilisierungsrate im Vergleich zu Trypsin

Anhand von Abb. 5.11 wird deutlich, dass das verwendete TEAB/Methanol-Gemisch in Kombination mit PA nicht in der Lage ist, adsorbiertes Protein von der Oberfläche der Beads zu entfernen. Dies könnte die bisher verwendete, kovalente Immobilisierung mittels NHS-Ester überflüssig machen und damit in der Probenvorbereitung nicht nur einen Reaktionsschritt, sondern auch die - unter kovalenten Bedingungen verlorenen - Peptide für die Analyse nach enzymatischem Verdau erhalten. Gleichzeitig wird hier erneut die Robustheit der Methode, die bereits von Moritz Neupärtl ausführlich untersucht wurde, bestätigt (vergleiche Abb. 5.1). Die Anwendbarkeit auf komplexe proteomische Proben wird in den folgenden Abschnitten untersucht.

5.4 ArgC-analoger Verdau nach Extraktion aus Zell-Lysaten

In den vorangegangenen Kapiteln 5 und 5.2 wurde Harnstoff als geeignetes Reagenz zur Zell-Lyse etabliert und in Kapitel 5.3 die Propionylierung der Lysine von auf Silicabeads immobilisiertem Protein erfolgreich getestet. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob die direkte Extraktion des Proteoms direkt aus dem Zell-Lysat möglich und gegebenenfalls dem aktuellen Verfahren überlegen ist.

Die bisher verwendete Methode, BugBuster zur Lyse frischer Zellen zu verwenden und die Proteine des Lysats mit kaltem Aceton zu präzipitieren, bevor diese mit ArgC-analogem Verdau analysiert werden können, soll hier mit Harnstoff als Reagenz zur Lyse und anschließender, direkter Immobilisierung verglichen werden. Zuvor wurde dieser zwar als schwacher Inhibitor der Adsorption an Silicabeads identifiziert, dieser Effekt scheint jedoch durch die Reduzierung und Alkylierung in der Routine der proteomischen Probenvorbereitung aufgehoben zu werden. Im Zuge des Vergleichs werden die verwendeten Protokolle zur Vereinfachung anhand der Probengewinnung abgekürzt: BBA für die Verwendung von BugBuster mit anschließender Acetonfällung und Resuspendierung des Präzipitats; UL für die Lyse mit 8M Urea. Pro mL Lysat werden 3 μ L Lysonase als Endonucleasengemisch zugesetzt. Da die intakten DNA- und RNA-Stränge ohne Zugabe von Endonucleasen ein hochviskoses Lysat bilden, ist dieser Schritt essenziell für die Proteinextraktion aus dem Totalzelllysat. Untersucht werden hierbei prokaryotische (*Escherichia Coli*), sowie eukaryotische Zellen (*homo sapiens*, HEK 293T) nach der Zell-Lyse.

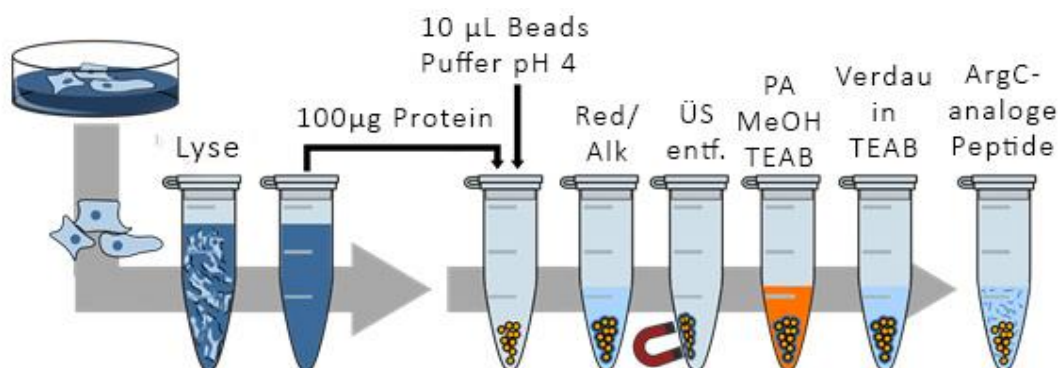


Abb. 5.12: Vereinfachte Übersicht zum ArgC-analogen Verdau auf Silicabeads¹²⁰

5.4.1 Vergleich der Probenvorbereitungen von *E. coli* zur LC-MS/MS Analyse

Die im Lysat enthaltene Menge Protein wurde mittels BCA Assay bestimmt. Wie zuvor etabliert, wurden Volumina äquivalent zu 100 µg Protein auf 10 µL Silicabead-Suspension immobilisiert, reduziert und alkyliert. Propionylierung der Lysine und proteolytischer Verdau erfolgten wie in Abb. 5.12 dargestellt und Kapitel 4.2.7 beschrieben. LC-MS/MS Analyse wurde entsprechend 4.5.2.1 durchgeführt.

5.4.1.1 LC-MS/MS Analyse der *E. coli* Lysate

Ausgewertet wurden die MS/MS Daten hinsichtlich Identifikationen, FDR, physikochemischer Eigenschaften der identifizierten Proteine, um ein möglicherweise entstehendes Bias oder einen Trend, bedingt durch die Art der Lyse, zu untersuchen. Mit einer Differenz von exakt einem Protein berechnet aus der Anzahl aller Identifikationen beider Methoden (Tabelle 5.04) ist auf den ersten Blick kein Unterschied festzustellen. Dargestellt als Venn-Diagramm zeigt sich jedoch nur eine Überlappung der Identifikationen von 56,2% (Abb. 5.13 A). Die Ionscores, welche als statistisches Merkmal das Vertrauen in die Peptidzuweisungen in der Datenbanksuche darstellen, zeigen eine beinahe identische Verteilung (Abb. 5.13 B), wobei eine minimale Verschiebung der Werte von UL zugunsten höherer Werte zu sehen ist. (Es wurden ausschließlich Peptide mit einem Score > 13 zu Identifikation verwendet, wie empirisch von Matrix Science ermittelt und empfohlen). Auch anhand der GRAVY-Scores und isoelektrischen Punkte der Proteine lassen sich die unterschiedlichen Identifikationsergebnisse nicht unmittelbar erklären.

Zur genaueren Analyse wurden, die in UniProt hinterlegten Informationen der Proteine nach ihrer Lokalisation in der prokaryotischen Zelle sortiert (Tab. 5-4).

UL liefert hierbei 61 mehr Membran-assoziierte Proteine als BBA. Dies würde jedoch nur knapp 17% der UL-exklusiven Proteine erklären, zumal die Anzahl der Proteine, zu denen keine Information zur Lokalisation gefunden wurde, zu hoch ist, um hier eine Hypothese aufstellen zu können (Tab. 5-5)

Tab. 5-4: Identifizierte Peptide und Proteine inkl. False Discovery Rates (FDR)

Protokoll	ID (Peptide)	FDR	ID (Proteine)
BBA	5496	0.35%	1300
UL	5753	0.21%	1299

Diese Analyse ist mit einem komplexeren Proteom aus humanen Zellen mit besserer Datenlage zu wiederholen, da eukaryotische Zellen mit ihrem elaborierteren Aufbau differenziertere Zuweisungen zu Substrukturen der Zelle erlauben. Zusätzlich sind die, in SwissProt hinterlegten, Informationen zu humanen Proteinen umfangreicher, so dass der Anteil unbekannter Lokalisation im Verhältnis geringer ausfallen sollte.

Tab. 5-5 Identifizierte Proteine nach ihrer Herkunft in der Zelle

Lokalisation	ID Proteine	
	BBA	UL
Cytoplasma	340	344
Membran	216	277
unbekannt	744	678

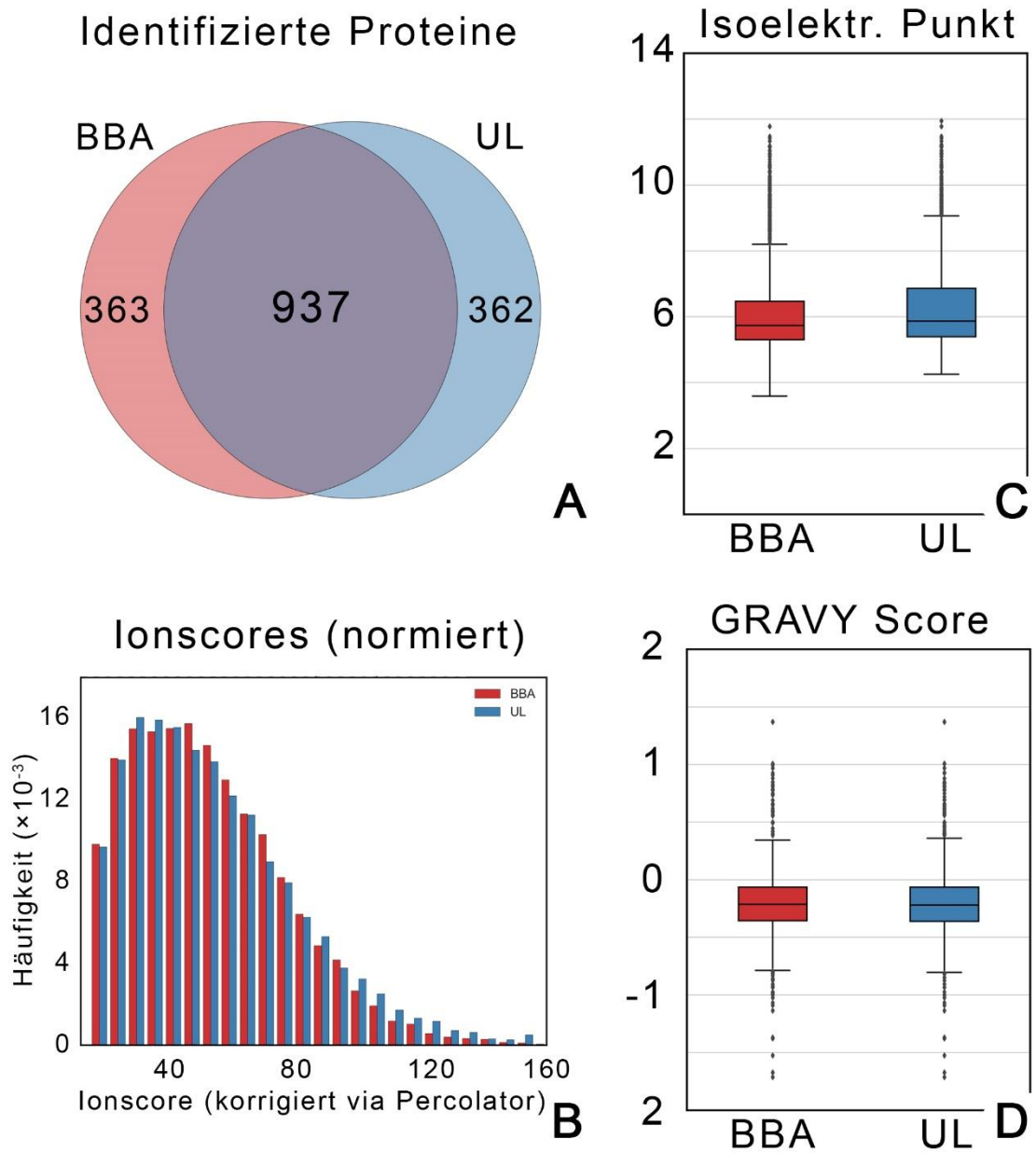


Abb. 5.13: Auswertung des BBA- und UL-Protokolls für *E. coli* Lysat
 Venn-Diagramm mittels BBA und UL identifizierter Proteine (A), Verteilungen der
 Percolator-korrigierten Ionscores normiert auf die Anzahl der Identifikationen (B),
 Boxplot-Verteilungen der Werte für IP (C) und GRAVY (D)

Abgesehen von der eher niedrigen Schnittmenge der Identifikationen lässt sich eine Gleichwertigkeit beider Methoden für die Anwendung bei *E. coli* feststellen, insofern, dass sich die Anzahl der Identifikationen nicht unterscheidet und kein Bias seitens physikochemischer Eigenschaften eingeführt wird. Die wahrscheinlichste Erklärung für die Unterschiede bei den Identifikationsergebnissen ist die begrenzte Reproduzierbarkeit bei der Untersuchung komplexer Proteingemische. In einer ausführlichen Analyse der Reproduzierbar- und Wiederholbarkeit proteomischer Analysen mittels LC-MS/MS konnte von Tabb et al. gezeigt werden, dass Ergebnisse dieser sich – in Abhängigkeit der verwendeten Geräte – bezüglich ihrer Proteinidentifikationen nur zu 60-80 % reproduzieren lassen¹²².

$$R \% = \frac{[\text{Schnittmenge AB}]}{([\text{Schnittmenge AB}] + [\text{Differenzmenge A}])} * 100$$

Da sich die Differenzmengen in ihrer Größe bei dem Experiment dieser Arbeit praktisch nicht unterscheiden, ist diese Reproduzierbarkeit (R) leicht zu errechnen:

$$\frac{937}{(937 + 363)} * 100 = 72,08 \%$$

Damit sind die Differenzmengen beider Methoden wahrscheinlich in der begrenzten Reproduzierbarkeit der LC-MS/MS-Analyse begründet und befinden sich in dem dafür zu erwartenden Bereich.

5.4.1.2 LC-MS/MS Analyse der HEK 293T Lysate

Die Präparation der Lysate humaner Zellen liefert mit dem Wechsel vom prokaryotischen zum eukaryotischen Organismus eine komplexere Probe und soll damit mögliche Unterschiede beider Protokolle sichtbar machen. Die insgesamt höhere Anzahl identifizierter Proteine (Tab. 5-6) entspricht damit der Erwartung. Eine erste signifikante Differenz ist die höhere Zahl von Identifikationen bei der Verwendung von Harnstoff im Vergleich zu BugBuster. Die zusätzlich ermittelten 329 Proteine entsprechen dabei einer signifikanten Verbesserung von 15,2 %. Im Vergleich zum Experiment mit *E. coli* Lysat konnte ergänzend eine niedrigere FDR berechnet werden, die sehr deutlich unter dem geforderten Maximum von 1% liegt.

Interessant ist zusätzlich das Verhältnis identifizierter Peptide zu Proteinen, welches sich aus dem Quotienten (Peptide/Proteine) leicht errechnen lässt. Bei der Verwendung von BBA kommen dabei 4,25 Peptide auf ein Protein, während es bei UL 3,82 sind. Damit lassen sich mit durchschnittlich weniger Peptiden mehr Proteine identifizieren. Dies ist jedoch nur von Relevanz, wenn die Sicherheit der *Peptide-to-Spectra Matches* (PSM) gleich hoch oder höher ist.

Tab. 5-6 Identifikationen von Peptiden und Proteinen
inklusive False Discovery Rate unter Anwendung von BBA bzw. UL

Protokoll	ID Peptide	FDR	ID Proteine
BBA	9159	0.10%	2155
UL	9492	0.16%	2484

Der Vergleich mittels Venn-Diagramm (Abb. 5.14 A) zeigt die Summe aller Identifikationen (2901 Proteine). 85,6 % davon stammen aus dem Harnstoff-basierten Protokoll UL, 74,3% aus BBA, mit einer Schnittmenge beider Protokolle von 59,9%. Die Differenzmengen werden in im Verlauf des Kapitels genauer untersucht.

Die Qualität der Identifikationen kann mittels des Percolator-korrigierten Ionscore ermittelt werden (Abb. 5.14 B):

Im Histogramm sind die Ionscores in ihrer relativen Häufigkeit im Bezug zur Anzahl identifizierter Proteine dargestellt. Die relative Darstellung gleicht somit die unterschiedlichen Ausgangsmengen an Identifikationen aus. Diese Darstellung wurde bereits in 5.4.1.1 trotz gleicher Ausgangsmengen und damit ohne sichtbaren Einfluss verwendet, um eine Kontinuität mit späteren Ergebnissen zu erzeugen. Hier zeigt sich eine leichte, aber signifikante Verschiebung der normierten Verteilung zu höheren Werten bei Anwendung von UL, die bei nicht-normierter Darstellung auffälliger, jedoch statistisch weniger aussagekräftig wäre.

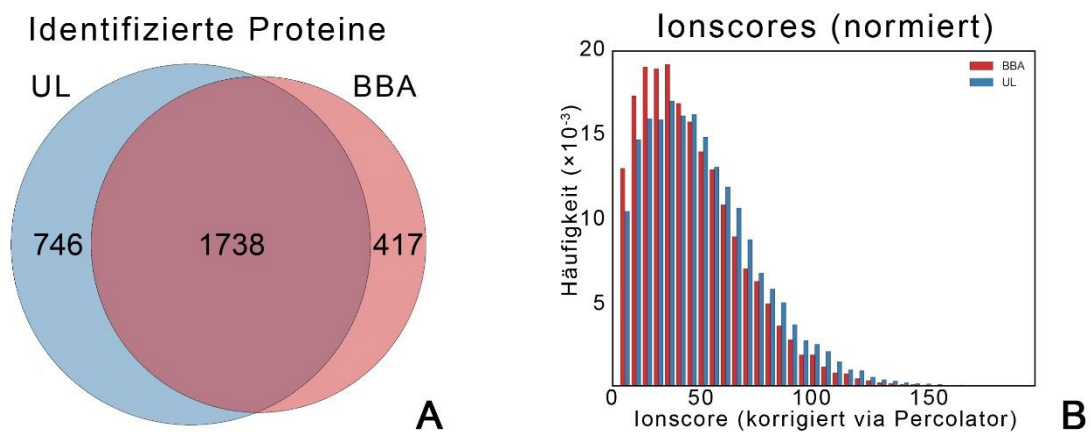


Abb. 5.14: IDs und Ionscores von BBA und UL für humanes Proteom
Venn Diagramm identifizierter Proteine (A) und relative Häufigkeit der Ionscores als
Histogramm (B).

Die Verbesserung der Reproduzierbarkeit bezüglich zugewiesener MS/MS-Signale, dargestellt als Standardabweichung der PSM (auch „Hits oberhalb ID-Grenze“) stellt eine weitere Verbesserung gegenüber BBA dar. (Abb. 5.15).

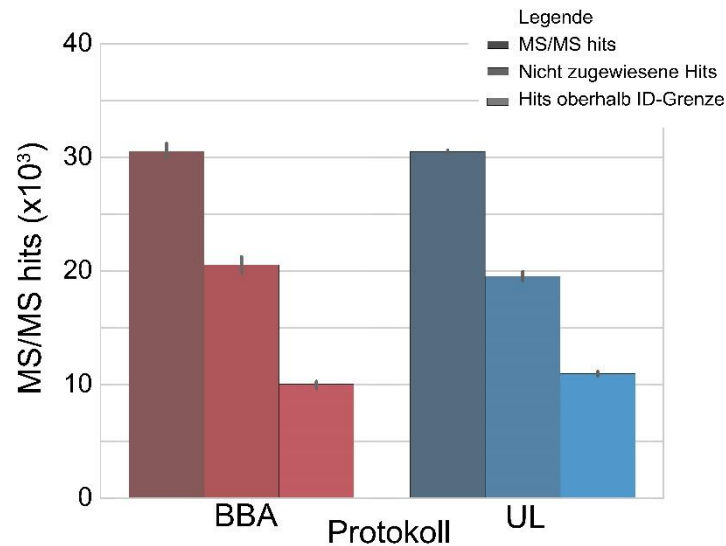


Abb. 5.15: Ausgewertete MS/MS-Signale (Hits) gesamt, nicht-zugewiesen und zugewiesen (v.l.n.r.)

Der Vergleich der Verteilungen im Hinblick auf Lipophilie und der Isoelektrischen Punkte (IP) der identifizierten Proteine offenbart nur minimale Unterschiede, nach denen Proteine des Lysats UL sich mehr im hydrophoben Bereich des GRAVY-Score-Verteilung bewegen (Abb. 5.16 A), während sich bei den IP keine Differenzen zeigen (Abb. 5.16 B). Dargestellt sind diese Verteilungen anhand von fünf Punkten plus Ausreißer als Boxplot:

50 % der Datenpunkte befinden sich innerhalb der „Box“, die durch den Median unterteilt wird. Daraus entstehen ein oberes und unteres Quartil. Die Antennen stellen hier keine Standardabweichung dar, sondern maximal das 1,5-fache der Box. Kürzere Antennen entstehen, wenn der kleinste bzw. größte Wert das 1,5-fache nicht überschreitet. Werte außerhalb dieser Länge - und damit nicht durch diese fünf Messpunkte beschrieben - sind als einzelne Punkte gekennzeichnet und als Ausreißer zu betrachten.

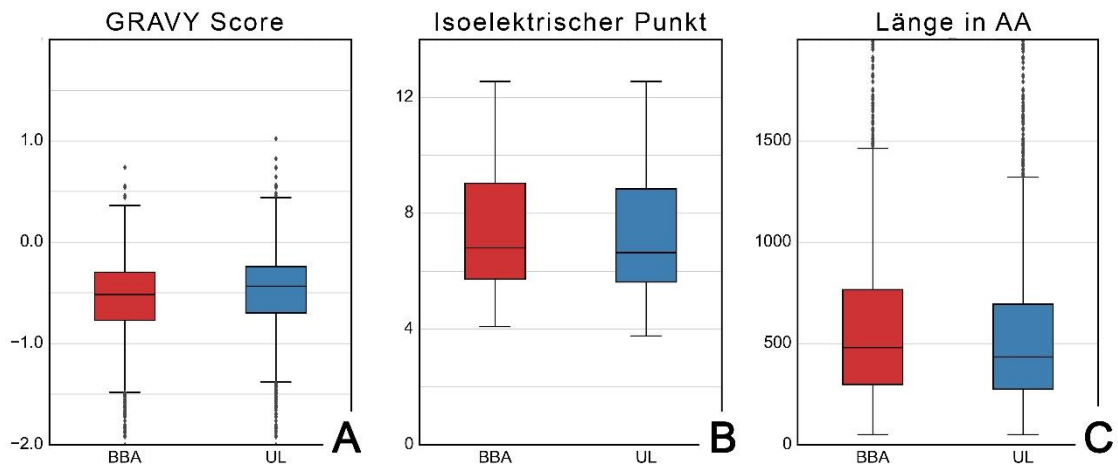


Abb. 5.16: Eigenschaften aller identifizierten Proteine im Hinblick auf IP (**A**), Lipophilie (**B**) und Peptidlänge in Aminosäuren (**C**)

Bei der Gegenüberstellung der Proteine, die exklusiv mit nur einem der beiden Protokolle identifiziert wurden, kommen die Unterschiede deutlicher zur Geltung (Abb. 5.17 A, B). Ein zusätzlicher signifikanter Unterschied scheint ebenfalls in der Länge der Primärstruktur. (Abb. 5.17C) zu liegen.

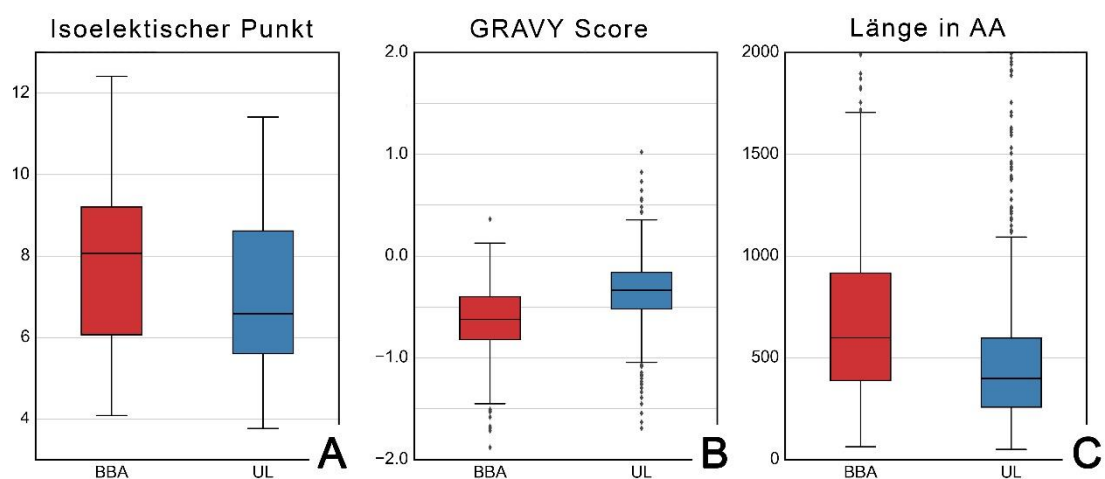


Abb. 5.17: Eigenschaften der Proteine der Differenzmengen, IP (**A**), Lipophilie (**B**) und Größe in Aminosäuren (**C**)

Die, in Abb. 5.17 B dargestellte Differenz in GRAVY Scores, lässt sich alternativ als Histogramm darstellen, das die Unterschiede verdeutlicht, die absoluten Zahlen berücksichtigt und die Annäherung an ein erklärtes Ziel, u. a. Membranproteine zugänglicher zu machen, visualisiert (Abb. 5.18). So finden sich oberhalb eines GRAVY Scores von 0 fast ausschließlich Proteine aus der Probenvorbereitung mittels UL.

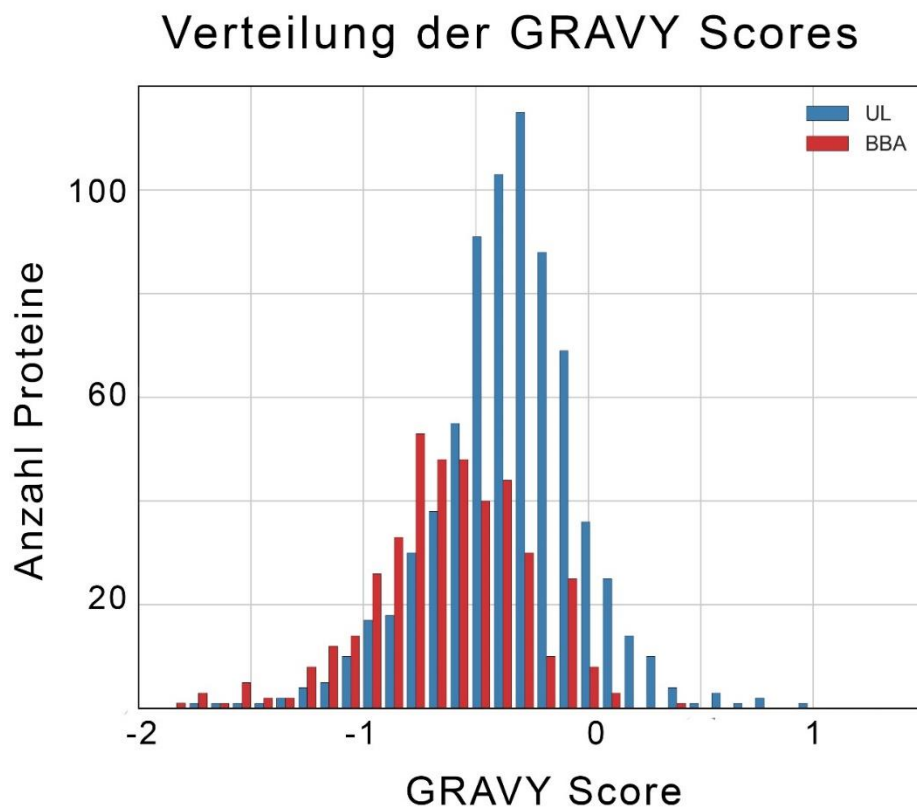


Abb. 5.18: Histogramm der GRAVY-Scores

Absolute Werte der exklusiv für das jeweilige Protokoll identifizierten Proteine

Ein Auslesen der Proteininformation aus der SwissProt Datenbank hinsichtlich der zellularen Substruktur assoziiert mit dem jeweiligen Protein bestätigt die Vermutung der erhöhten Identifikation von Membranproteinen (Abb. 5.19).

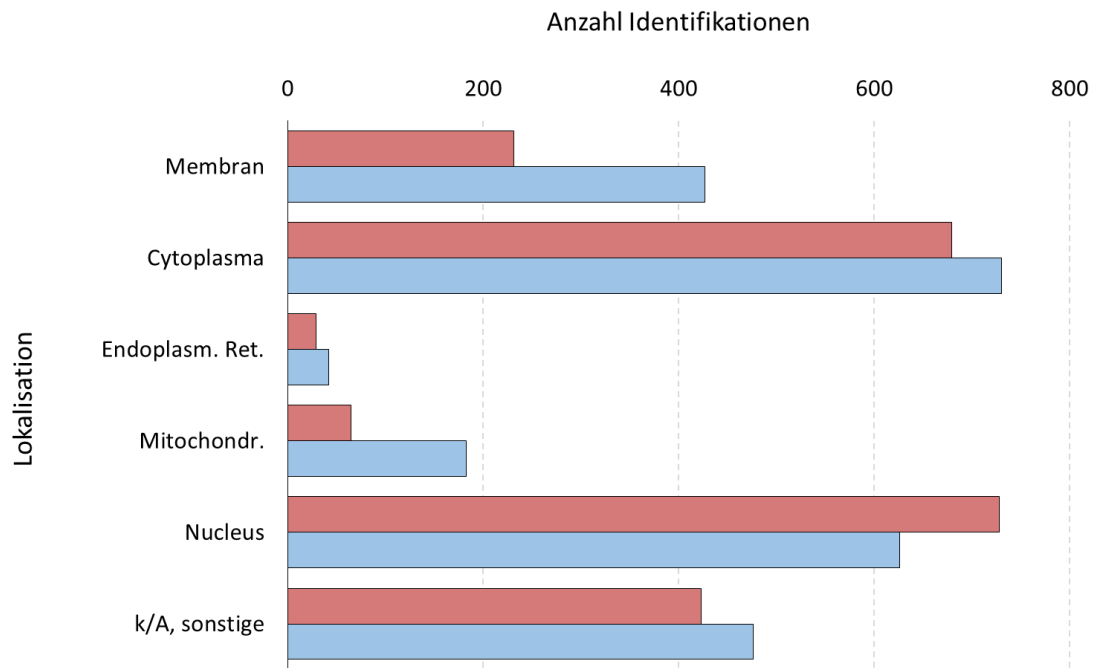


Abb. 5.19: Prognostizierte Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle.

5.4.2 Diskussion

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich unter Lyse mit UL vergleichsweise mehr Proteine insgesamt identifizieren lassen, hier wird als wichtigster Parameter die Wahl des Lysereagens deutlich. Die zusätzlich mithilfe von UL identifizierten Proteine sind statistisch gesehen kleiner, weniger basisch und vor allem lipophiler. Dies kann mit dem überproportionalen Anstieg an gefundenen Membranproteinen (85% gegenüber 15% Gesamtanstieg) korreliert werden, da unter Verwendung von chaotropem Harnstoff lipophile Proteine besser stabilisiert und extrahiert werden. Zusätzlich liefern die höheren Ionen-Scores für UL ein statistisch begründetes, höheres Vertrauen in die Identifikationen. Die hier eingesetzte Lyse von humanen Zellen zur Probenvorbereitung mit UL wird daher in folgenden Experimenten als neuer Standard verwendet.

5.5 Probenvorbereitung mit Silica Beads im Vergleich zu FASP und Verdau in Lösung

Das in den vorangegangenen Kapiteln mit Silicabeads etablierte, adsorptionsbasierte Protokoll (**ABP**) soll mit zwei gut etablierten Methoden der proteomischen Probenvorbereitung verglichen werden. Als Referenzen dienen hierbei einerseits die klassische Präzipitation des Proteoms mit Aceton und anschließendem Verdau in Lösung (*acetone precipitation / in-solution digestion* (abgekürzt: **AP/IS**)), andererseits das gut untersuchte, Filterbasierte **FASP** (*filter-aided sample preparation*). Ziel dieses experimentellen Vergleichs der drei Methoden ist es, sowohl Leistungsfähigkeit als auch Praktikabilität zu bewerten. Von Interesse sind dabei die folgenden Punkte:

- Anzahl der Identifikationen von Proteinen und Peptiden
- Physikochemische Eigenschaften der Peptide und Proteine
- Zugänglichkeit von Membranproteinen
- Reproduzierbarkeit
- Statistische Sicherheit der Identifikationen durch Datenbanksuche
- Zeit- und Arbeitsaufwand im Labor
- Materialkosten

Die Zell-Lyse erfolgte dabei wie in 4.2.3 beschrieben. Proteinkonzentration des Lysats wurde mittels BCA Assay ermittelt und Aliquote entsprechend 100 µg Protein für jede Methode vorbereitet. Triplikate für jede Methode wurden mittels AP/IS, FASP und ABP wie in den entsprechenden Kapiteln (4.2.4 bis 4.2.7) weiterverarbeitet.

5.5.1 Arbeits- und Zeitaufwand der Probenvorbereitung

Wie anhand der Methodenbeschreibung ersichtlich, unterscheiden sich die Protokolle stark in der benötigten Zeit und den geforderten Arbeitsschritten. In der Visualisierung (Abb. 5.20) wird deutlich, dass AP/IS durch die langsame Acetonfällung viel Zeit aber wenig Arbeitsaufwand in Anspruch nimmt, während es sich für FASP umgekehrt verhält. Unterbrechungen des Zeitstrahls bedeuten dabei jeweils einen separaten Arbeitsschritt - die Breite des Abschnitts, die dafür benötigte Zeit. Bereits hier wird deutlich, dass ABP ein sowohl schnelles, als auch wenig aufwändiges Protokoll darstellt.

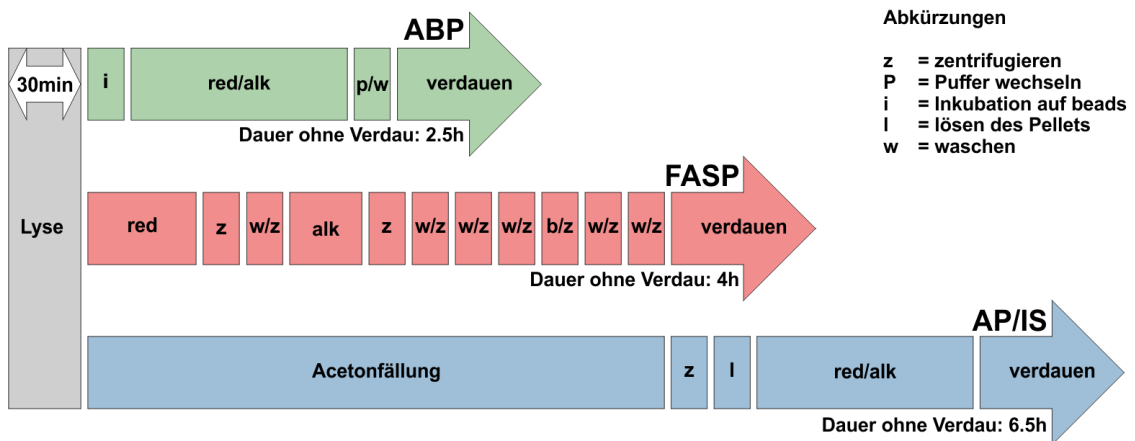


Abb. 5.20: Zeitstrahl für die praktische Anwendung der zu vergleichenden Methoden ABP (Adsorption-basiertes Protokoll auf Silicabeads, FASP (filter-aided sample preparation) und AP/IS (Acetonprecipitation/in-solution digestion)

5.5.2 Vergleichende MS-Analyse

Humane Nierenkarzinomzellen, Typ 293T, wurden analog zum zuvor etablierten Protokoll UL lysiert, die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay ermittelt und Aliquote zu je 100 µg erstellt. Jedes Probenvorbereitungsverfahren wurde mit Triplikaten von jeweils 100 µg Protein durchgeführt. Um den, für den tryptischen Verdau störenden, Harnstoff zu entfernen, wurde das Proteom mithilfe von kaltem Aceton präzipitiert und - vom Überstand befreit - in TEAB 100 mM erneut gelöst (Methodik siehe 4.2.4). Parallel hierzu wurden je 3 Aliquote via FASP aufgereinigt und verdaut, wobei sich hierbei an das Herstellerprotokoll gehalten wurde (siehe 4.2.5). Die Resultate beider Verfahren wurden anschließend mit denen des adsorptionsbasierten Protokolls (ABP, siehe 4.2.7) auf magnetischen Silicabeads verglichen. Die erhaltenen Lösungen tryptischer Peptide wurden über StageTips (4.2.10.1) aufgereinigt. Die Analyse mit LC-MS/MS wurde mit dem, in 4.5.2.1 beschriebenen Setup, durchgeführt.

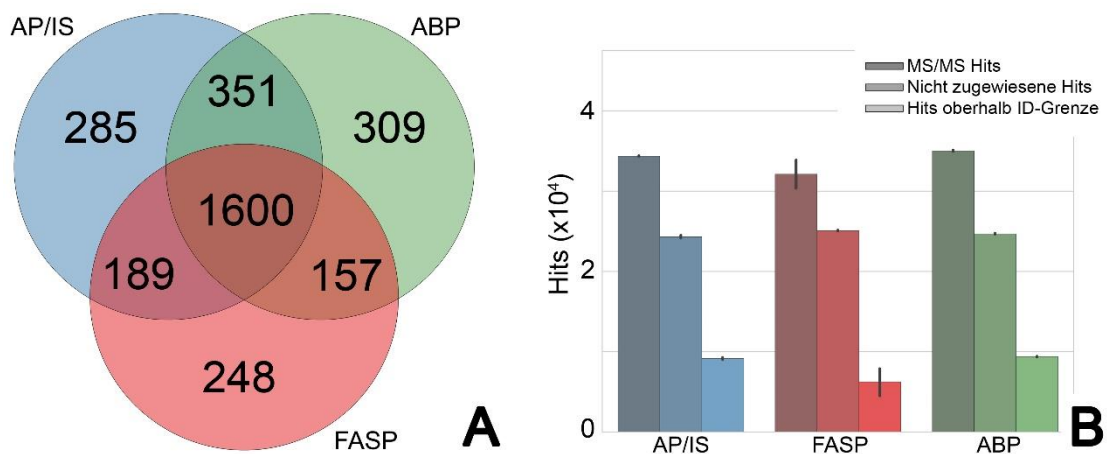


Abb. 5.21: Identifikationen aus den Methoden zur Probenvorbereitung als Venn-Diagramm (**A**); erfolgreiche Zuweisung der MS/MS Signale zu Peptiden inkl. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen Triplikaten (**B**)

Identifiziert werden konnten insgesamt 3139 Proteine, wobei die drei Verfahren sich als komplementär erweisen und nur 1600 und damit 51 % der Proteine von allen Methoden erfasst wurden (Abb. 5.21 A). Die Anzahl MS/MS Signale mit sicher zugewiesenen Peptiden (oberhalb der Identifikationsgrenze von 13) verhält sich bei ABP und AP/IS annähernd identisch und zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit, wie als Fehlerbalken dargestellt (Abb. 5.21 B). FASP zeigt größere Schwankungen zugewiesener Peptide zwischen den einzelnen Proben, ein Ergebnis, das sich mit der ausführlichen Analysen von Sielaff et al. und Tanca et al. deckt^{38,39}.

Ausgehend von den Proteinidentifikationen der Protokolle (Tab. 5-7) lässt sich die jeweilige Abdeckung als Quotient aus Identifikationen einer Methode und der Summe aller ermittelten Proteine errechnen. FASP trägt demnach rund 70 % zu der Gesamtsumme der Identifikationen bei, während AP/IS und ABP alleine jeweils ca. 77 % beitragen. Auffällig sind ebenso die Unterschiede in zugewiesenen Peptiden, nach denen im Schnitt bei ABP 4,4 Peptide auf ein identifiziertes Protein kommen, bei AP/IS 4,0 und bei FASP 4,1 (Tab. 5-7).

Tab. 5-7: Identifizierte Peptide und Proteine, *False Discovery Rate*
Inkl. relativem Anteil an *Missed Cleavages* (1 und 2 Fehlschnitte)

Protokoll	ID Peptide	ID Proteine	FDR (Peptide)	MC 1	MC 2
ABP	10715	2417	0.14%	25.21 %	5.06 %
FASP	8930	2194	0.17%	18.38 %	2.31 %
AP/IS	9732	2425	0.22%	24.54 %	4.79 %

Betrachtet man nur die Ergebnisse von AP/IS und ABP (Abb. 5.22 A), lässt sich eine Reproduzierbarkeit von ca. 80 % errechnen (Berechnung siehe 5.4.1.1). In Anbetracht der allgemeinen Reproduzierbarkeit von MS/MS-Analysen komplexer Proteingemische, welche bei Orbitrap-Massenspektrometern, nach ausführlicher Analyse von Tabb et al.¹²², im Durchschnitt bei 70-80 % zu erwarten ist (Abb. 5.22 B), spricht dies für eine starke Ähnlichkeit der Methoden.

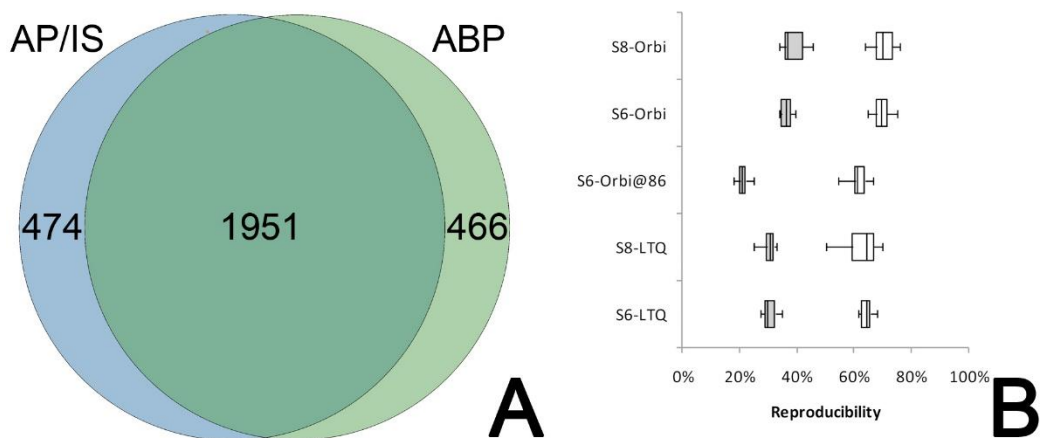


Abb. 5.22: Venn-Diagramm der Proteinidentifikationen mit AP/IS und ABP (A); Reproduzierbarkeit komplexer, proteomischer Proben mit unterschiedlichen Massenspektrometern (Abbildung von Tabb et al.¹²²) (B)

Trotz der hohen Überschneidung der Resultate in Zahl und Art der Identifikationen, sowie der Reproduzierbarkeit der MS/MS-Signale und Zuweisungen (Abb. 5.22 B) sollen die erhaltenen MS-Daten im Folgenden detailliert auf mögliche Unterschiede untersucht werden, um einen systematischen Bias idealerweise ausschließen, wenigstens aber identifizieren zu können.

5.5.3 Weiterführende Datenanalyse der Peptidlisten

5.5.3.1 Untersuchung der Missed Cleavages

Die, mittels *Decoy* Datenbank (siehe 2.4.2.4) errechnete FDR von deutlich unter den geforderten 1% ist essenziell für den Ausschluss falsch-positiver Identifikationen. Die Rate der ausgelassenen Fehlschnitte während des Verdaus (Missed Cleavages, MC) ist mit rund 21 % in der Summe auffällig niedriger bei FASP als bei ABP und AP/IS mit je rund 30 %. Diese Beobachtung muss jedoch nicht unmittelbar auf eine vollständigere Proteolyse hindeuten, sondern kann hypothetisch aus einer Retention der, aufgrund ihrer Fehlschnitte größeren, Peptide auf dem Größenausschlussfilter resultieren. Die Darstellung der Größenverteilung aller identifizierten Peptide als Histogramm (Abb. 5.23) veranschaulicht die Tendenz von FASP, größere Peptide aus der Probe zu entfernen. Ein vermehrtes Auftreten von Peptiden mit MC unter den, für die Protokolle exklusiven, Identifikationen bestätigt diese Vermutung zusätzlich (Tab. 5-8).

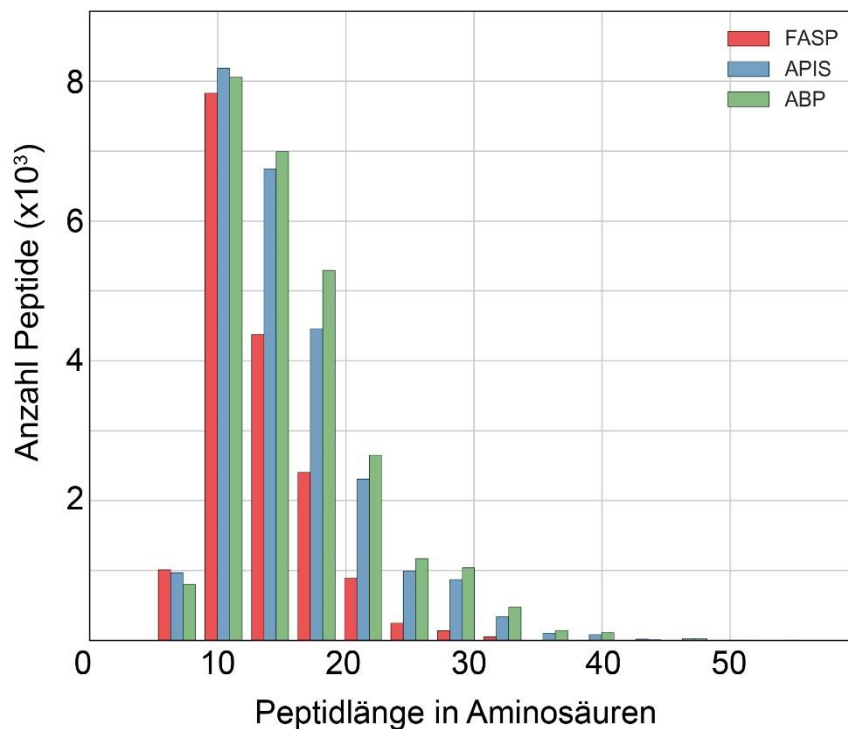


Abb. 5.23: Histogramm der Größenverteilung nach Länge der Aminosäuresequenz für alle identifizierten Peptide.

Tab. 5-8 Peptide der Differenzmengen separiert nach *Missed Cleavages*

MCs	ABP		AP/IS		FASP	
	Peptide	Anteil	Peptide	Anteil	Peptide	Anteil
0	2593	60.0%	2031	65.0%	2836	85.1%
1	1357	31.4%	842	26.9%	452	13.6%
2	374	8.6%	253	8.1%	46	1.4%
Gesamt	4324		3126		3334	

5.5.3.2 Untersuchung der Physikochemie auf Proteinebene

Die Anwesenheit eines potentiellen Bias hinsichtlich der physikochemischen Eigenschaften kann durch Vergleich der Verteilungen von GRAVY-Scores und isoelektrischer Punkte mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da hier keine signifikanten Unterschiede offenbart werden konnten (Abb. 5.24).

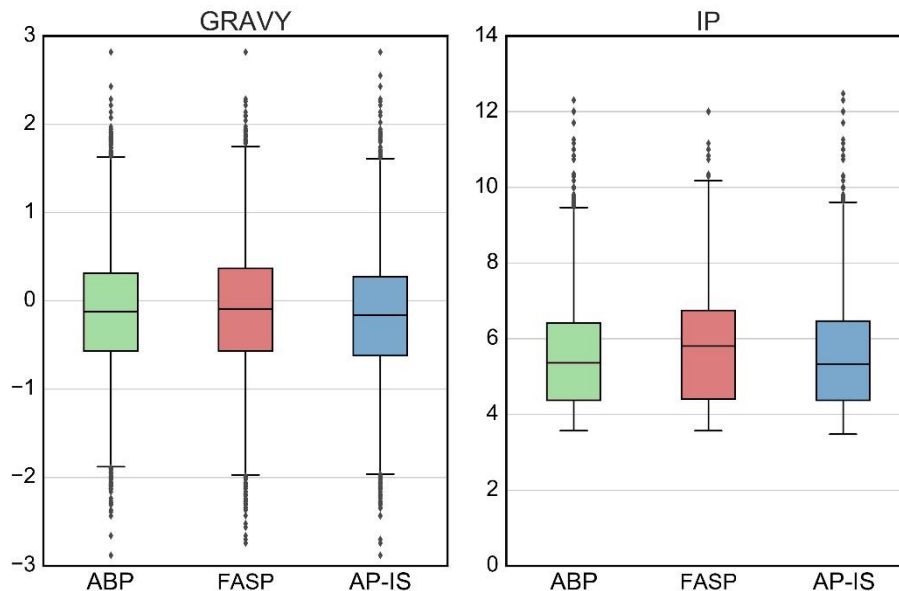


Abb. 5.24: Verteilungen von GRAVY-Scores und isoelektrischer Punkte aller identifizierten Proteine

5.5.3.3 Analyse physikochemischer Eigenschaften exklusiver Peptide

Neben den Proteinen aus der Datenbanksuche wurden die tatsächlich identifizierten, für die Methoden exklusiven Peptide auf potentielle Trends in ihren Eigenschaften untersucht. Peptide resultierend aus ABP und AP/IS zeigen beinahe identische Verteilungen ihrer Eigenschaften (Abb. 5.25 A-D). Die Verteilung basischer Aminosäuren zeigen sich naturgemäß in allen Ansätzen identisch, da Trypsin Lysin oder Arginin als basischen C-Terminus determiniert und somit nur fehlgeschnittene und Histidin-haltige Peptide mehr als eine basische Aminosäure tragen. Die zuvor beschriebene Präferenz von FASP bezüglich kleinerer Peptide bestätigt sich hier als sehr schmale Verteilung der Peptide um 10 Aminosäuren Peptidlänge (Abb. 5.25 E). Hinzu kommt ein signifikant reduzierter Anteil an sauren Aminosäuren pro Peptid (Abb. 5.25 A).

Im Boxplot der Peptidlängen (Abb. 5.25 E) ist auffällig, dass oberhalb von 60 Aminosäuren keine Ausreißer bei ABP auftreten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Ausbleiben der Desorption von den Silicabeads aufgrund der Größe dieser Peptide. Gegebenenfalls ließen sich diese Peptide mit Ultraschall und Einsatz von Tensiden von der Silicaoberfläche lösen, wie von Moritz Neupärtl als effektive Methode der Desorption beschrieben wurde, jedoch steht dieser zusätzliche Arbeitsschritt in keinem Verhältnis zu seinem potentiellen Gewinn:

Berechnet für AP/IS, welches mit einer Zahl von 20 die meisten Peptide in diesem Größenbereich liefert, entspräche dies einem Anstieg an Peptididentifikationen von insignifikanten 0,08%. Da ABP bereits 10 % mehr zugewiesene Peptide hervorgebracht hat, kann dieser theoretische Zugewinn vernachlässigt werden.

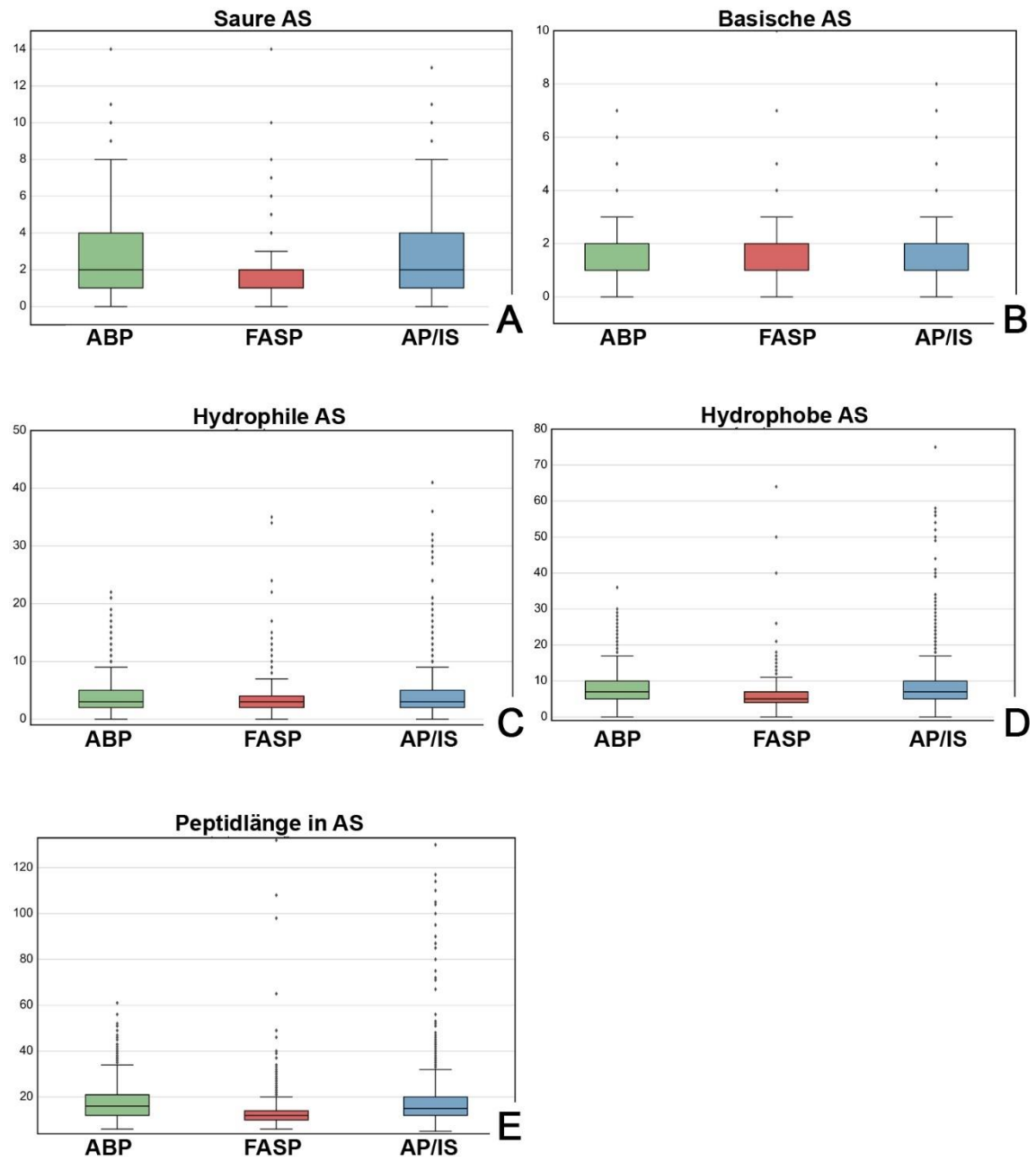


Abb. 5.25: Verteilungen der Aminosäuren pro Peptid nach physikochem. Eigenschaft

5.5.3.4 Analyse von Oxidationen auf Peptidebene

Hierzu wurden die Peptidlisten nach methioninhaltigen Sequenzen durchsucht und daraus neue Listen erstellt. Die, aus dat-Dateien extrahierten, variablen Modifikationen wurden nach Oxidation von Methionin gefiltert und die Anzahl von Peptidsträngen mit mindestens einer Oxidation am Methionin berechnet. Die Oxidationsrate wurde berechnet als Quotient der methioninhaltigen Peptiden mit mindestens einer Oxidation und der Summe aller Peptide mit mindestens einem Methionin in der Sequenz. Das Ergebnis ist als Abb. 5.26 veranschaulicht.

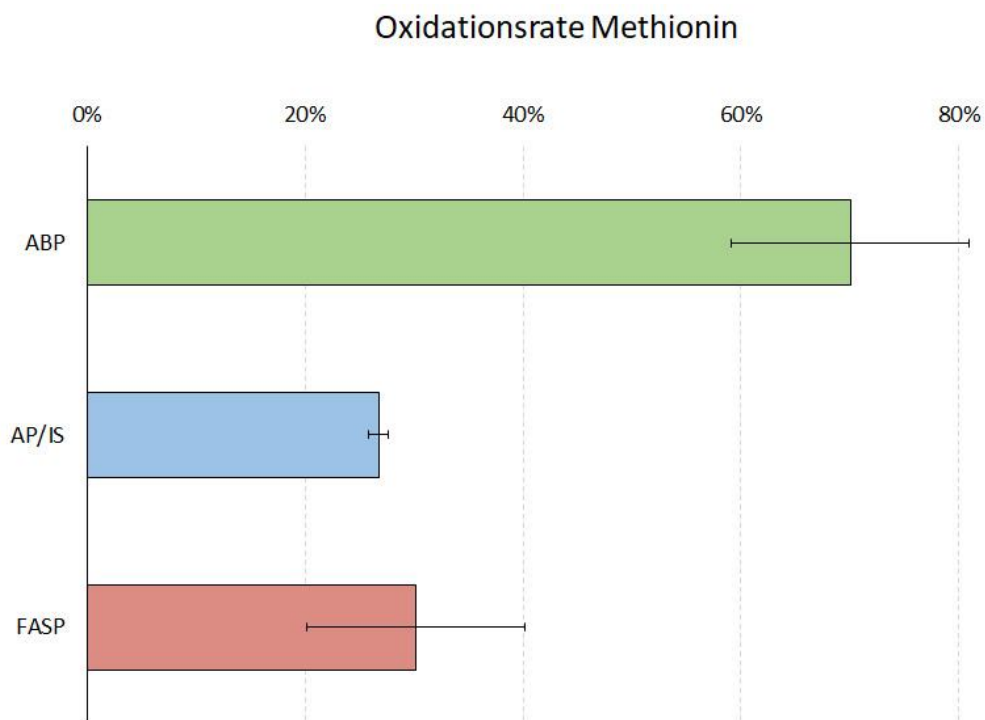


Abb. 5.26: Anteil an methioninhaltigen Peptiden mit mindestens einer Oxidation

Das signifikant erhöhte Maß an oxidierten Peptiden bei der Verwendung von ABP ist am wahrscheinlichsten auf eine eisenkatalysierte Oxidation von Methionin zurückzuführen. Das, in den paramagnetischen Silicapartikeln enthaltene Fe^{3+} kann nach Luis und Stadtman¹²³ von (zur Reduktion von Disulfidbrücken verwendetem) DTT ebenfalls reduziert werden. Das resultierende Fe^{2+} wiederum ist bei Anwesenheit von Sauerstoff und Wasser in der Lage die Oxidation zu H_2O_2 zu katalysieren.

Die Oxidation von Methionin erfolgt somit vermutlich über das generierte H_2O_2 , wie in Abb. 5.27 dargestellt. Die deutlich erhöhte Oxidationsrate von ABP von 70 % gegenüber den rund 30 % von AP/IS und FASP sollte bei der Verwendung des Protokolls bedacht werden, ist jedoch bei der Datenbanksuche nicht von Relevanz, da diese im Normalfall die Oxidation von Methionin als variable Modifikation mit einbezieht und somit keine darin begründeten, falsch positiven oder falsch negativen Identifikationen zu erwarten sind (siehe 4.6.2.2).

Auf Ebene der Probenvorbereitung kann durch die Oxidation am Schwefel des Methionins gegebenenfalls die Adsorption sogar begünstigt werden, bedingt durch die zusätzliche Denaturierung der Proteine und Herabsetzung ihrer Löslichkeit.

Die verbesserte Extraktion der Proteine durch Reduktion und Alkylierung der Cysteine wurde in Kapitel 5.1.2.2 nachgewiesen - es kann jedoch keine sichere Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die zusätzliche Oxidation tatsächlich zur verbesserten Adsorption beitragen kann. Oxidation von Methionin ist jedoch als Ursache von Konformationsänderung und Löslichkeitsabnahme des beta-Amyloids im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer-assoziierten Proteinplaques beschrieben^{124,125}. Dass es sich um einen sich selbst verstärkenden Prozess handelt, kann daher diskutiert werden.

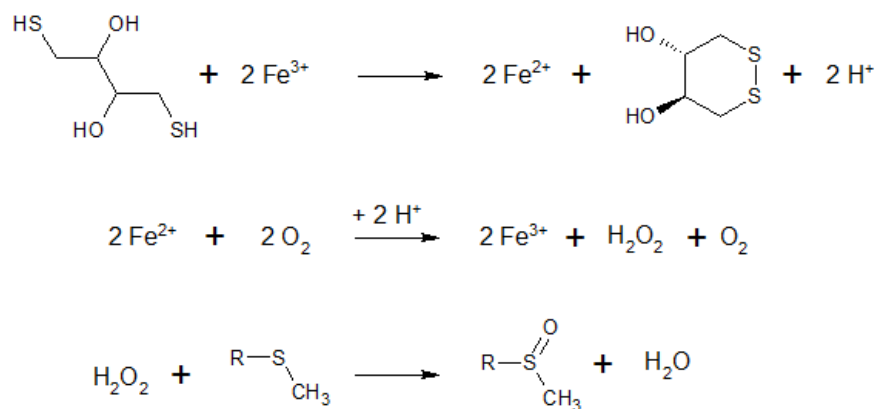


Abb. 5.27: Eisenkatalysierte Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid.

5.5.4 Diskussion

Aus dem direkten Vergleich von ABP mit FASP und traditionellem Verdau in Lösung und der anschließenden, tiefergehenden Analyse der daraus gewonnenen Protein- und Peptiddaten lässt sich eine Vielzahl von Erkenntnissen ableiten:

Die erfolgreiche Reduktion an Arbeitsschritten und benötigter Zeit in der Probenvorbereitung kann trivial wirken, jedoch ist nicht nur jeder manuelle Schritt als potentielle Fehlerquelle zu betrachten - sondern auch jeder Kontakt von Protein- bzw. Peptidlösungen mit einer neuen Oberfläche kann zu Probenverlust durch unerwünschte Adsorption an Pipettenspitzen oder Probengefäßen führen^{7,8}. Die zu erwartende erniedrigte Reproduzierbarkeit konnte am Beispiel von FASP im Vergleich zu den weniger arbeitsintensiven Methoden AP/IS und ABP gezeigt werden. Allgemein ist zu sehen, dass sich die Resultate des ABP kaum von denen des Verdau in Lösung unterscheiden; ABP jedoch zusätzlich, durch die Möglichkeit, Medien zu wechseln und organische Lösungsmittel einzusetzen, deutlich mehr Potential bietet.

Der einzige signifikante Unterschied, der ermittelt werden konnte, ist die vermehrte Oxidation des Methionins, die allerdings keinen messbaren negativen Einfluss auf die proteomische Analyse hat und gegebenenfalls sogar die gewünschte Immobilisierung der Proteine auf der Silicaoberfläche fördert. Damit sollte ABP im Vergleich zu den Standardmethoden als überlegen, mindestens aber als gleichwertig betrachtet werden.

5.6 Propionylierung auf Peptidebene

5.6.1 Quantitative Umsetzung mit Propionsäureanhydrid

Ein synthetisches Peptid mit der Sequenz AAAAKAAAAR wurde zur Feststellung der quantitativen Umsetzung von Lysin herangezogen. 8 μL einer Stammlösung dessen mit einer Peptidkonzentration von 1 nM wurden entnommen und mit Methanol/TEAB (4:1) zu 100 μL verdünnt und im Überschuss mit 1 μL Propionsäureanhydrid versetzt. Die Reaktion wurde nach Golghalyani et al. über 2 h bei 4°C durchgeführt und mit Hydroxylamin abgestoppt. Die erhaltenen Produkte wurden parallel mit einer unmodifizierten, analog verdünnten Peptidprobe mittels MALDI-Orbitrap analysiert (siehe 4.5.1). Der Erwartung entsprechend konnten der Massenänderung von 112 Da (Propionyl-Rest zu je 56 Da an jeweils N-Terminus und Lysin des Peptids) zwischen unmodifiziertem (Abb. 5.28 A) und dem gelabeltem Peptid (Abb. 5.28 B) beobachtet werden. Neben dieser qualitativen, ist zusätzlich die quantitative Beobachtung zu machen, dass nach der Umsetzung mit PA kein Signal bei 871,51 m/z mehr verbleibt und die Reaktion damit vollständig erfolgt. Dennoch kann dieses Ergebnis nicht als zufriedenstellend beurteilt werden, da, neben dem erwarteten Signal bei 983,56 m/z, ein zusätzlich auftretendes bei 997,58 m/z zu beobachten ist (Abb. 5.28 B). Dies entspricht einer zusätzlichen Masse von 14 Da, die anhand der Edukte nicht zu erklären ist.

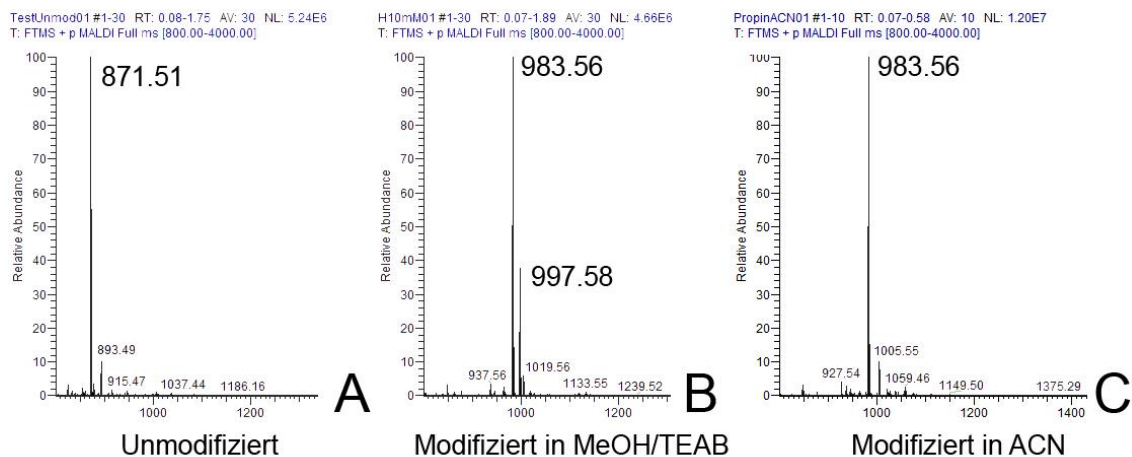


Abb. 5.28: MALDI Spektren des Peptids AAAAKAAAAR

vor (A) und nach Propionylierung mit PA in Methanol/TEAB (B) und Acetonitril (C)

5.6.2 Optimierung der Propionylierung

Die Vermutung, dass es sich bei dem teilweise entstehenden Produkt mit der Masse von 997.58 Da um das Peptid mit einer zusätzlichen Methylierung handelt, ergibt sich aus dem verwendeten Methanol und dem großen Überschuss verwendeten Propionsäureanhydrids. Bei der Reaktion von PA mit den primären Aminen des Peptids, sowie dem, im TEAB-Puffer befindlichen Wassers, entsteht Propionsäure, die ihrerseits den pH-Wert der Lösung senkt. Dadurch kann eine saure Methylierung des C-Terminus stattfinden, wie sie häufig bewusst in der Probenvorbereitung der Gaschromatographie angewendet wird^{126,127} (Abb. 5.29). Die Entstehung dieses Nebenprodukts wäre damit vermeidbar, solange die Pufferkapazität des TEAB nicht überschritten wird.

Alternativ kann die partiell stattfindende Reaktion auch als variable Modifikation in der Datenbanksuche berücksichtigt werden, jedoch korreliert dabei die Anzahl falsch-positiver Identifikationen mit der Anzahl variabler Modifikationen, sodass dies nicht empfehlenswert ist¹²⁸.

Zur vollständigen Vermeidung der säurekatalysierten Methylierung bietet sich es sich an, den primären Alkohol durch ein anders organisches Lösungsmittel zu ersetzen. Ein zusätzlicher Verzicht auf wässrigen Puffer sollte die Entstehung freier Propionsäure durch ungewollte Hydrolyse auf ein Minimum reduzieren. Eine Wiederholung der Propionylierungsreaktion in reinem Acetonitril bei Raumtemperatur führte dabei zum erwünschten Ergebnis (Abb. 5.28 C) mit einem Signal bei 983,56 m/z und Ausbleiben von Eduktresten bei 871.51 oder Nebenprodukten bei 997.58 m/z.

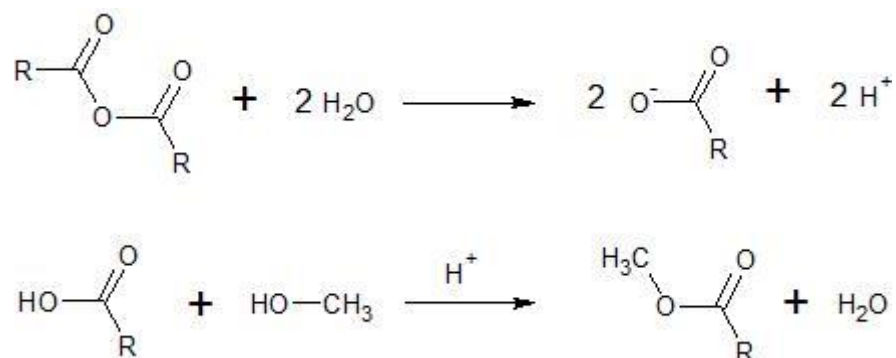


Abb. 5.29: Entstehung von Methylestern durch PA

Hydrolyse von Propionsäureanhydrid (oben), saure Methylesterbildung (unten)

5.7 Vergleich von tryptischem Verdau nach ABP und ArgC-analogenem Verdau

Nachdem ABP als effizientes Protokoll der Probenvorbereitung in Kapitel 5.5 etabliert wurde und zuvor bereits die Möglichkeit des ArgC-analogen Verdau auf Silicabeads erfolgreich getestet wurde (siehe 5.3), soll im Folgenden überprüft werden, inwieweit sich die Vorteile beider Methoden kombinieren lassen.

Dabei wird sowohl die von Golghalyani et al. beschriebene Propionylierung in Methanol/TEAB durchgeführt, als auch die Alternative in Acetonitril.

Frische Zellen vom Typ HEK 293T wurden kultiviert, geerntet (4.2.2) und anschließend, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, lysiert. Das verwendete Protokoll zur Probenvorbereitung mit ABP ist in 4.2.7 beschrieben. Es erfolgte eine Aufreinigung über StageTips (4.2.10.1) und ein anschließendes Eintrocknen der Probe (4.2.10.3) in der Vakuumzentrifuge. Das, zur LC-MS/MS Analyse verwendete Setup ist in 4.5.2.2 zu finden. Hier wurde ein vierstündiger Gradient gewählt um den erhaltenen Datensatz identifizierter Peptide um weniger abundante Exemplare zu erweitern und ausführlichere Datenanalyse zu ermöglichen. Analysiert wurden die Triplikate aus Tab. 5-9.

Die Datenbanksuche erfolgte je nach Art des Verdau mit den Parametern aus Kapitel 4.6.2.2 nach Konvertierung der RAW Dateien in das MZML Format. Die Datenanalyse der MZML und Mascot DAT Dateien wurde mit KNIME durchgeführt.

Tab. 5-9: Probenansätze der Protokolle Tryptisch, ArgC-MeOH und ArgC-ACN

Probenname	Anzahl Proben	Propionylierung (K, Prot. N-Term)
Tryptic	3	nein
ArgC-MeOH	3	Ja (in MeOH/TEAB)
ArgC-ACN	3	Ja (in Acetonitril)

5.7.1 Vergleich der ArgC-analogen Ansätze

Die Anzahl identifizierter Proteine und Peptide ist in Tab. 5-10 dargestellt. Trypsin produziert beim ArgC-analogen Verdau durch die reduzierte Zahl zur Verfügung stehender Schnittstellen inhärent weniger Peptide. Wie hier zu erkennen, korreliert dies aber nicht mit einer reduzierten Menge an Proteinidentifikationen³⁶, welche die häufig relevantere Kennzahl für die Proteomik darstellt. Gemessen an dieser, liefern die ArgC-analogen Verdauansätze eine deutliche Verbesserung von 13,7 % (ArgC-MeOH) bzw. 18,3 % (ArgC-ACN). Die *False Discovery Rates* sind in allen Protokollen deutlich unter dem geforderten Maximum von 1%. Der Anteil Peptide mit nur einer ausgelassenen Schnittstelle konnte mit Verwendung der ArgC-analogen Protokolle mehr als halbiert, mit mehr als zwei MCs sogar auf fast ein Zehntel reduziert werden. Die im Allgemeinen hohe Anzahl detektierter MCs ist auf den sehr langen Gradienten während der LC zurückzuführen, der es erlaubt, auch sehr selten auftretende, fehlgeschnittene Peptide zu erfassen. Die geringe Anzahl an Peptiden mit zwei MCs nach ArgC-analogenem Verdau ermöglicht die Datenbanksuche nach Peptiden mit maximal einer MC ohne die Zahl identifizierter Proteine signifikant zu kompromittieren, was voraussichtlich mit einer simultanen Senkung von sowohl Dauer der Datenbanksuche als auch der Zahl falsch-positiver Identifikationen einhergehen würde¹²⁸.

Tab. 5-10 Identifikationen, False Discovery Rates, Missed Cleavages

Protokoll	Peptide	Proteine	FDR	1 MC.	2 MC
Tryptic	37154	4554	0.22%	32.30%	8.93%
ArgC-MeOH	25844	5177	0.17%	13.84%	1.07%
ArgC-ACN	27787	5386	0.20%	14.87%	1.36%

Das Venn-Diagramm in Abb. 5.30 A zeigt die Schnittmengen der Proteinidentifikationen unter dem entsprechenden Protokoll aus dem unter anderem die zu erwartende Ähnlichkeit der ArgC-analogen Protokolle ersichtlich ist. Abb. 5.30 B verdeutlicht dies noch einmal, wobei die Unterschiede größtenteils statistisch durch die hohe Variabilität der Peptididentifikation bei komplexen Proben zu begründen sind¹²².

Da der ArgC-analoge Ansatz unter Verwendung von ACN nicht nur leicht erhöhte Identifikationszahlen für Proteine und Peptide offeriert, sondern zusätzlich auch das Risiko unerwünschter Methylierung umgeht, wird im Folgenden primär der Vergleich zwischen den Protokollen *Tryptisch* und *ArgC-ACN* geführt.

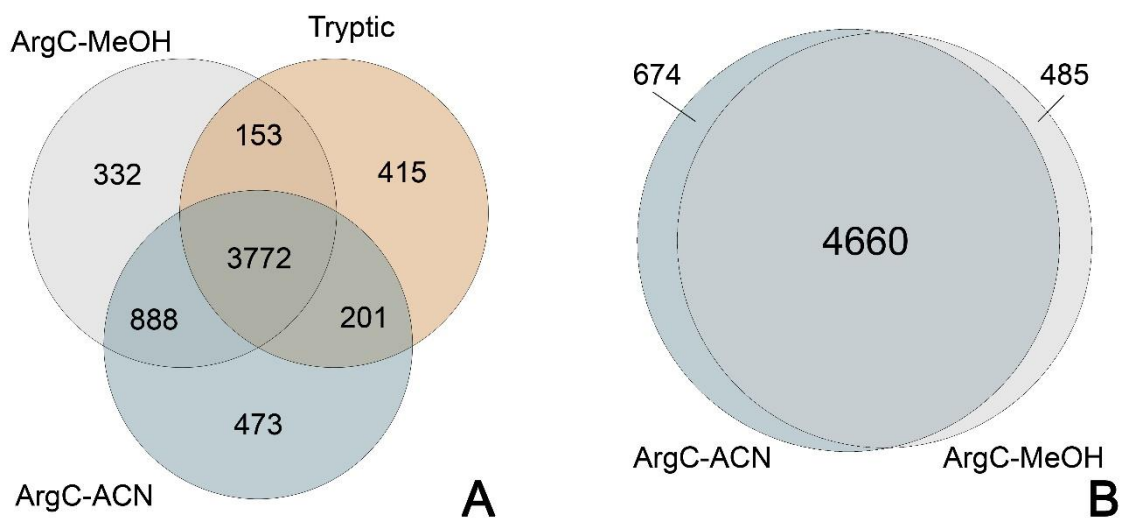


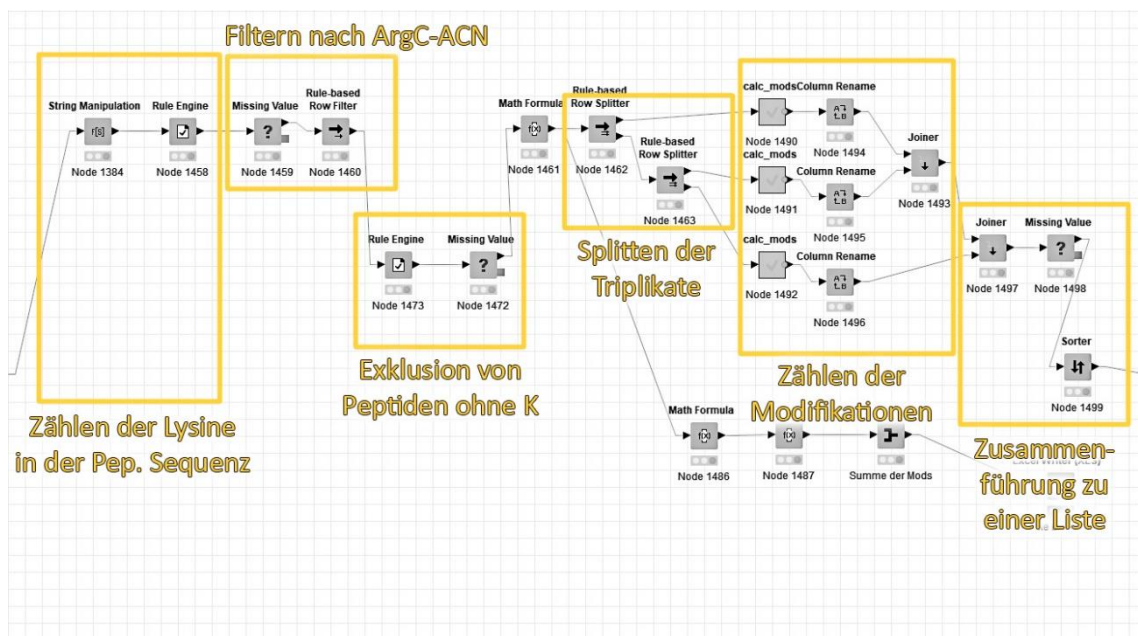
Abb. 5.30: Venn-Diagramme der identifizierten Proteine für alle Protokolle (A) und hohe Überschneidung der ArgC-analogen Ansätze (B)

5.7.2 Interludium: Carbamylierung von Lysinen durch Harnstoff

Zur Lyse in hoher Konzentration eingesetzter Harnstoff stellt ein bekanntes Reagenz zur Carbamylierung von Lysinen dar¹²⁹ und würde dadurch potentiell eine zusätzliche Modifikation an der gleichen Aminosäure einführen, was in bisherigen Datenbanksuchen nicht berücksichtigt wurde.

Die für den ArgC-analogen Verdau benötigte Propionylierung der Lysine wäre in diesem Fall nicht quantitativ möglich. Eine Wiederholung der Datenbanksuche wurde daher durchgeführt, bei der sowohl Propionyl- als auch Carbamyl-Reste als variable Modifikationen am Lysin miteinbezogen wurden. Die Peptidliste der Datenbanksuche wurde auf lysinhaltige Peptide durchsucht, die Anzahl an K inklusive der Modifikationen „Propionyl (K)“ und „Carbamyl (K)“ pro Peptid gezählt und in Tab. 5-11 ins Verhältnis gesetzt, woraus sich die Quote der jeweiligen Modifikation berechnen lässt.

Anhand dieser wird eindeutig ersichtlich, dass die Carbamylierung von Lysinen mit einer Rate von maximal 0,24 % praktisch der *False Discovery Rate* entspricht und daher bei der Datenbanksuche nicht berücksichtigt werden sollte, um deren Dauer und Zuverlässigkeit nicht zu beeinträchtigen. Die Unterschiede zwischen den Replikaten erweisen sich als minimal und die Reproduzierbarkeit der chemischen Modifikation damit als hoch. Die bisher ohnehin als fixe Modifikation definierte Propionylierung kann damit als ausreichend betrachtet werden



Exemplarischer Workflow zur Peptidlistenanalyse

Tab. 5-11 Carbamylierungsrate von Lysinen der Replikate von ArgC-ACN

Carbamylierung von Lysinen von 3 Replikaten ArgC-ACN									
Zahl der K bzw. mod/peptid	Replikat 1			Replikat 2			Replikat 3		
	Anzahl K	Propionylierungen	Carbamylierung	Anzahl K	Propionylierungen	Carbamylierung	Anzahl K	Propionylierungen	Carbamylierung
0	10261	10340	26509	10241	10306	27424	8252	8291	22558
1	9185	9147	39	9685	9663	52	7839	7832	31
2	4431	4411	4	4637	4625	13	3942	3929	7
3	1602	1597	1	1700	1698	0	1499	1487	2
4	718	713	1	774	761	0	661	658	1
5	212	202	0	253	241	0	235	234	1
6	73	74	0	99	98	0	86	88	0
7	32	33	0	53	54	0	35	37	0
8	20	22	0	21	26	0	20	22	0
9	3	5	0	0	2	0	3	6	0
10	16	9	0	24	13	0	25	13	0
11	1	1	0	2	2	0	2	2	0
12	0	0	0	0	0	0	1	1	0
SUMME:	27805	27619	54	29815	29600	78	25271	25134	60
% mod. K		99.33%	0.19%		99.28%	0.26%		99.46%	0.24%
% unmod K	0.47%			0.46%			0.30%		
Kontrollsumme	100.00%			100.00%			100.00%		

Übersetzt aus der Supplementary Information zu

„Proteomic Sample Preparation through Extraction by Unspecific Adsorption on Silica Beads for ArgC-like Digestion“¹²⁰

5.7.3 Vergleich identifizierter Proteine nach optimiertem ArgC-analogram und tryptischem Verdau

5.7.3.1 Zusammenhang zwischen identifizierten Peptiden und Proteinen

Der direkte Vergleich der Proteinidentifikationen unter ArgC-ACN (im Folgenden nur noch ArgC-like) und nach tryptischem Verdau im Venn Diagramm (Abb. 5.31 A) verdeutlicht die Überlegenheit von ersterem. Die Analyse der zugewiesenen MS/MS Spektren zu Peptiden der Datenbank in Abb. 5.31 B offenbart jedoch eine sehr ähnliche Zahl an MS/MS Signalen sowie sicher identifizierten Peptiden (Mascot-adjustierter Ionscore > 13) bei gleichzeitig leicht verbesserter Reproduzierbarkeit (Standardabweichung). Diese erhöhte Effizienz – aus einem gleich großen Datensatz mehr Proteine nach ArgC-analogram Verdau zu identifizieren – ist dabei voraussichtlich darauf zurückzuführen, dass nach tryptischem Verdau mehrere Peptide des gleichen Proteins identifiziert werden. Dies erhöht die Komplexität des Datensatzes ohne zusätzliche Identifikationen zu produzieren und ist damit von geringerer Effizienz. Dieser Effekt wurde bereits von Golghalyani et al. beschrieben³⁶ und in dessen Dissertation auf ein humanes Proteom mithilfe von NHS-Beads angewandt. Ein Vergleich zu den Ergebnissen auf Silicabeads soll an dieser Stelle durchgeführt werden.

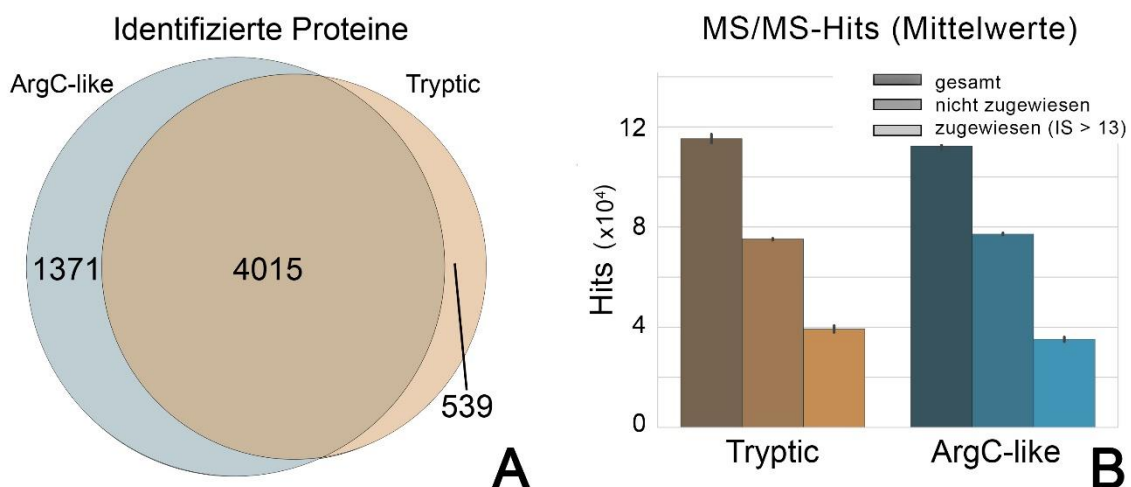


Abb. 5.31: Identifikationen und zugrundeliegende PSMs IDs nach tryptischem und ArgC-analogram Verdau (A) und MS/MS Treffer (B)

5.7.3.2 *Peptide-to-Spectra-Matches* (PSM) beider Methoden

Das Auftragen der *Peptide-to-Spectra-Matches* (PSM) beider Protokolle auf den Achsen des Scatterplots in Abb. 5.32 A erlaubt eine Visualisierung der Verteilung unter Berücksichtigung der Abundanz der Proteine im Proteom (Größe der Spots). Proteine mit gleicher Anzahl von PSMs in beiden Ansätzen liegen dabei auf der gestrichelten Winkelhalbierenden. Punkte unterhalb der Linie repräsentieren Proteine, die eine erhöhte Menge von PSMs nach tryptischem Verdau zeigen und umgekehrt. Entgegen dem optischen Eindruck wurden mehr Datenpunkte oberhalb der Linie ermittelt, die im Bereich von unter 50 PSM konzentriert vorliegen. Hierin liegt die höhere Anzahl identifizierter Proteine begründet. Im Kontrast dazu liegen die Proteine mit mehr als 50 PSMs fast ausschließlich unterhalb der Linie, was die deutlich höhere Effizienz des ArgC-analogen Verdau auch für das humane Proteom bestätigt. Frühere Ergebnisse mit proteomischen Proben humaner Zellen auf NHS-Beads (Dissertation V. Golghalyani) konnten keine Überlegenheit des ArgC-analogen Verdau im Hinblick auf Identifikationszahlen feststellen (Abb. 5.32 B).

Eine mögliche Erklärung hierfür ist die in dieser Arbeit verwendete, reversible Adsorption an die Silica-Oberfläche bzw. der Verzicht auf NHS-Ester zur Immobilisierung der Proteine: Wenig abundante Proteine, deren Identifikation durch niedrige PSMs erfolgt, wären demnach überproportional von einer kovalenten Bindung an die NHS-Ester betroffen und nicht für die MS-Analyse zugänglich. Die höheren PSM-Werte nach tryptischem Verdau können dabei diesen Verlust kompensieren, der ArgC-analoge Ansatz hat dieses Potential durch die geringere Anzahl von PSMs bzw. identifizierte Peptide jedoch nicht. Die Verwendung magnetischer Silicabeads, welche die Desorption der Peptide nach proteolytischem Verdau erlauben, zeigen diesen nachteiligen Effekt nicht. Das Resultat erweist sich als eindeutig: Nach ArgC-analogen Verdau konnten deutlich mehr Proteine mit größerer PSM-Effizienz identifiziert werden (Abb. 5.32 A und B).

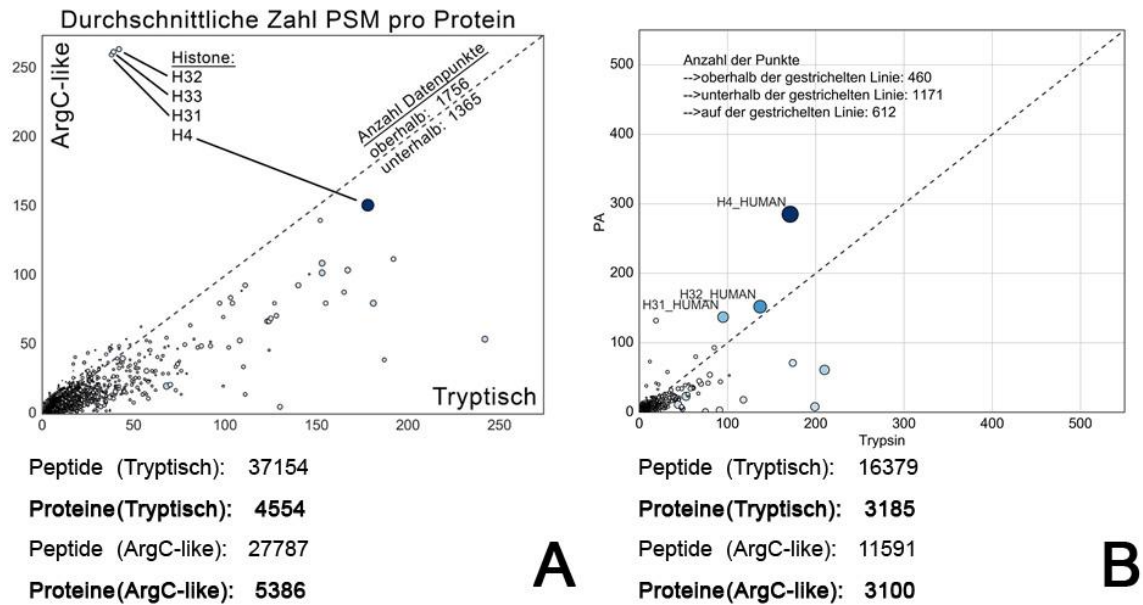


Abb. 5.32: Scatterplots der Zuweisungen von Peptiden zu MS/MS-Spektren Proteine nach ArgC-analogenem und tryptischem Verdau auf Silicabeads (**A**) das Äquivalent aus der Dissertation von V. Golghalyani auf NHS-Beads (**B**). Färbung und Größe der Datenpunkte entsprechen dem NSAF-Wert des jeweiligen Proteins (siehe 2.5.1)

5.7.3.3 Identifikation von Histonen

Die auffälligen Ausnahmen von drei Proteinen, die nach tryptischem Verdau nur ca. 50, nach ArgC-analogenem aber mehr als 250 PSM liefern, sind in Abb. 5.31 A und B zu sehen. Diese Ausreißer wurden als Histone (H3.1, H3.2, H3.3) identifiziert und besitzen einen hohen Anteil basischer Aminosäuren. Die verbesserte Zugänglichkeit von Histonen für *bottom-up* Proteomik nach Propionylierung der Lysine wurde von Garcia et al.⁴⁵ beschrieben und kann hier bestätigt werden. Die zusätzlichen PSM bieten in dem Vergleich proteomischer Verfahren keinen direkten Vorteil, könnten aber Verwendung in der Untersuchung von Histonen finden, insbesondere hinsichtlich ihrer vielfältigen posttranslationalen Modifikationen^{130,131}. Nach Extraktion der Proteinfamilien aus den Listen identifizierter Proteine, konnte zusätzlich eine überproportionale Erhöhung um 53,3 % an identifizierten Histonvarianten im Vergleich zum gesamten Anstieg von 18,3% nach ArgC-analogenem Verdau errechnet werden (Tab. 5-12).

Tab. 5-12: Identifizierte Histone

Proteinfamilie	Tryptisch	ArgC-like	Differenz	Rel. Zunahme
Andere	4509	5317		
Histone	45	69	24	53.33%
SUMME	4554	5386	832	18.27%

5.7.3.4 Lokalisation identifizierter Proteine in der Zelle

Detaillierte Informationen zu Proteinen aus UniProt stehen nach der Datenbanksuche mit SwissProt in den Mascot-generierten dat-Dateien zur Verfügung. Diese enthalten u.a. Zellstrukturen, die mit dem jeweiligen Protein assoziiert werden.

Ein Auslesen dieser Daten erlaubt die Prognose der Proteinlokalisierung in der Zelle. In Tab. 5-13 sind die identifizierten Proteine nach dieser Prognose sortiert, Exemplare deren Datenbankeinträge keine Lokalisation erlauben, wurden unter „unbekannt“ gelistet. Auffällig ist hier insbesondere der überproportionale Anstieg an identifizierten Membran-assoziierten Proteinen, deren Vorkommen in der Proteinliste nach ArgC-analogenem Verdau 10 % über dem Gesamtanstieg der Identifikationen liegt. In 5.4.1.1 konnte anhand eines E. coli Proteoms bereits gezeigt werden, dass die Lyse mit Harnstofflösung die Analyse von Membranproteinen begünstigt, im Vergleich mit dem tryptischen Ansatz zeigt sich, dass ArgC-analoges Verdauen der proteomischen Probe diesen Trend verstärkt. Der - in relativen Zahlen - ersichtlich hohe Anstieg Endosom-assoziiierter Proteine könnte diese These aufgrund der hier typischen Transmembranproteine ergänzen, allerdings erlauben die niedrigen absoluten Zahlen keine fundierte Aussage.

Tab. 5-13: Identifizierte Proteine nach Zellstruktur

Zellstruktur	Tryptisch	ArgC-ACN	Differenz (total)	Rel. Anstieg
Cytoplasma	1339	1521	182	13.59%
Endoplasm. Reticulum	60	72	12	20.00%
Endosom	11	15	4	36.36%
Golgi-Apparat	34	39	5	14.71%
Membran	857	1100	243	28.35%
Mitochondrium	275	285	10	3.64%
Nucleus	1074	1281	207	19.27%
unbekannt	904	1073	169	18.69%
SUMME	4554	5386	832	18.27%

5.7.3.5 Physikochemische Eigenschaften der Proteine

Um die Ursache der Differenz in den Identifikationszahlen weiter zu untersuchen und ein Bias bei der Propionylierung auf den Beads auszuschließen, wurden die erhaltenen Daten auf Diskriminierung von Proteinen mit bestimmten Eigenschaften hin analysiert. Die Berechnung der GRAVY-Scores zur Ermittlung der Lipophilie der Proteine zeigt eine fast identische Verteilung in beiden Protokollen (Abb. 5.33 A), so dass hier die zusätzlich identifizierten Proteine unter ArgC-analogenem Verdau nicht aus einer Bevorzugung lipophiler oder hydrophiler Eigenschaften heraus entstehen. Ähnlich verhält es sich bei Betrachtung der errechneten IP für die Proteine (Abb. 5.33 B).

Um mögliche Trends in den Differenzmengen der Identifikationen auszuschließen, wurden diese separat untersucht (Abb. 5.33 C, D). Die minimale Verschiebung von ArgC-exklusiven Proteinen zugunsten basischer und Trypsin-exklusiver zugunsten saurer Proteine kann nicht als signifikant betrachtet werden. Die Einführung eines Bias durch chemische Modifikation während der Probenvorbereitung wurde nicht erwartet und ist hiermit auch als sehr unwahrscheinlich bestätigt.

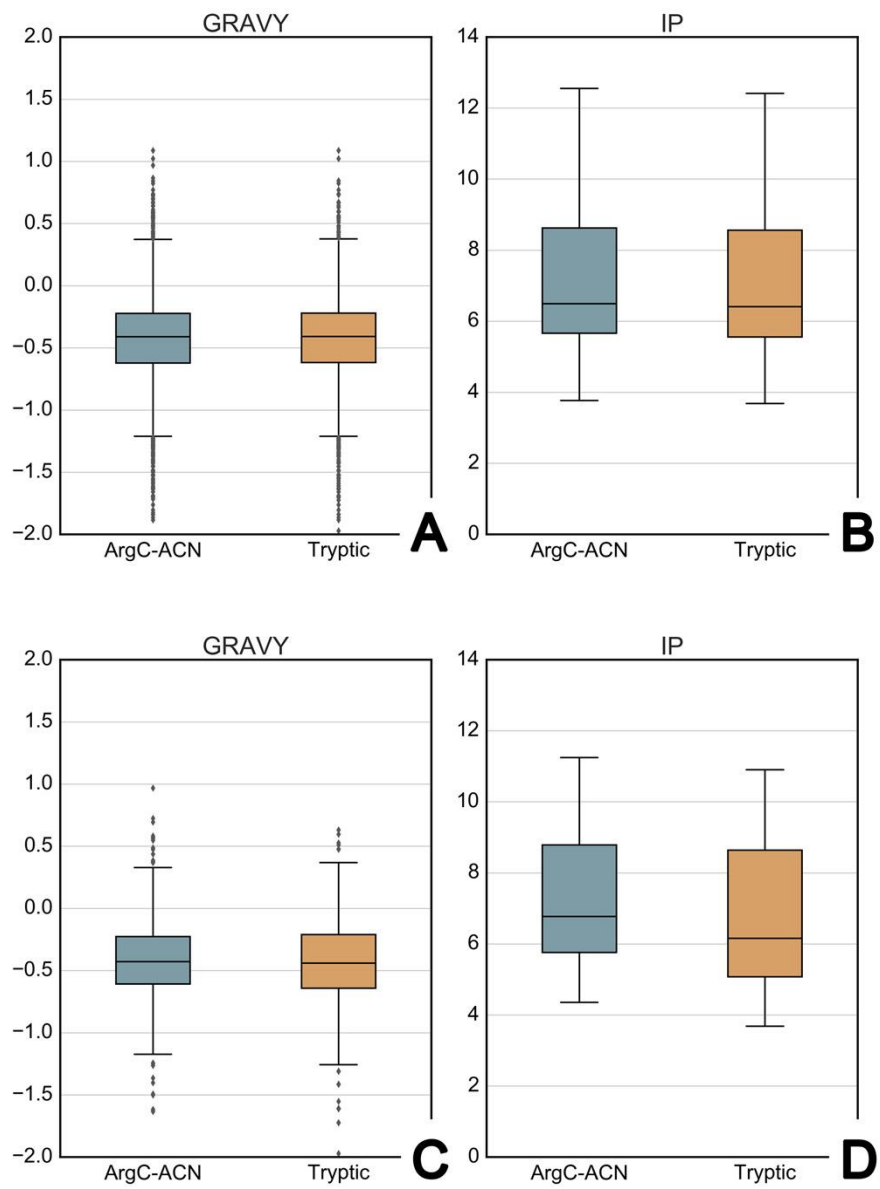


Abb. 5.33: GRAVY-Scores und isoelektrische Punkte der Proteine Gesamt (A, B) und Differenzmengen (C, D)

5.7.4 Analyse der identifizierten Peptide nach tryptischem und ArgC-analogem Verdau

5.7.4.1 Masse der Vorläuferionen

Die Vermutung, durch ArgC-analogen Verdau vermehrt längere Peptide zu generieren liegt nahe, da hier Lysine als Schnittstelle übergangen werden. Die kalkulierten Massen der Peptidsequenzen wurden dazu als Histogramm in Abb. 5.34 A dargestellt und bestätigen diese Vermutung initial nicht. Die Verteilungen sind nicht normiert, so dass sich die, nach tryptischem Ansatz größere Menge Peptide (Tab. 5.10) auch in der Höhe der Säulen widerspiegelt. Eine signifikante Verschiebung hin zu größeren Peptiden nach ArgC-analogen Verdau ist nicht zu beobachten.

In Anbetracht des hohen Anteils fehlgeschnittener Peptide nach tryptischem Verdau (siehe Tab. 5.10), zeigt sich - nach Ausschluss von Peptiden mit MCs - ein deutlicher Unterschied der Größenverteilung gemäß der anfänglichen Erwartung. Folglich sind bei einer Datenbanksuche mit Berücksichtigung von bis zu zwei MCs im Schnitt keine größeren Peptide zu erwarten als durch ArgC-analogen Verdau, so dass die Interpretation der Spektren problemlos im gleichen Masse-Ladungsbereich erfolgen kann. Ursachen für die Häufigen Fehlschnitte an Lysin als Schnittstelle wurden bereits ausführlich in der Proteomik untersucht^{132,133}, die direkten Vorteile geringerer Fehlschnitte für die Datenbanksuche wurden in 5.7.1 diskutiert.

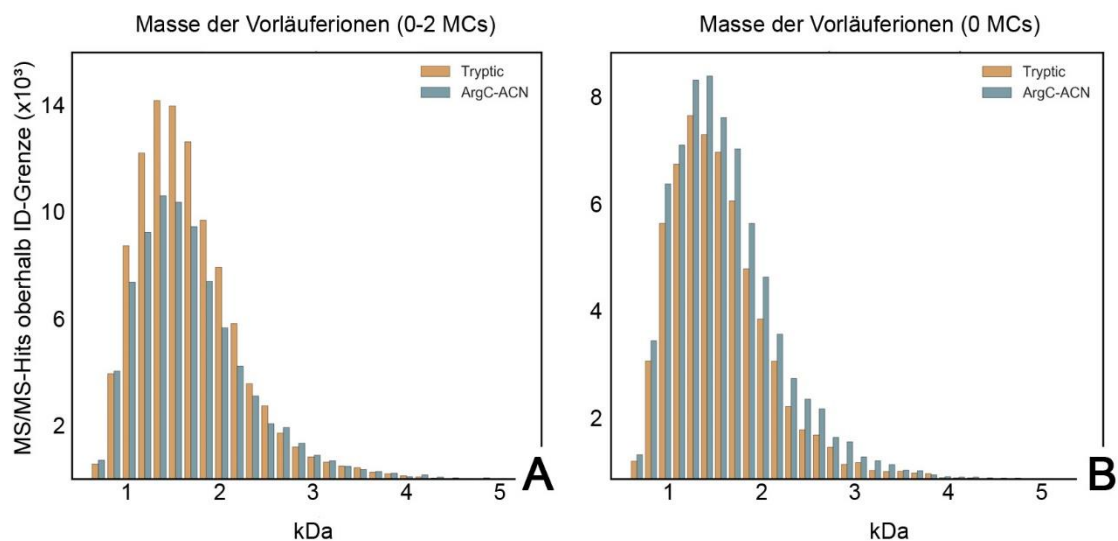


Abb. 5.34: Verteilung der Massen der Vorläuferionen mit bis zu 2 Fehlschnitten (A) und ohne Fehlschnitte (B)

5.7.4.2 Peptidkompositionen

Die anteilige Zusammensetzung der Peptidsequenzen identifizierter Vorläuferionen wurde nach Einteilung der Aminosäuren in die Gruppen „Sauer“, „Basisch“, „Hydrophil“ und „Hydrophob“ (vgl. Kapitel 1.1.1) durchgeführt und als Boxplot-Verteilung dargestellt (Abb. 5.35). Dabei zeigt sich als einzig signifikanter Unterschied der prozentual höhere Anteil basischer Aminosäuren in ArgC-analogen Peptiden. Da in der Theorie ein tryptisches Peptid exakt eine basische Aminosäure (R, K) trägt und lediglich durch ausgelassene Schnittstellen die durchschnittlich vorkommende Zahl basischer Aminosäuren > 1 ist - Lysine bei ArgC-analogen Verdau jedoch mit Intention übergangen werden - ist diese Verschiebung zu erwarten. Die sichtbaren, leichten Verschiebungen der tryptischen Peptide zu größeren Anteilen in den übrigen drei Kategorien sind das Resultat der relativen Darstellung.

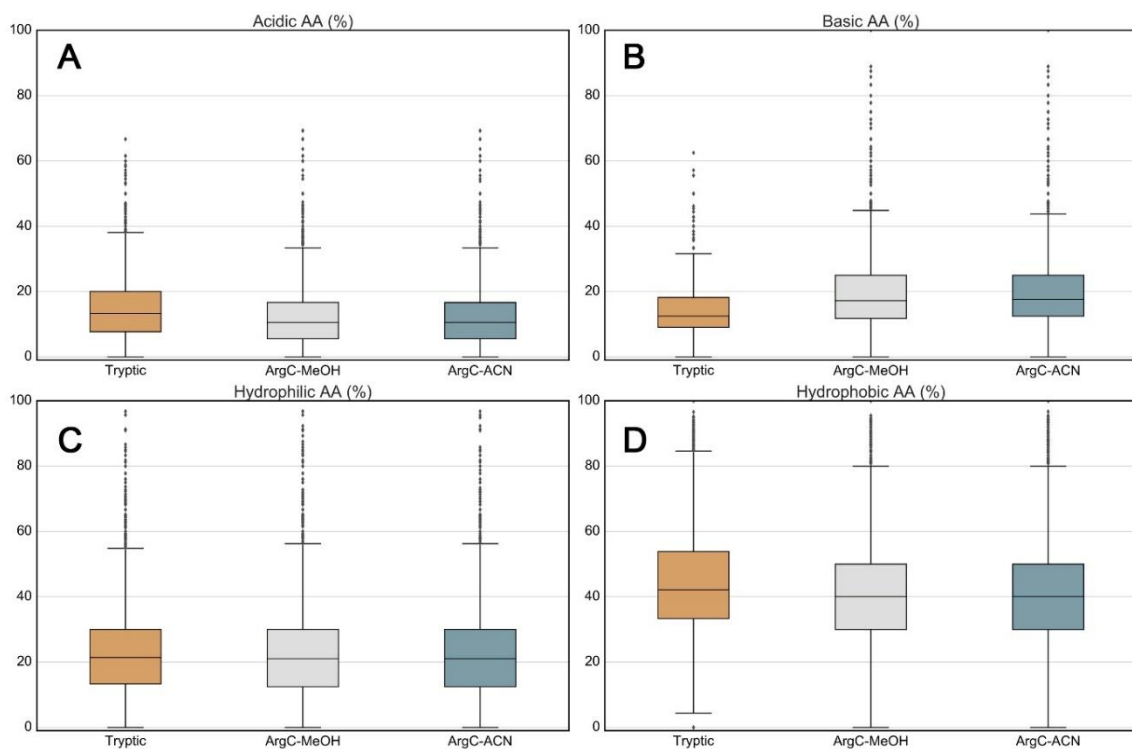


Abb. 5.35: Verteilung des Aminosäureanteils nach Eigenschaft ihrer Seitenketten Sauer (A), Basisch (B), Hydrophil (C) und Hydrophob (D)

5.7.5 Fragmentierungsverhalten der Vorläuferionen

Eine Optimierung des Fragmentierungsverhaltens von Peptiden mit Modifikationen am Lysin wurde von Frese et. al beschrieben¹³⁴ und in der ursprünglichen Etablierung des ArgC-analogen Verdaus durch V. Golghalyani konnte eine Verbesserung der Mascot-Ionscores³⁶, eine erhöhte *Intensity Coverage* und ein signifikanter y-Fragmentüberschuss beobachtet werden.

5.7.5.1 Überschuss der y-Fragmentionen

Der Überschuss an y-Ionen im MS/MS-Spektrum errechnet sich anhand der Intensitäten:

$$\text{Fragmentüberschuss (y - Ionen)} = \frac{\sum \text{Intensität (y \cdot Ionen - b \cdot Ionen)}}{\sum \text{Intensität (y \cdot Ionen + b \cdot Ionen)}}$$

Bei einem Wert von 1 liegen somit ausschließlich y-Ionen vor, sodass man von einer „sauberen“ Fragmentierung sprechen kann und ein wenig komplexes MS²-Spektrum erhält, welches bei einer Datenbanksuche von erheblichem Vorteil ist¹³⁵. Zur detaillierten Analyse des Fragmentierungsverhaltens der Vorläuferionen wurden diese in Massenbereiche unterteilt (Tab. 5-14).

Tab. 5-14: Einteilung Vorläuferionen (VLI) in Massenbereiche

Massenbereich kDa	Tryptisch		ArgC-analog	
	VLI	Anteil	VLI	Anteil
0 - 1	1771	4.77%	1743	6.20%
1 - 2	25993	70.03%	20556	73.10%
2 - 3	8017	21.60%	5170	18.39%
3 - 4	1191	3.21%	537	1.91%
> 4	146	0.39%	113	0.40%
VLI (Summe)	37118		28119	
Kontrollsumme		100.00%		100.00%

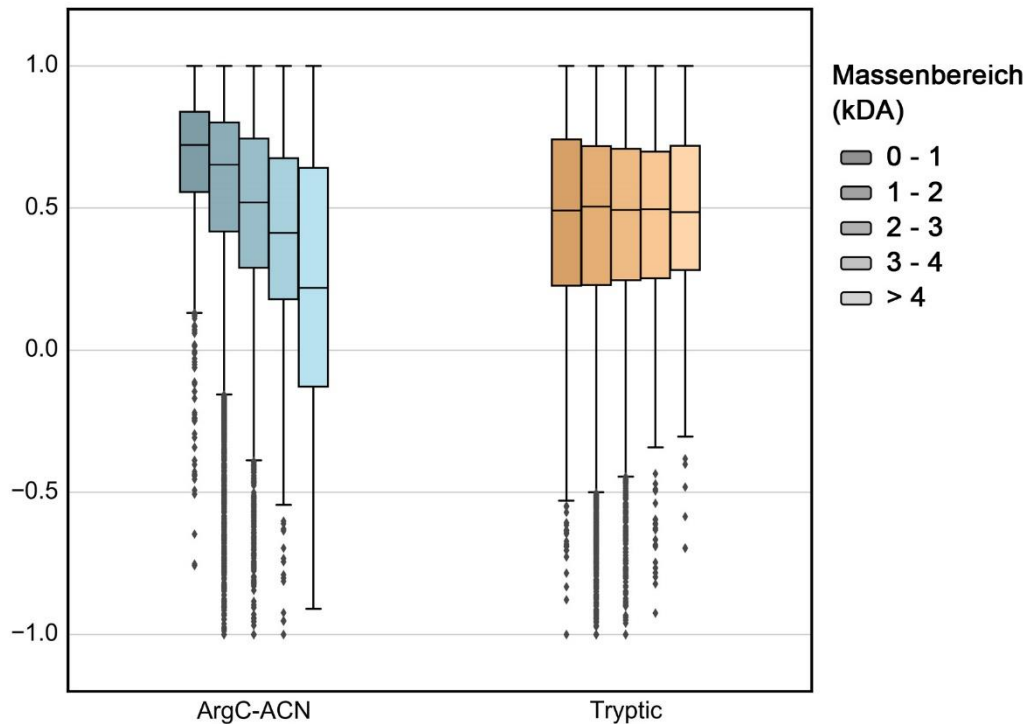


Abb. 5.36: Überschüsse der y-Fragmentionen nach Massenbereich

Aus Abb. 5.36 wird deutlich, dass sich die Überschüsse an y-Fragmentionen nach ArgC-analogenem und tryptischem Verdau stark unterscheiden. Die Median der Werte für Trypsin liegt dabei konstant bei 0,5 und 50 % der Werte befinden sich zwischen 0,75 und 0,25. Der ArgC-analoge Ansatz hingegen zeigt eine Abnahme der Überschüsse mit zunehmender Peptidgröße. Die augenscheinliche Verschlechterung der Fragmentierung erweist sich jedoch als signifikante Verbesserung, sobald die tatsächliche Zahl der Vorläuferionen in den entsprechenden Massenbereichen berücksichtigt wird: Der Bereich von 0-3 kDa, in dem eine Verbesserung des y-Ionenüberschusses gegenüber dem tryptischen Protokoll erreicht wurde, deckt gleichzeitig 97,69 % aller zugewiesenen Vorläuferionen ab (vgl. Tab. 5.14). Es lässt sich somit feststellen, dass ArgC-analoge Peptide mit Propionylierung am Lysin ein schlechteres Fragmentierungsverhalten oberhalb von 3 kDa zeigen, die signifikante Verbesserung in den unteren Massenbereichen den negativen Effekt jedoch deutlich überwiegt.

5.7.5.2 Intensity Coverage

Die zuvor erwähnte Erhöhung der Intensitätsabdeckung (*Intensity Coverage*, IC), d.h. dem Quotienten aus gemessenen Signalintensitäten, die bei der Datenbanksuche den vorhergesagten Fragmentationen zugewiesen wurden, und den Gesamtintensitäten im MS/MS-Spektrum, soll hier erneut untersucht werden. In Abb. 5.37 A ist eine insgesamt leicht erhöhte Coverage beobachten, verglichen mit der Durchführung auf NHS-Beads (Abb. 5.37 B). Gründe dafür sind vermutlich u.a. die insgesamt verbesserte Leistung des Verdauers auf Silicabeads sowie der längere Gradient während der chromatographischen Trennung. Dies erklärt allerdings nicht den überproportionalen Anstieg der Abdeckung unter Verwendung des ArgC-analogen Ansatzes.

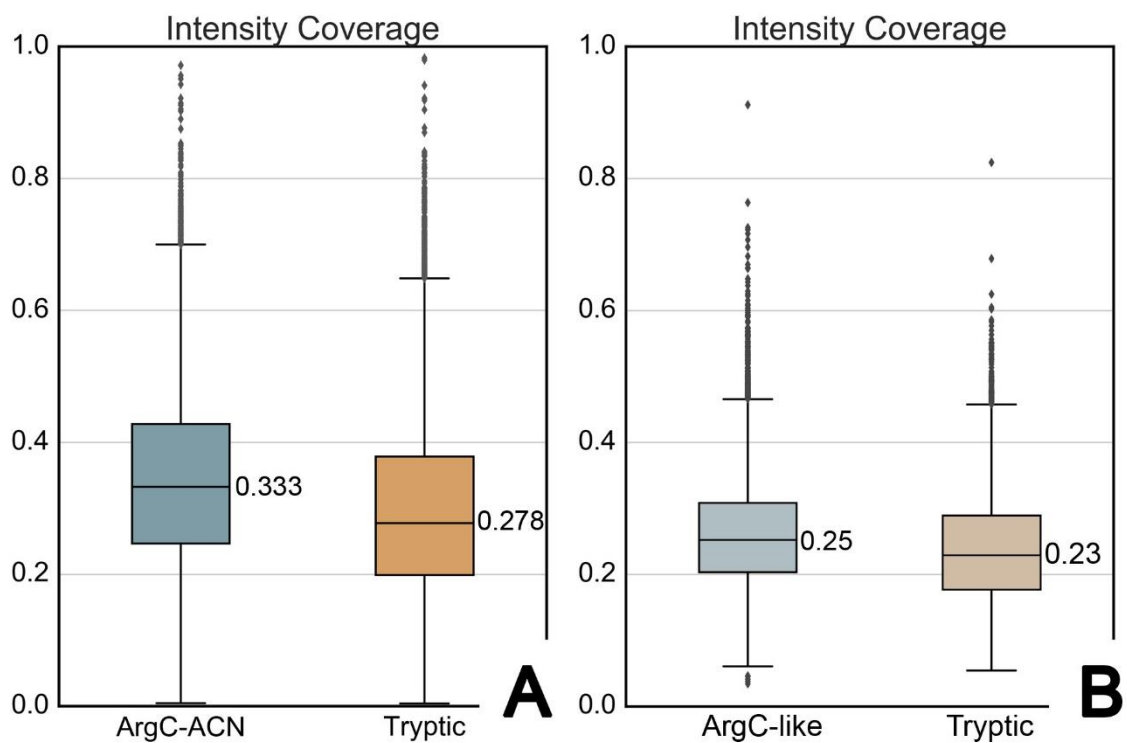


Abb. 5.37: Intensity Coverage mit Berücksichtigung des Neutralverlusts in (A) und ursprüngliche Verteilung aus Dissertation V. Golghalyani (modifiziert) (B)

Nach Beschreibung des Neutralverlusts von 140 Da bei der Fragmentierung propionylierter, lysinhaltiger Peptide durch Schröder et al.⁴⁹ wird dieser bei der Datenbanksuche im Zuge dieser Arbeit als bekannt hinterlegt (siehe 4.6.2.2) und damit die Interpretation als nicht zuzuweisendes Signal im Massenspektrum verhindert. Dies hat Einfluss auf die Berechnung der IC, da diesem Quotienten die Zahl nicht-zugewiesener Peaks zugrunde liegt. Die korrigierte Intensity Coverage aus dem ArgC-analogen Verdau zeigt die in Abbildung 5.37 A dargestellte Werteverteilung. Diese unterscheidet sich signifikant von der praktisch identischen Verteilung nach tryptischem und ArgC-analogen Verdau in der ursprünglichen Etablierung der Methode (Abb. 5.37 B). Dabei ist eine deutliche Anhebung des Medians und der oberen und unteren Quartile ersichtlich, so dass das *ArgC-like* Protokoll statistisch gesehen „sauberere“ Fragmentationsspektren produziert. Der Einfluss des Neutralverlusts auf die Intensitätsabdeckung sollte nach dieser Erkenntnis bei der Datenbankanalyse ArgC-analog verdauter Proben stets berücksichtigt werden.

5.7.6 Zusammenfassung und Diskussion

Mit der Auswertung dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass der ArgC-analogen Verdau komplexer Proben auf Silicabeads direkt aus dem Lysat mit Harnstofflösung durchgeführt werden kann. Eine mögliche Carbamylierung der Lysine durch Urea wurde ausgeschlossen. Erstmals konnten im Vergleich mit dem konventionellen, tryptischen Ansatz mehr Proteine aus einem humanen Proteom identifiziert werden, von denen überproportional viele Exemplare als Membranproteine und Histone erkannt wurden. Ein Bias hinsichtlich spezieller physikochemischer Eigenschaften der Proteine oder Peptide wurde ausgeschlossen, so dass die Verbesserung der Identifikationszahlen als eindeutig und ohne Nachteil betrachtet werden kann. Das Fragmentierungsverhalten ArgC-analoger Peptide führt zu klareren Serien von γ -Ionen und liefert eine höhere Intensitätsabdeckung. Im Kontrast zu den genannten Vorteilen ist - abgesehen von dem zusätzlichen Reaktionsschritt der Propionylierung - kein Nachteil gegenüber dem tryptischen Verdau zu erkennen. Die Verwendung des ABP in Kombination mit dem ArgC-analogen Verdau kann insgesamt als eindeutige Verbesserung des letzteren gewertet werden, da – zusätzlich zu den oben genannten Fortschritten – ebenfalls Arbeitsaufwand und Kosten minimiert werden konnten.

5.8 Limits des adsorptionsbasierten Protokolls

5.8.1 Hintergrund

Bisher wurde das ABP für proteomische Proben im Größenbereich von 50 – 100 µg eingesetzt. Zur Ermittlung der unteren Grenze, bis zu der die Leistung erhalten bleibt, wurde ein „downscaling“ Experiment entworfen und Triplikate der Ansätze in Tabelle 5.15 untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Verdünnungen eines Zell-Lysats (HEK 293T) erstellt, nachdem der Proteingehalt pro mL mittels BCA Assay ermittelt wurde. Silicabeads in Suspension wurden zur Inkubation bei pH 4 in entsprechender Menge hinzugefügt. Reduktion/Alkylierung erfolgte mit Verdünnungen der Stocklösungen (siehe 4.1.2.2) von DTT und IAA unter gleichen Bedingungen. Trypsin wurde jeweils im Verhältnis Protein/Protease 100:1 zum Verdau eingesetzt.

Tab. 5-15: Downscaling Ansatz

Protein (µg)	Beads (µL)	Gefäß
100	10	Eppendorf Tube 1.5 mL
50	5	Eppendorf Tube 1.5 mL
5	1*	Eppendorf Tube 0.5 mL
1	0.2**	PCR Tube
0.1	0.2**	PCR Tube

* = Stocklösung (40 mg/mL) / 10

** = Stocklösung / 100

Chromatographische Trennung und MS/MS-Analyse erfolgten mit dem Setup wie in 4.5.2.2 beschrieben mit einem HPLC Gradienten von 1.5 h. Zur Auswertung wurden die raw-Dateien in das MZML-Format konvertiert und eine Datenbanksuche via Mascot durchgeführt. Die erhaltenen dat-Dateien wurden zusammen mit den MZML-Dateien über KNIME ausgewertet. Bestimmt wurden die Identifikationen der einzelnen Triplikate, deren Mittelwert, sowie deren kombinierte Identifikationszahl.

5.8.2 Einfluss auf Identifikationszahlen

Abb. 5.38 zeigt die durchschnittlich identifizierte Anzahl Proteine als durchgezogene und die Summe der Identifikationen aus den Triplikaten (kombinierte Identifikationszahl) als gestrichelte Linie dargestellt. Peptide mit einem Percolator-korrigierten Ionenscore unter 13 wurden nicht zur Proteinidentifikation miteinbezogen.

Deutlich zu sehen ist der Bereich, in dem das ABP ohne große Verluste für kleinere Ansätze verwendet werden kann: Definiert man die Identifikationen erhalten bei 100 μg Proteom als 100 %, sind bei der halben Ausgangsmenge noch 94,3 % und bei einem Zwanzigstel bzw. 5 μg noch 83,8 % der Identifikationen zu erreichen. Zudem sind in diesem Bereich die Standardabweichungen sehr gering, sodass eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet ist. Das spiegelt sich zusätzlich in den kombinierten Identifikationen wider, die je 20 % oberhalb der durchschnittlich erhaltenen Identifikationen pro Triplikat liegen, sodass selbst bei 5 μg noch eine sehr gute Leistung gegeben ist (siehe auch 5.5.2). Abgesehen von der zunehmenden praktischen Herausforderung, die Probenvorbereitung im unteren Mikro- bis Nanogramm Bereich durchzuführen, stößt auch das ABP unterhalb von 5 μg an seine Grenzen.

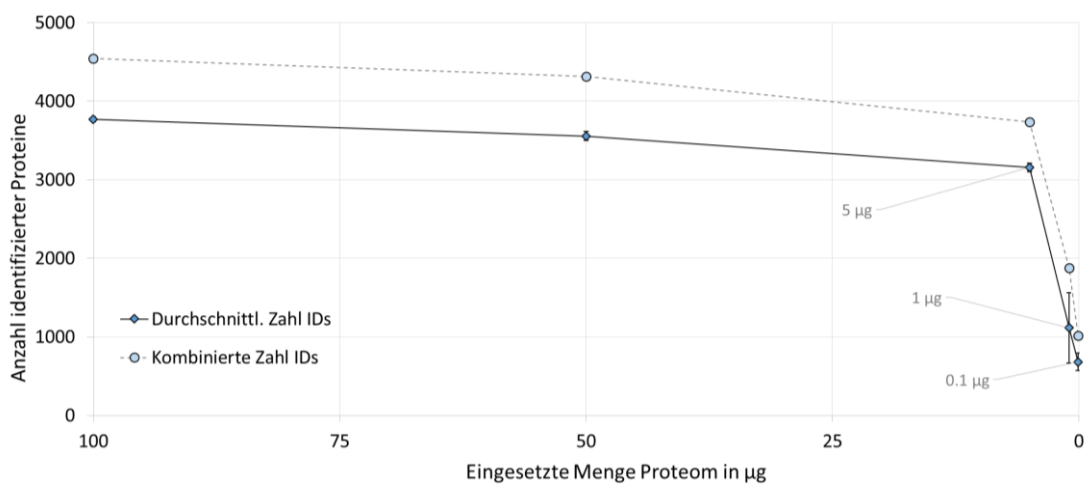


Abb. 5.38: Darstellung der Abhängigkeit der von der eingesetzten Probenmenge. Identifikationszahlen (durchschnittlich und insgesamt)

5.8.3 Zusammenhang zwischen Identifikationszahl und Abundanz

Unterhalb von 5 µg fällt die Zahl der sicher ermittelten Proteine stark ab, da vermutlich weniger Proteine von niedriger Abundanz detektiert werden können. Im Umkehrschluss folgt daraus, dass der relative Anteil hochabundanter Proteine mit sinkenden Identifikationszahlen steigen sollte.

Um dies zu überprüfen, wurde der NSAF Wert (siehe 2.5.1) separat für alle Proteine aller Triplikate ermittelt, zu einer Liste zusammengeführt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet. Zur Korrelation mit den Identifikationszahlen wurden auch diese gemittelt und in Abb. 5.39 in ihrem exponentiellen Zusammenhang dargestellt. Mit sinkenden Identifikationszahlen steigt somit die durchschnittliche Abundanz. Da bisher nur die Mittelwerte betrachtet wurden, zeigt Abb. 5.40 die Verteilung der NSAF Werte pro eingesetzter Probenmenge. Hier zeigt sich eine zunehmende Verteilungsverschiebung in höhere Bereiche mit einer Reduktion der Menge an Ausgangsprobe.

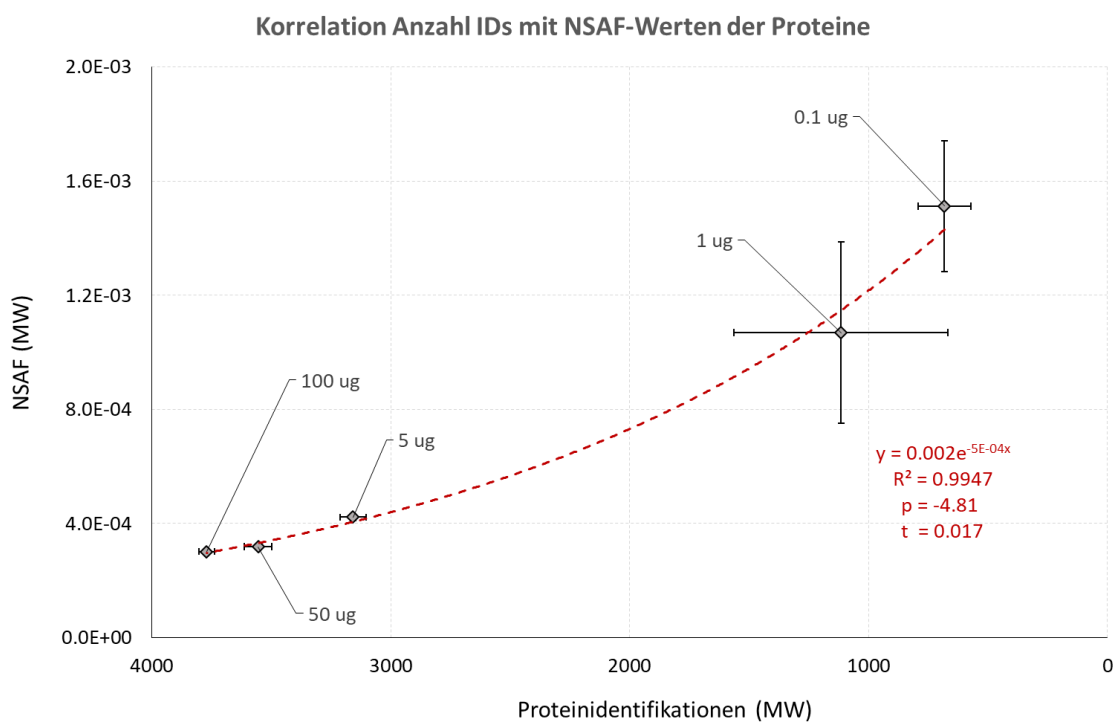


Abb. 5.39: Zusammenhänge zwischen Identifikationen, eingesetzter Probenmenge und Protein-Abundanz

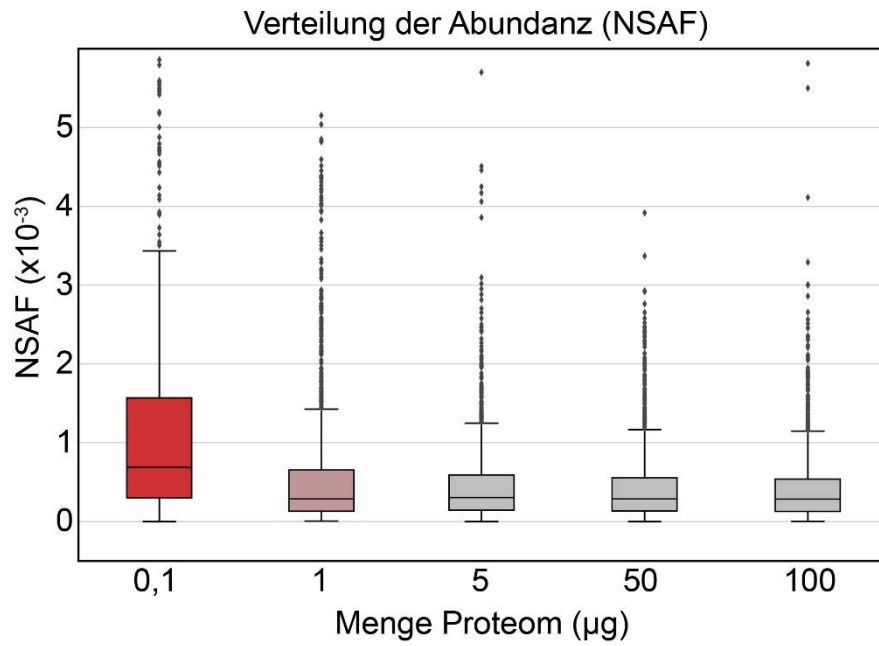


Abb. 5.40: Boxplots der NSAF-Werte in Abhängigkeit der eingesetzten Probenmenge

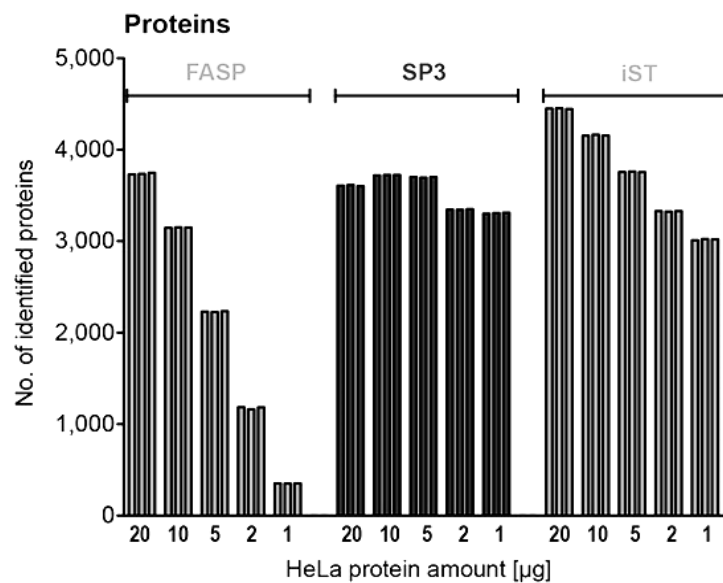


Abb. 5.41: Vergleich von FASP, SP3, iST hinsichtlich Protein IDs
(Abbildung aus Sielaff et. al.³⁸)

5.8.4 Diskussion

Die Limitationen der Probenvorbereitung mittels ABP zeigen sich deutlich in Form des Probenverlusts. Bei jedem Kontakt der Probenlösung mit einer neuen, nicht-gesättigten Oberfläche ist von einem absoluten Verlust auszugehen, der trotz Verwendung kleinerer Gefäße und Pipettenspitzen für geringe Probenmengen, sich als nicht trivial erweist. Bei der Verwendung geringerer Ausgangsmengen resultiert dieser in einem hohen relativen Verlust, durch den die zur Detektion nötige Minimalkonzentration vieler niedrig-abundanter Proteine unterschritten wird. Zusätzlich leidet beim Einsatz geringer Probenmengen die Reproduzierbarkeit, wie an den stark steigenden Standardabweichungen ersichtlich wird. Es empfiehlt sich daher, die empirisch ermittelte Untergrenze von 5 μg humanen Proteoms nicht zu unterschreiten.

Im Vergleich zu aktuellen Verfahren der Probenvorbereitung zeigt ABP eine hohe Effizienz. Die Verwendung von iST nach Kulak et al. wurde mit Verwendung von 10-20 μg proteomischen Ausgangsmaterials veröffentlicht, Anwendbarkeit wird dabei bis zum sub-Mikrogramm angegeben, Identifikationszahlen in diesem Bereich relativ zu den höheren Mengen sind nicht vorhanden¹³⁶. In einem Vergleich von FASP, SP3 und iST durch Sielaff et al. zeigen sich unterschiedliche Leistungen dieser Protokollen über eine Spanne von 20-1 μg ³⁸. FASP schneidet sowohl in den maximalen als auch minimalen Identifikationszahlen am schwächsten ab. SP3 ermöglicht die meisten Identifikationen im 1 μg Bereich, erreicht aber nicht die Höchstleistung, die durch iST vorgegeben wird (Abb. 5.41). Die absoluten Zahlen lassen sich hier nicht direkt auf ABP übertragen, auch wenn sie sich in einem fast identischen Bereich befinden, da sich Lyse und LC-MS/MS Setup unterscheiden. Dennoch bestätigt die Evaluation die Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich mit FASP (siehe Kapitel 5.5), die Leistung der beiden anderen Methoden scheint der ABP Methode im niedrigen μg Bereich überlegen zu sein. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass zur besseren Vergleichbarkeit kein ArgC-analoger Verdau stattgefunden hat, der das Potential der Silicabeads signifikant verbessert.

5.9 Simultane Proteinmodifikation

Die, in Kapitel 5.8 bestätigte Vermutung trotz der Immobilisierung der Proteine einen Verlust im Zuge der Probenvorbereitung geringerer Ausgangsmengen zu erleiden wirft die Frage auf, inwieweit sich die Zahl der zu identifizierenden Proteine im oberen Bereich beeinflussen lässt, wenn der Probenverlust weiter minimiert wird. In frühen Versuchen bewiesen sich TCEP und Chloracetamid (CIAA) als zuverlässige Alternativen zu DTT und IAA, welche zudem nach Kulak et al. zur simultanen Reduzierung/Alkylierung eingesetzt werden können¹³⁶.

Gesetzt den Fall, dass zusätzlich die Propionylierung der Lysine mittels PA als dritte, parallel ablaufende Reaktion stattfinden könnte, ließe sich die Probenvorbereitung nicht nur signifikant verkürzen, sie würde auch die Anzahl der, mit der Probenlösung in Kontakt tretenden Oberflächen drastisch reduzieren.

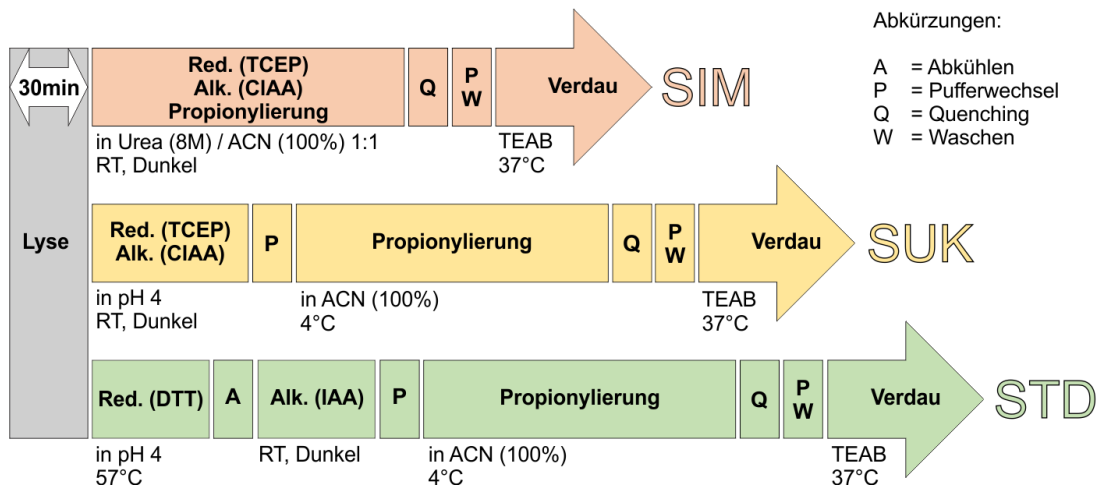


Abb. 5.42: Timelines der zu vergleichenden Methoden.

Die Länge der Segmente entspricht der Dauer des Arbeitsschritts - Unterbrechungen entsprechen einem manuellen Eingriff

5.9.1 Versuchsaufbau

In einem Experiment soll das bisherige Standardverfahren (STD) zum ArgC-analogen Verdau (siehe 4.2.7) mit einer semi-sukzessiven Modifikation (SUK) und einer komplett simultan stattfindenden (SIM) Variante verglichen werden. Dazu wurden drei Sets Triplikate aus HEK 293T Zell-Lysat zu je 50 µg Protein erstellt und der Probenvorbereitung gemäß Abb. 5.42 unterzogen (siehe auch 4.2.8). Der Verdau erfolgte mit Trypsin im Verhältnis 1:100 zur Ausgangsmenge Protein. Nach Aufreinigung über StageTips (siehe 4.2.10.1) wurden die Eluate entsprechend 4.2.10.3 eingetrocknet und mit dem HPLC-MS/MS Aufbau aus 4.5.2.2 bei einem Gradienten von 1,5 h analysiert.

5.9.2 Auswertung

Die Prozessierung der Dateien sowie die Datenbanksuche mit Mascot wurden analog zu Kapitel 5.7 durchgeführt.

5.9.3 Proteinidentifikationen

Gelistete Peptide mit einem Percolator-adjustierten Ionscore < 13 wurden nicht zur Auswertung herangezogen und von der Peptidliste exkludiert. Die Zahl der sicher identifizierten Proteine sowie deren Peptide sind in Abbildung 5.42 dargestellt und detailliert in Tabelle 5.16 gelistet.

Es zeigt sich eine Erhöhung der Identifikationen bei simultaner Proteinmodifikation um 18,3 % gegenüber der Standardmethode bei Proteinen und 48,4 % bei Peptiden. Im Gegenzug dazu verschlechtert sich die False Discovery Rate leicht im simultanen Ansatz.

Tab. 5-16: Identifikationen und FDR

Protokoll	IDs (kombiniert)		FDR Peptide	MW (IDs)		Abdeckung ID (MW/Ges)
	Proteine	Peptide		Proteine	Pep./Prot.	
SIM	3143	10975	0.34%	2404.33	3.49	76,5 %
SUK	2919	9145	0.29%	2199.00	3.13	75,3 %
STD	2657	7397	0.23%	1998.67	2.78	75,2 %

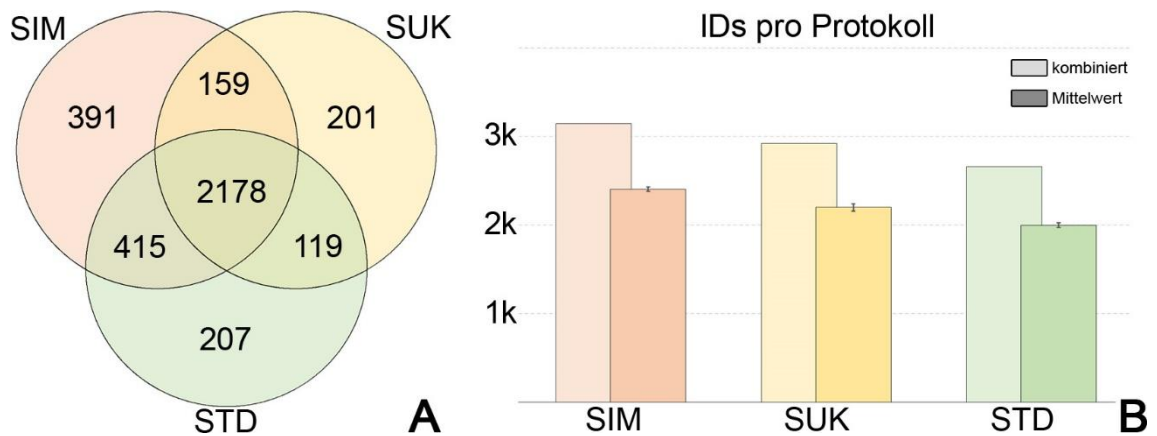


Abb. 5.43: IDs der Ansätze als Venn-Diagramm (A) und im Mittel pro Replikat (B)

Abbildung Abb. 5.43 A veranschaulicht die Identifikationszahlen als Venn-Diagramm mit hoher Überschneidung bei gleichzeitig klarer Überlegenheit des SIM-Protokolls. Die Standardabweichungen zwischen den Triplikaten sind äußerst gering, sodass sich die Ergebnisse auf eine hohe Reproduzierbarkeit stützen (Abb. 5.43B).

Auch der Probenverlust erscheint systematisch und reproduzierbar, betrachtet man die Differenz zwischen SIM und STD.

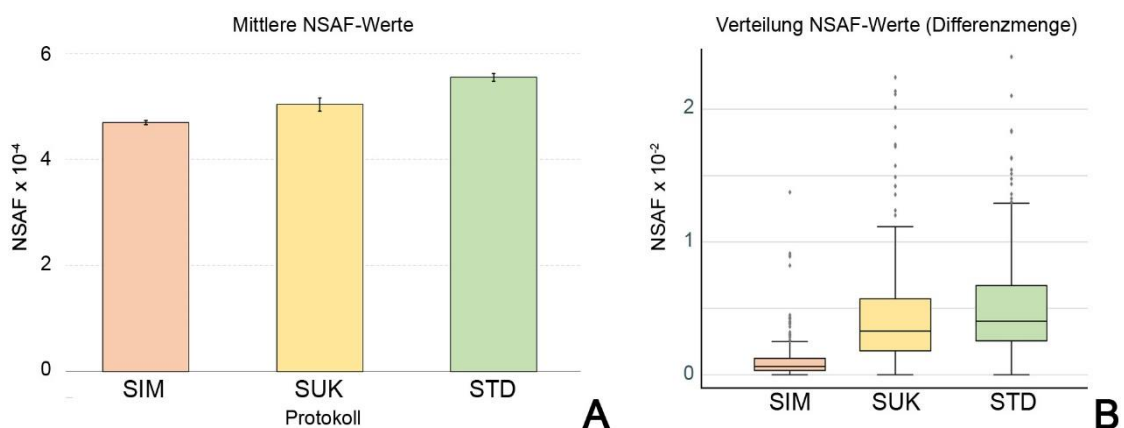


Abb. 5.44: NSAF-Werte im Vergleich

Mittelwerte pro Protokoll (A),

Boxplot-Verteilung der NSAF-Werte der Protokoll-exklusiven Proteine (B)

5.9.4 Zusammenhang zwischen Abundanz und Identifikationszahl

Zur Bestätigung dieser These wurde erneut der NSAF-Wert im Mittel errechnet, welcher sich als Säulendiagramm dargestellt exakt gegenläufig zur Zahl der Identifikationen verhält (Abb. 5.44 A). Demnach können durch simultane Proteinmodifikation vermehrt niedrig-abundante Proteine noch sicher identifiziert werden. Um dies zu veranschaulichen, wurden die Proteine, die exklusiv nur mit einem der Protokolle identifiziert wurden, mittels KNIME aus der Peptidliste ermittelt. Eine erneute Kalkulation der NSAF-Werte in dieser vorsortierten Gruppe ergab eine in auffällig unterschiedlicher Verteilung (Abb. 5.44 B). Proteine, die nur aus Proben der Simultanpräparation ermittelt werden konnten, sind fast ausschließlich solche mit sehr niedriger Abundanz im Proteom.

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in den Identifikationszahlen nicht zusätzlich im Zusammenhang mit ihren physikochemischen Eigenschaften stehen, wurden diese analog zu vorherigen Experimenten ermittelt, ohne signifikante Unterschiede feststellen zu können. Exemplarisch dafür steht Abb. 5.45.

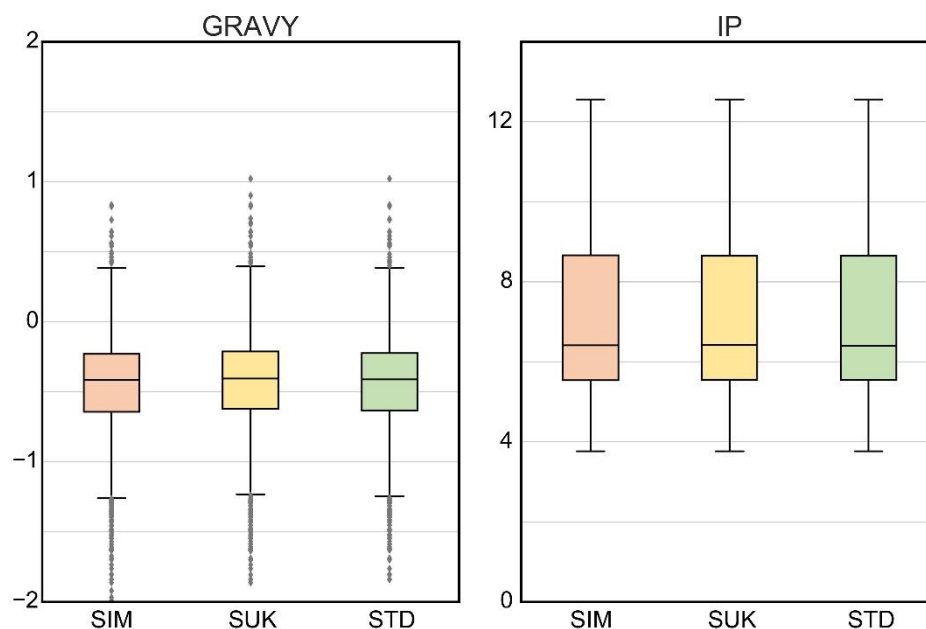


Abb. 5.45: Verteilung von GRAVY Score und IP der identifizierten Proteine

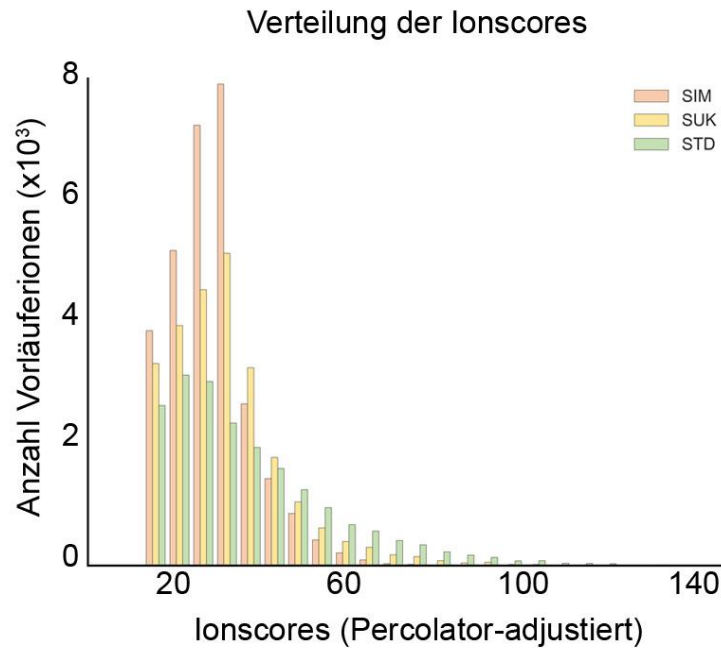


Abb. 5.46: Absolute Ionscore-Verteilung der drei Präparationsansätze

5.9.5 Ionscores

Die Ionscores für die Protokolle im Vergleich sind in Abb. 5.46 als Histogramm dargestellt und zeigen deutliche Unterschiede in der Verteilung. Da keine Korrelation zwischen Ionscore und Abundanz des Ursprungsproteins festgestellt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass das Signal-Rausch-Verhältnis bei simultaner Proteinmodifikation beeinträchtigt ist¹⁰⁷. Wie bereits in Tabelle 5.16 dargestellt, ist die Zahl der sicher zugewiesenen Peptide im Falle des Simultanprotokolls sogar deutlich erhöht, daher ist die Peptidzuweisung offenbar nicht beeinträchtigt. Zusätzliche Sicherheit bei der Proteinidentifikation liefern die im Mittel zusätzlichen 0,7 Peptide, die pro Protein identifiziert werden konnten (Tab. 5-16). Die FDR zeigt eine leichte Verschlechterung, jedoch ist selbst die erhöhte Rate noch deutlich unter dem Minimum von 1,0 %. Damit bleiben die niedrigeren Ionscores ohne signifikanten Effekt.

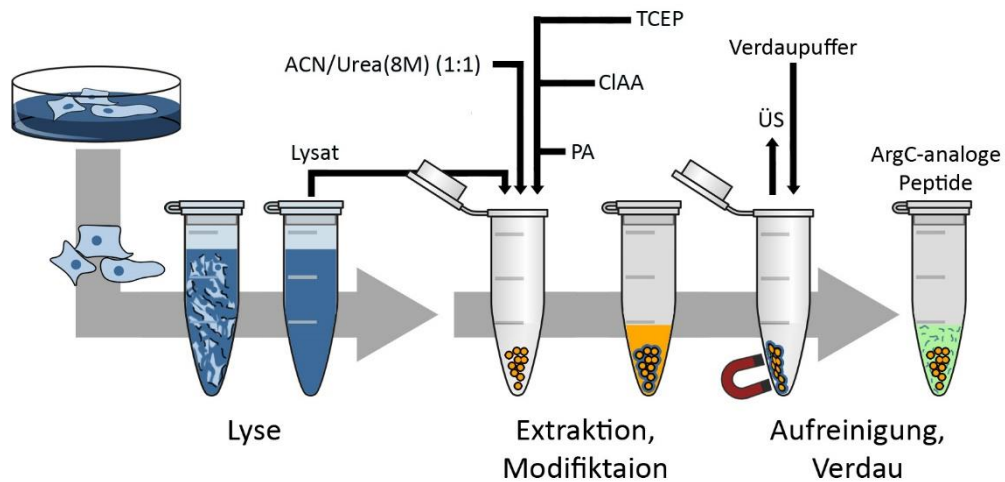


Abb. 5.47: Verkürztes Protokoll für den ArgC-analogen Verdauung mit simultaner Modifikation

5.9.6 Diskussion

Als finale Anpassung des adsorptionsbasierten Protokolls für den ArgC-analogen Verdauung konnte hier nicht nur die Dauer der Probenvorbereitung vor dem proteolytischen Verdauung halbiert werden, sondern auch ein Gewinn an identifizierten Proteinen verzeichnet werden. Dabei handelt es sich vornehmlich um niedrig-abundante Spezies, deren Detektion überproportional stark abhängig ist von der verfügbaren Ausgangsmenge (Vgl. 5.8.3). Der Verlust dieser Probenmenge durch wiederkehrenden Kontakt mit neuen Oberflächen konnte durch die simultane Modifikation des Proteoms signifikant verringert werden. Einen theoretischen Nachteil stellen die erniedrigten Ionscores dar, deren Ursache vermutlich in weniger „sauberen“ Spektren zu finden ist. Da jeder Mediums- oder Pufferwechsel in der Probenvorbereitung äquivalent zu einem Waschschrift zu betrachten ist, sind Zellrückstände und andere Verunreinigungen bei sukzessiver Modifikation ggf. leichter zu entfernen. Diese Beobachtung bleibt jedoch ohne messbare Konsequenz auf die Ergebnisse. Zusammenfassend ist das simultane Durchführen von Reduzierung, Alkylierung und Propionylierung von eindeutigem Vorteil und ist als neues Standardverfahren für den ArgC-analogen Verdauung zu empfehlen.

Diskussion

6 Diskussion

6.1 Ergänzende Diskussion

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Ergebnisse am Ende der einzelnen Kapitel interpretiert und deren Implikationen diskutiert. Ergänzend soll hier noch einmal der übergreifende Zusammenhang zwischen Proteinadsorption und deren pragmatischen Verwendung im Sinne dieser Arbeit hergestellt werden.

Das Phänomen der Proteinadsorption kann zweifelsohne als Leitmotiv dieser Arbeit angesehen werden: Beginnend als eine Unannehmlichkeit in der Proteinanalytik, dann als ursprünglich nicht intendierter Bindemechanismus auf Silicapartikeln nach Dr. Moritz Neupärtl, anschließend in dieser Arbeit als Werkzeug zur Extraktion aus Zell-Lysaten sowie als Basis für den ArgC-analogen Verdau nach Dr. Vahid Golghalyani, aber auch als Limitation der entwickelten Methode und abschließend als neue Gelegenheit zur Optimierung durch Reduktion der Oberflächenexposition.

In der Natur zeigt sich Proteinadsorption in vielerlei Formen, wie z.B. in lebenswichtigen Vorgängen der Adhäsion und Signaltransduktion^{137,138}, aber auch Fäulnis- und Infektionsprozessen¹³⁹. Auch im medizinischen Alltag sind Proteinadsorptionen eine Herausforderung¹⁴⁰. Damit ist die Adhäsion von Proteinen an diverse Oberflächen Grundlage vieler Forschungsarbeiten. Einflussfaktoren auf die zugrundeliegenden Mechanismen sind ausführlich untersucht und beinhalten unter anderem Temperatur²⁹, pH-Wert bzw. IP¹⁴¹, Porosität und funktionelle Gruppen der Oberfläche^{142–144}, Salzkonzentrationen^{145,146}, chaotrope Reagenzien¹²¹, Detergenzien¹⁴⁷, Proteinkonzentration¹⁴⁸ und -konformation^{28,149,150}, Inkubationszeit²⁸ und Zusammensetzung des Proteingemischs²⁹.

Die meisten dieser Faktoren waren auch in der Entwicklung des adsorptionsbasierten Protokolls von großem Nutzen. Im Gegensatz zu den meisten Publikationen in diesem Gebiet, die das Phänomen entweder neutral beschreiben oder als unerwünschten, zu vermeidenden Effekt betrachten, ist das Ziel hier die Adsorption zu maximieren und eine Desorption im Verlauf der Probenvorbereitung zu vermeiden.

Viele der denaturierenden Prozesse senken dabei die Solubilität der Proteine und begünstigen somit deren Adsorption an eine gegebene Oberfläche. Ausnahmen bilden hier Substanzen, die gleichzeitig denaturieren und die Löslichkeit erhöhen, zu denen v. A. Harnstoff und Tenside zählen. Das bestätigt sich in den hier erhaltenen Resultaten, insofern,

dass Harnstoff den Adsorptionsprozess leicht und SDS massiv einschränkt¹²⁰. Die Beeinflussung durch Harnstoff gestaltet sich erwartungsgemäß konzentrationsabhängig und kann durch zusätzliche Denaturierung und Modifikation vollständig aufgehoben werden. Daher ist die Beobachtung, dass auch zusätzliche chemische Modifikation der Lysine und der Einsatz unterschiedlichster Temperaturen die Proteinextraktion nicht negativ bzw. deutlich positiv beeinflusst, im Einklang mit den Theorien der ungerichteten Adsorption. Diese Vorgehensweise steht dabei in Kontrast zu der unbeeinflussten Adsorption, wie sie meist in der Literatur beschrieben ist (Abb. 6.1), bei der das Protein seine Stabilität durch Disulfidbrücken teilweise behält und Gegenionen und Hydrathülle die Adsorption beeinflussen können¹⁵¹.

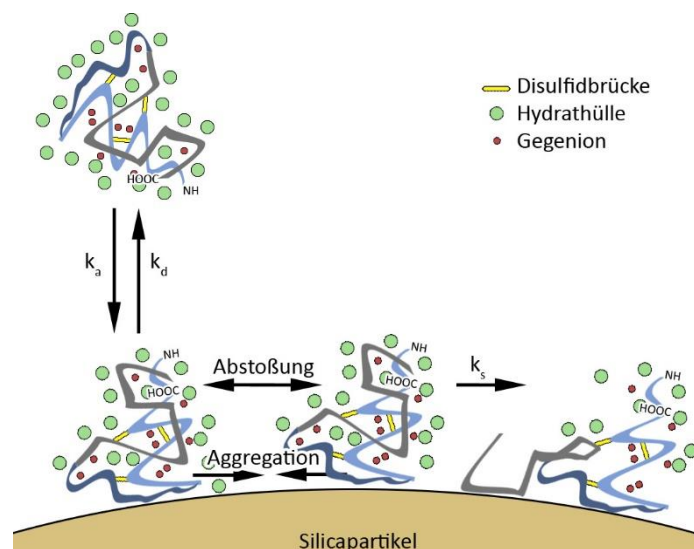


Abb. 6.1: Proteinadsorption an Silica ohne aktive Denaturierung
(Abbildung nach Stutz, mit Anpassungen¹⁵¹)

Postuliert werden kann daher eine angepasste Darstellung, die die Reduktion der Disulfidbrücken, die Senkung der Hydrophilie durch Carbamidomethyl- und Propionylreste und die (teilweise) Entfernung der Hydrathülle durch den Einsatz organischer Lösungsmittel berücksichtigt. Der zunehmende Einfluss auf die Adsorptions- (k_a) bzw. Desorptionsrate (k_d) sowie die, zur Irreversibilität führende, geschwindigkeitsbestimmende Rate der Konformationsänderung (k_s) wird darin veranschaulicht (Abb. 6.2). Nicht dargestellt sind die signifikant vermehrt auftretenden Oxidationen am Methionin bei der Verwendung von Silicabeads, deren zusätzlich denaturierender Effekt bereits im entsprechenden Kapitel diskutiert wurde.

Die Synergie des ArgC-analogen Verdaus mit dem adsorptionsbasierten Ansatz der Proteinimmobilisierung ist daher nicht nur in dem verbesserten Fragmentierungsverhalten seiner Peptide, sondern ebenfalls in der zusätzlichen Denaturierung und Senkung der Hydrophilie zu suchen. Eine ähnliche Begründung ist für die disproportional erhöhte Zahl identifizierter Membranproteine zu vermuten, da diese durch ihre geringe Wasserlöslichkeit inhärent eine hohe Affinität zur Oberflächenadsorption zeigen¹⁴.

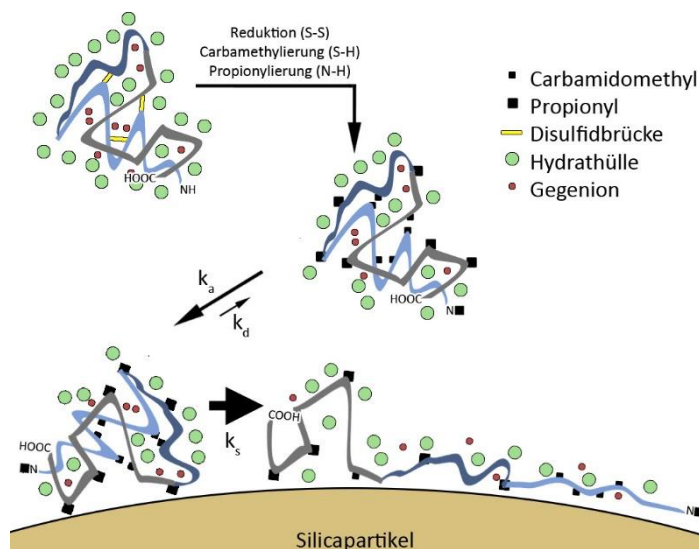


Abb. 6.2: Proteinadsorption mit chemischer Denaturierung und Modifizierung

Durch diesen Ansatz sind bereits die meisten der Einflussfaktoren auf die Adsorption zugunsten der Extraktion steuerbar. Durch die aktive Denaturierung der Proteine sind Konformation und Rigidität leicht aufzubrechen, die Oberfläche der Proteine vergrößert sich zusätzlich. Detergenzien können gänzlich vermieden, der chaotrope Effekt von Harnstoff aufgehoben werden. Mit den gewählten, porösen Silicapartikeln ist eine große Oberfläche seitens des Sorbens gewährleistet. Die Zeitabhängigkeit der Adsorption wurde im entsprechenden Kapitel diskutiert und eine ausreichende Inkubationszeit kann bereits durch die Dauer der Modifikation gewährleistet werden.

Die ursprünglich bei pH 4 durchgeführte Immobilisierung würde einen Zusammenhang zu den isoelektrischen Punkten der identifizierten Proteine erwarten lassen, da Löslichkeitsbedingung für die Adsorption in der Nähe des IP ein Maximum beschrieben wurde¹⁴⁸. Ein solcher konnte jedoch nicht festgestellt werden, sodass die Vermutung nahe liegt, dass dessen Einfluss ebenfalls durch die Denaturierung minimal ist. In Anbetracht der Anpassung des ABP mit simultaner Modifikation in ACN/Urea ohne dezidierte Einstellung pH-Wertes, erübrigt sich dieser Punkt gänzlich.

Sowohl die erniedrigten Identifikationen bei Verwendung geringer Ausgangsmengen in kleineren Ansätzen, als auch die Verbesserung der Methode bei simultaner Probenmodifikation weisen auf einen persistierenden Probenverlust durch Proteinadsorption hin.

6.2 Ausblicke

Im Vergleich zu den Ergebnissen des SP3 Protokolls (Abb. 5.41), welches keinen Leistungseinbruch bei Proteinmengen unter 5 µg erleidet, ist ein wichtiger Unterschied die Größe der paramagnetischen Beads⁶. Wie in den ersten Kapiteln dieser Arbeit ersichtlich, sind die Silicapartikel mit einer mittleren Durchmesser 1 µm von relativ hoher Korngrößenverteilung. Damit ist die mögliche Bildung eines Co-Sorbats in Betracht zu ziehen, bei der Proteine samt assoziiertem Silicapartikel durch Adsorption an Gefäßwände und Pipettenspitzen aus der Probe entfernt werden könnten. Diese Fehlerquelle sollte allerdings durch die Verwendung größerer Beads mit schmalere Korngrößenverteilung zu minimieren sein.

Eine Quantifizierungsmethode nach ArgC-analogen Verdau wurde bereits als Silent-SILAC beschrieben und basiert auf der Bildung eines für propionylierte Lysine charakteristischen Fragmentions. Neben dieser originellen Methode von Schröder et al.⁴⁹ ist die direkte relative Quantifizierung durch die ohnehin eingeführte, chemische Modifikation des Propionylrests durch Verwendung leichten und schweren Propionsäureanhydrids möglich. Bei Einsatz deuterierten PAs wird somit eine Massenverschiebung von 5 Da je eingeführter Modifikation erreicht.

Exemplarisch wurde die Signalintensität eines leicht und eines schwer gelabelten Peptids korreliert um die potentielle Quantifizierung darüber zu bestätigen (siehe Anhang 1). Problematisch bei deuterierten Labels ist jedoch einerseits der sukzessive Austausch der Deuterium- durch Wasserstoffatome^{152,153} aber auch das unterschiedliche Retentionsverhalten in der Flüssigchromatographie^{154,155}.

Damit bieten beide Elemente des Verfahrens, sowohl der adsorptionsbasierten Aufreinigung als auch des ArgC-analogen Verdau, Potential zur Weiterentwicklung: Zum einen bezüglich der Anwendung für kleinere Probenmengen insbesondere bei simultaner Modifikation, zum anderen im Hinblick auf relative Quantifizierungsoptionen.

7 Zusammenfassung

Im Forschungsgebiet der Proteomik hat sich die Massenspektrometrie als essenzielles Werkzeug etabliert. Zur Probengewinnung und deren Präparation für die chromatographische Trennung und massenspektrometrische Analyse existieren eine Vielzahl von Protokollen, deren Verwendung jedoch unterschiedlichste Vor- und Nachteile mitbringt. Im Idealfall wäre ein solches Protokoll schnell und kostengünstig durchführbar, würde mit hoher Robustheit die Proteine aus den Ausgangszellmaterial quantitativ extrahieren und Probenverluste auf ein Minimum beschränken. Ziel dieser Arbeit war es, in einem strukturierten Ansatz sich diesem Ideal zu nähern und mögliche Kompatibilitäten mit anderen Methoden wie dem Arg-C analogen Proteinverdau zu untersuchen. Als Maßstäbe dienen hierbei die aktuellen Standardprotokolle: die Acetonfällung der Proteine mit anschließender Solubilisierung und das FASP-Protokoll, bei dem die zur Proteinprozessierung notwendigen Arbeitsschritte auf einer Größenausschlussmembran stattfinden. Dazu wurde zunächst das Adsorptionsverhalten von Proteinen auf den Silica-Oberflächen paramagnetischer Beads untersucht und dabei insbesondere der Einfluss von Chemikalien zur Zell-Lyse und den im Anschluss verwendeten Reduktions- und Alkylierungsreagenzien analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Proteine aus dem Totalzelllysat sehr effektiv an die Silicaoberfläche binden und dass der Prozess der Reduktion von Disulfidbrücken mit nachfolgender Carbamidomethylierung positiv zur Adsorption beiträgt und negative Einflüsse auf die Immobilisierung negieren kann. Daraus wurde ein Protokoll zur kombinierten Lyse, Aufreinigung, Modifikation und Proteolyse (abgekürzt: ABP) entwickelt. Parallel dazu konnte die Kompatibilität des Protokolls mit dem ArgC-analogen Verdau gezeigt werden und in der Folge konnte die Komplementarität der Methoden erfolgreich getestet werden. Mit frischen Zell-Lysaten wurde der Einfluss der Lysisreagentien unter Einschluss einer kommerziellen Variante ("Bugbuster" Lysis-Puffer) bestimmt und Harnstoff konnte als Mittel der Wahl definiert werden, da mit diesem höhere Identifikationszahlen erreicht wurden, lipophile Proteine vermehrt in der Probe erhalten blieben und größere Ionscores ermittelt werden konnten. Das Potential von ABP wurde im Direktvergleich mit FASP und dem Verdau in Lösung anhand eines humanen Proteoms genauestens untersucht, wobei eine konsequente Verbesserung gegenüber beiden Methoden festgestellt werden konnte, insbesondere im Hinblick auf Praktikabilität und die Zahl der erforderlichen Arbeitsschritte, Reproduzierbarkeit und Zahl der identifizierten Peptide. Ein Bias des ABP zugunsten spezieller Proteineigenschaften konnte nach ausführlicher

Analyse der identifizierten Proteine und Peptide nicht festgestellt werden. Eine vermehrt auftretende Oxidation von Methionin wurde identifiziert, allerdings zeigten sich keine negativen Auswirkungen auf die Proteinidentifizierungen. Zur Unterdrückung potentieller und unerwünschter Nebenprodukte in Form von Methylierungen, die als Folge des ursprünglichen ArgC-analogen Verdaus³⁶ auftreten, wurde mit Verwendung von Acetonitril eine Alternative erfolgreich getestet. Ein humanes Proteom wurde mittels des formulierten Protokolls sowohl tryptisch als auch mit ArgC-analogen Verdau (mit Acetonitril bzw. Methanol) analysiert. In diesem Zusammenhang wurde die Vollständigkeit der Modifikation der Lysine unter Verwendung von ACN mit zufriedenstellenden 99% bestätigt und die unerwünschte Carbamylierung der Aminosäure durch Harnstoff als Lysisreagenz konnte ausgeschlossen werden. Beide Ansätze zum ArgC-analogen Verdau erwiesen sich zudem gegenüber der tryptischen Variante als überlegen, was sich in einer Erhöhung der Identifikationszahlen des humanen Proteoms widerspiegelt. Insbesondere wenig abundante Proteine, Histone und membranassoziierte Proteine bildeten den Großteil der zusätzlich identifizierten Proteine. Zusätzlich konnte ein günstigeres Fragmentierungsverhalten beobachtet werden. Die effektiven Grenzen des ABP im Hinblick auf die erforderliche Proteinmenge wurden untersucht und beschrieben. Der zu erwartende Zusammenhang zwischen abnehmender Proteinmenge und Identifikationszahlen niedrig abundanter Proteine wurde bestätigt und ein effektiver Grenzwert von 5 µg Ausgangsmenge humanen Proteoms ermittelt. Abschließend wurden Dauer und Aufwand der Probenvorbereitung durch Etablierung paralleler Reduktion, Carbamidomethylierung und Propionylierung minimiert und damit zusätzlich Probenverluste reduziert. Die dadurch erreichte Erhöhung der Identifikationszahlen ergab sich wiederum aus der höheren Repräsentanz niedrig abundanter Proteine.

Im Rückblick ist es überraschend, dass die Verwendung der Adsorptionstendenzen von Proteinen bisher keine größere Rolle in der Probenvorbereitung proteomischer Analysen eingenommen hat. Die symbiotisch wirkende, aktive Denaturierung als Resultat der durchgeführten Derivatisierung zur Analysenpräparation macht die Adsorption auf Silica-Oberflächen zum prädestinierten Mittel der Probengewinnung und schafft die Voraussetzung für die erreichte Verkürzung der Arbeitsabläufe und Verbesserung der Ergebnisse.

Anhang

Anhang

Anhang 1: Quantifizierung via Propionylierung

Das artifizielle Peptid AAAAKAAAAR wurde zur Simulierung eines ArgC-analogen Peptids verwendet und an den primären Aminenen des N-Terminus und des Lysins propionyliert. Zur relativen Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe des Peptids mit leichten Tags erstellt und mit einer konstanten Menge schwer gelabelten Peptids gespiked. Die relative Signalintensität ergibt sich daher aus dem Quotienten der beiden Signale.

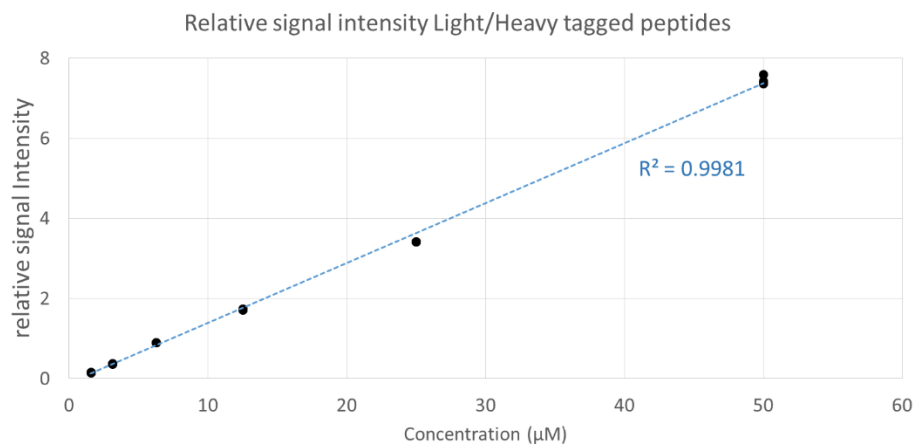


Abb. 0.1: Relative Signalintensität in Abhängigkeit der Peptidkonzentration.

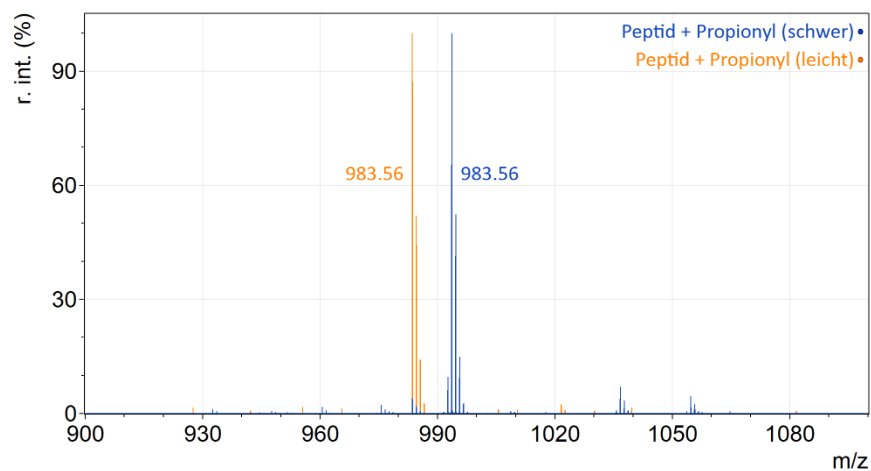


Abb. 0.2: Signale des schwer und leicht gelabelten Peptids bei äquimolarer Konzentration

Anhang 2: Verwendete Geräte

Tab. 0-1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
MALDI LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
ESI LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Dionex Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Tecan infinite 200	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Labormikroskop	Micro Tech, Graz, Österreich
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Roth Tischzentrifuge	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Thermoshaker	Cell Media GmbH und Co KG, Elsterau,
Canon EOS 400D	Canon GmbH, Krefeld
ChemiDoc™ XRS+	BioRad, Hercules, California, United States
PROTEAN GE Kammer	BioRad, Hercules, California, United States

Tab. 0-2 Verwendete Gefäße

Gerät	Hersteller
Eppendorf Tube 0.5 mL	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Tube 1.5 mL	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Tube 2.0 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Greiner Tube 15 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU
Greiner Tube 50 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU
PCR Tubes, domed 0.2 mL	Brand Tech Scientific Inc., USA
Well-Plate (96 wells)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU

Anhang 3: Verwendete Chemikalien

Tab. 0-3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
α-Cyano-4-Hydroxymizsäure	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Aceton	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Acetonitril	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Ameisensäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Brilliantblau G 250	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Butanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Chloracetamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Dithiothreitol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco Phosphate buffered saline	GE Healthcare Europe GmbH, Penzberg
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Guanidin-HCl	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Iodacetamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Picolinboran	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Pierce C18-spin columns	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Propionsäureanhydrid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Propionsäureanhydrid (deuteriert)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
SYPRO Ruby Protein Stain	Invitrogen Ltd, Eugene, Oregon, USA
Tetramethylethylenediamine	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Tris-HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin proteomics grade	Promega GmbH, Mannheim

Anhang 4: Verwendete Software

Tab. 0-4: Verwendete Softwares

Programm		Hersteller
ChemSketch	2018	Advanced Chemistry Development Germany GmbH, Frankfurt am Main, DE
Zotero	5.0.34.5	George Mason University
Knime	3.3.1	Universität Konstanz
Mascot	2.6.0	Matrix Science Ltd, London, GB
Microsoft Office Version	2016	Microsoft Ltd, Washington, USA
Microsoft Office Version	365	Microsoft Ltd, Washington, USA
mMass Version	5.5.0	Martin Strohm
MODDE	11.0.1	Umetrics (Sartorius Stedim Biotech), France
R	3.4.1	Universität Münster, Münster
Xcalibur	2.0.7	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
i-Control		Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Mascot Daemon	2.4	Matrix Science Ltd, London, GB
ProteoWizard	3.0.7506	OpenSource Cross-Platform ¹⁵⁶
Photoshop CC	2019	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Photoshop CS2	9	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
CorelDRAW 2017	19.1.0.0419	Corel Corporation, Ottawa, Canada
Python	2.7.12	Guido van Rossum

Literaturverzeichnis

1. Wasinger, V. C. *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090–1094 (1995).
2. Wilkins, M. R. *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* **14**, 61–65 (1996).
3. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850–858 (1996).
4. Jiang, L., He, L. & Fountoulakis, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr. A* **1023**, 317–320 (2004).
5. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **6**, 359–362 (2009).
6. Hughes, C. S. *et al.* Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Mol. Syst. Biol.* **10**, 757 (2014).
7. Dixit, C. K., Vashist, S. K., MacCraith, B. D. & O’Kennedy, R. Evaluation of apparent non-specific protein loss due to adsorption on sample tube surfaces and/or altered immunogenicity. *Analyst* **136**, 1406–1411 (2011).
8. Kristensen, K., Henriksen, J. R. & Andresen, T. L. Adsorption of Cationic Peptides to Solid Surfaces of Glass and Plastic. *PLOS ONE* **10**, e0122419 (2015).
9. Moerz, S. T. & Huber, P. pH-Dependent Selective Protein Adsorption into Mesoporous Silica. *J. Phys. Chem. C* **119**, 27072–27079 (2015).
10. Meissner, J., Prause, A., Bharti, B. & Findenegg, G. H. Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength. *Colloid Polym. Sci.* **293**, 3381–3391 (2015).
11. Kubiak-Ossowska, K., Jachimska, B. & Mulheran, P. A. How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica. *J. Phys. Chem. B* **120**, 10463–10468 (2016).
12. McUmbler, A. C., Randolph, T. W. & Schwartz, D. K. Electrostatic Interactions Influence Protein Adsorption (but Not Desorption) at the Silica–Aqueous Interface. *J. Phys. Chem. Lett.* **6**, 2583–2587 (2015).
13. Scopelliti, P. E. *et al.* The Effect of Surface Nanometre-Scale Morphology on Protein Adsorption. *PLoS ONE* **5**, (2010).

14. Rabe, M., Verdes, D. & Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **162**, 87–106 (2011).
15. Jackler, G., Steitz, R. & Czeslik, C. Effect of Temperature on the Adsorption of Lysozyme at the Silica/Water Interface Studied by Optical and Neutron Reflectometry. *Langmuir* **18**, 6565–6570 (2002).
16. Ball, P. & Hallsworth, J. E. Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 8297–8305 (2015).
17. Sola-Penna, M. & Meyer-Fernandes, J. R. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch. Biochem. Biophys.* **360**, 10–14 (1998).
18. Niether, D., Di Lecce, S., Bresme, F. & Wiegand, S. Unravelling the hydrophobicity of urea in water using thermodiffusion: implications for protein denaturation. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **20**, 1012–1020 (2018).
19. Li, R., Jiang, Z., Chen, F., Yang, H. & Guan, Y. Hydrogen bonded structure of water and aqueous solutions of sodium halides: a Raman spectroscopic study. *J. Mol. Struct.* **707**, 83–88 (2004).
20. Graziano, G. Contrasting the denaturing effect of guanidinium chloride with the stabilizing effect of guanidinium sulfate. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 12008–12014 (2011).
21. Hammami, F., Ghalla, H. & Nasr, S. Intermolecular hydrogen bonds in urea–water complexes: DFT, NBO, and AIM analysis. *Comput. Theor. Chem.* **1070**, 40–47 (2015).
22. de Oliveira, G. A. P. & Silva, J. L. A hypothesis to reconcile the physical and chemical unfolding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E2775–2784 (2015).
23. Wertz, C. F. & Santore, M. M. Adsorption and Reorientation Kinetics of Lysozyme on Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* **18**, 1190–1199 (2002).
24. Vroman, L. & Adams, A. L. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surf. Sci.* **16**, 438–446 (1969).
25. Billsten, P., Wahlgren, M., Arnebrant, T., McGuire, J. & Elwing, H. Structural Changes of T4 Lysozyme upon Adsorption to Silica Nanoparticles Measured by Circular Dichroism. *J. Colloid Interface Sci.* **175**, 77–82 (1995).
26. Giacomelli, C. E. & Norde, W. The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System. *J. Colloid Interface Sci.* **233**, 234–240 (2001).

27. McGuire, J., Wahlgren, M. C. & Arnebrant, T. Structural Stability Effects on the Adsorption and Dodecyltrimethylammonium Bromide-Mediated Elutability of Bacteriophage T4 Lysozyme at Silica Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **170**, 182–192 (1995).
28. Rankl, M. *et al.* Conformational Reorientation of Immunoglobulin G During Non-specific Interaction with Surfaces. *ChemPhysChem* **7**, 837–846 (2006).
29. Norde, W. My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **61**, 1–9 (2008).
30. Hirsh, S. L. *et al.* The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **103**, 395–404 (2013).
31. Holmberg, M. & Hou, X. Competitive Protein Adsorption—Multilayer Adsorption and Surface Induced Protein Aggregation. *Langmuir* **25**, 2081–2089 (2009).
32. Mathé, C. *et al.* Structural Determinants for Protein adsorption/non-adsorption to Silica Surface. *PLoS ONE* **8**, (2013).
33. Switzar, L., Giera, M. & Niessen, W. M. A. Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *J. Proteome Res.* **12**, 1067–1077 (2013).
34. Guerlava, P., Izac, V. & Tholozan, J.-L. Comparison of Different Methods of Cell Lysis and Protein Measurements in *Clostridium perfringens*: Application to the Cell Volume Determination. *Curr. Microbiol.* **36**, 131–135 (1998).
35. Natarajan, S., Xu, C., Caperna, T. J. & Garrett, W. M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal. Biochem.* **342**, 214–220 (2005).
36. Golghalyani, V., Neupärtl, M., Wittig, I., Bahr, U. & Karas, M. ArgC-Like Digestion: Complementary or Alternative to Tryptic Digestion? *J. Proteome Res.* **16**, 978–987 (2017).
37. Manza, L. L., Stamer, S. L., Ham, A.-J. L., Codreanu, S. G. & Liebler, D. C. Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics* **5**, 1742–1745 (2005).
38. Sielaff, M. *et al.* Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *J. Proteome Res.* **16**, 4060–4072 (2017).
39. Tanca, A. *et al.* Critical comparison of sample preparation strategies for shotgun proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples: insights from liver tissue. *Clin. Proteomics* **11**, 28 (2014).

40. Erde, J., Loo, R. R. O. & Loo, J. A. Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J. Proteome Res.* **13**, 1885–1895 (2014).
41. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
42. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
43. Wiśniewski, J. R. & Gaugaz, F. Z. Fast and sensitive total protein and Peptide assays for proteomic analysis. *Anal. Chem.* **87**, 4110–4116 (2015).
44. Sechi, S. & Chait, B. T. Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification. *Anal. Chem.* **70**, 5150–5158 (1998).
45. Garcia, B. A. *et al.* Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2**, 933–938 (2007).
46. Krueger, R. J., Hobbs, T. R., Mihal, K. A., Tehrani, J. & Zeece, M. G. Analysis of endoproteinase Arg C action on adrenocorticotrophic hormone by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **543**, 451–461 (1991).
47. Giansanti, P., Tsiatsiani, L., Low, T. Y. & Heck, A. J. R. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat. Protoc.* **11**, 993–1006 (2016).
48. Burkhardt, J. M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A. & Zahedi, R. P. Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *J. Proteomics* **75**, 1454–1462 (2012).
49. Schröder, C. U., Moore, S., Goodarzi, A. A. & Schriemer, D. C. Lysine Propionylation To Boost Sequence Coverage and Enable a “Silent SILAC” Strategy for Relative Protein Quantification. *Anal. Chem.* (2018). doi:10.1021/acs.analchem.8b01403
50. Schagger, H. & von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223–231 (1991).
51. Weber, G. & Bocek, P. Optimized continuous flow electrophoresis. *Electrophoresis* **17**, 1906–1910 (1996).

52. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
53. Westermeier, R., Postel, W., Weser, J. & Görg, A. High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods* **8**, 321–330 (1983).
54. Spector, T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: A simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to 50 μg of protein. *Anal. Biochem.* **86**, 142–146 (1978).
55. Lopez, M. F. *et al.* A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *ELECTROPHORESIS* **21**, 3673–3683 (2000).
56. Gey, M. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen.* (Springer Spektrum, 2015).
57. Sandra, K. *et al.* Highly efficient peptide separations in proteomics: Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **866**, 48–63 (2008).
58. Zhang, N., Li, N. & Li, L. Liquid chromatography MALDI MS/MS for membrane proteome analysis. *J. Proteome Res.* **3**, 719–727 (2004).
59. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. & Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **78**, 53–68 (1987).
60. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
61. Fast Atom Bombardment of solids as an Ion-source in Mass spectrometry. *ResearchGate* doi:<http://dx.doi.org/10.1038/293270a0>
62. Krüger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Glückmann, M. & Karas, M. Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes. *Anal. Chem.* **73**, 5812–5821 (2001).
63. Karas, M. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Org. Mass Spectrom.* **28**, 1476–1481 (1993).
64. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry - Beavis - 1992 - Journal of Mass Spectrometry - Wiley Online

- Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oms.1210270217/full>. (Accessed: 14th August 2017)
65. Karas, M., Bahr, U. & Gießmann, U. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **10**, 335–357 (1991).
 66. Breuker, K., Knochenmuss, R., Zhang, J., Stortelder, A. & Zenobi, R. Thermodynamic control of final ion distributions in MALDI: in-plume proton transfer reactions. *Int. J. Mass Spectrom.* **226**, 211–222 (2003).
 67. Zeleny, J. Instability of Electrified Liquid Surfaces. *Phys. Rev.* **10**, 1–6 (1917).
 68. Taylor, G. I. Disintegration of Water Drops in Electric Field. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. -Math. Phys. Sci.* **280**, 383 (1964).
 69. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287–2294 (1976).
 70. Dole, M. *et al.* Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240–2249 (1968).
 71. Mirsaleh-Kohan, N., Robertson, W. D. & Compton, R. N. Electron ionization time-of-flight mass spectrometry: Historical review and current applications. *Mass Spectrom. Rev.* **27**, 237–285 (2008).
 72. Campana, J. E. Time-of-Flight Mass Spectrometry: a Historical Overview. *Instrum. Sci. Technol.* **16**, 1–14 (1987).
 73. Vestal, M. L., Juhasz, P. & Martin, S. A. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1044–1050 (1995).
 74. Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. & Mann, M. Delayed Extraction Improves Specificity in Database Searches by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Peptide Maps. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1371–1378 (1996).
 75. Mamyrin, B. A. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **131**, 1–19 (1994).
 76. Paul, W. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Rev. Mod. Phys.* **62**, 531–540 (1990).
 77. Jr, J. P. G. & M. Hieftje, G. Characteristics of a rf-only hexapole ion-guide interface for plasma-source time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 781–792 (2001).
 78. Voyksner, R. D. & Lee, H. Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of

- electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1427–1437 (1999).
79. Amad, M. H. & Houk, R. S. High-Resolution Mass Spectrometry with a Multiple Pass Quadrupole Mass Analyzer. *Anal. Chem.* **70**, 4885–4889 (1998).
80. Douglas, D. J. Applications of Collision Dynamics in Quadrupole Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 101–113 (1998).
81. Makarov, A., Denisov, E., Lange, O. & Horning, S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 977–982 (2006).
82. Makarov, A. *et al.* Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113–2120 (2006).
83. Zubarev, R. A. & Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 5288–5296 (2013).
84. Eliuk, S. & Makarov, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **8**, 61–80 (2015).
85. Michalski, A. *et al.* Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.011015 (2011).
86. Michalski, A. *et al.* Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, O111.013698 (2012).
87. Hoegg, E. D. *et al.* Ultra-High Resolution Elemental/Isotopic Mass Spectrometry ($m/\Delta m > 1,000,000$): Coupling of the Liquid Sampling-Atmospheric Pressure Glow Discharge with an Orbitrap Mass Spectrometer for Applications in Biological Chemistry and Environmental Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2019). doi:10.1007/s13361-019-02183-w
88. Hardman, M. & Makarov, A. A. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal. Chem.* **75**, 1699–1705 (2003).
89. Perry, R. H., Cooks, R. G. & Noll, R. J. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom. Rev.* **27**, 661–699 (2008).
90. Cody, R. B. & Freiser, B. S. Collision-induced dissociation in a fourier-transform mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **41**, 199–204 (1982).

91. Patrie, S. M. *et al.* Construction of a hybrid quadrupole/fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for versatile MS/MS above 10 kDa. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1099–1108 (2004).
92. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
93. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551–3567 (1999).
94. Deutsch, E. mzML: A single, unifying data format for mass spectrometer output. *PROTEOMICS* **8**, 2776–2777
95. Martens, L. *et al.* mzML—a Community Standard for Mass Spectrometry Data. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, R110.000133 (2011).
96. French, W. R. *et al.* Wavelet-Based Peak Detection and a New Charge Inference Procedure for MS/MS Implemented in ProteoWizard’s msConvert. *J. Proteome Res.* **14**, 1299–1307 (2015).
97. Cottrell, J. S. Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept. Res.* **7**, 115–124 (1994).
98. James, P., Quadroni, M., Carafoli, E. & Gonnet, G. Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 58–64 (1993).
99. Pappin, D. J. C., Hojrup, P. & Bleasby, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**, 327–332 (1993).
100. Webb-Robertson, B.-J. M. & Cannon, W. R. Current trends in computational inference from mass spectrometry-based proteomics. *Brief. Bioinform.* **8**, 304–317 (2007).
101. Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Unimod: Protein modifications for mass spectrometry. *PROTEOMICS* **4**, 1534–1536 (2004).
102. Choi, H. & Nesvizhskii, A. I. False Discovery Rates and Related Statistical Concepts in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *J. Proteome Res.* **7**, 47–50 (2008).
103. Green, G. H. & Diggle, P. J. On the Operational Characteristics of the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate Procedure. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **6**, (2007).
104. Savitski, M. M., Wilhelm, M., Hahne, H., Kuster, B. & Bantscheff, M. A Scalable Approach for Protein False Discovery Rate Estimation in Large Proteomic Data Sets. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2394–2404 (2015).

105. The, M., Tasnim, A. & Käll, L. How to talk about protein-level false discovery rates in shotgun proteomics. *Proteomics* **16**, 2461–2469 (2016).
106. Käll, L., Storey, J. D., MacCoss, M. J. & Noble, W. S. Posterior Error Probabilities and False Discovery Rates: Two Sides of the Same Coin. *J. Proteome Res.* **7**, 40–44 (2008).
107. Brosch, M., Yu, L., Hubbard, T. & Choudhary, J. Accurate and Sensitive Peptide Identification with Mascot Percolator. *J. Proteome Res.* **8**, 3176–3181 (2009).
108. Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* **4**, 923–925 (2007).
109. Gygi, S. P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994 (1999).
110. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1017–1031 (2007).
111. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372 (2008).
112. Ong, S.-E. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 252 (2005).
113. Zybaylov, B. *et al.* Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* **5**, 2339–2347 (2006).
114. Berthold, M. R. *et al.* KNIME - the Konstanz Information Miner: Version 2.0 and Beyond. *SIGKDD Explor Newsl* **11**, 26–31 (2009).
115. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing.* (2013).
116. Rossum, G. *Python Reference Manual.* (CWI (Centre for Mathematics and Computer Science), 1995).
117. Cock, P. J. A. *et al.* Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* **25**, 1422–1423 (2009).
118. McKinney, W. Data structures for statistical computing in python. in *Proceedings of the 9th Python in Science Conference* **445**, 51–56 (Austin, TX, 2010).
119. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Eng.* **9**, 90–95 (2007).

120. Lewin, Y., Neupärtl, M., Golghalyani, V. & Karas, M. Proteomic Sample Preparation through Extraction by Unspecific Adsorption on Silica Beads for ArgC-like Digestion. *J. Proteome Res.* (2019). doi:10.1021/acs.jproteome.8b00882
121. Hatefi, Y. & Hanstein, W. G. Solubilization of Particulate Proteins and Nonelectrolytes by Chaotropic Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**, 1129–1136 (1969).
122. Tabb, D. L. *et al.* Repeatability and Reproducibility in Proteomic Identifications by Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **9**, 761 (2010).
123. Netto, L. & R. Stadtman, E. The Iron-Catalyzed Oxidation of Dithiothreitol Is a Biphasic Process: Hydrogen Peroxide Is Involved in the Initiation of a Free Radical Chain of Reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 233–42 (1996).
124. Moskovitz, J., Du, F., Bowman, C. F. & Yan, S. S. Methionine sulfoxide reductase A affects β -amyloid solubility and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **310**, E388–E393 (2016).
125. Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K. J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* **11**, 526–534 (1997).
126. Xie, Y., Rashid, I., Zhou, H. ("Joe") & Gammie, L. Acidic Methanol Methylation for HAA Analysis: Limitations and Possible Solutions. *J. - Am. Water Works Assoc.* **94**, 115–122 (2002).
127. Ichihara, K. & Fukubayashi, Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **51**, 635–640 (2010).
128. Bogdanow, B., Zauber, H. & Selbach, M. Systematic Errors in Peptide and Protein Identification and Quantification by Modified Peptides. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **15**, 2791–2801 (2016).
129. Kollipara, L. & Zahedi, R. P. Protein carbamylation: in vivo modification or in vitro artefact? *Proteomics* **13**, 941–944 (2013).
130. Garcia, B. A., Shabanowitz, J. & Hunt, D. F. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 66–73 (2007).
131. Su, X., Ren, C. & Freitas, M. A. Mass spectrometry-based strategies for characterization of histones and their post-translational modifications. *Expert Rev. Proteomics* **4**, 211–225 (2007).

132. Gershon, P. D. Cleaved and Missed Sites for Trypsin, Lys-C, and Lys-N Can Be Predicted with High Confidence on the Basis of Sequence Context. *J. Proteome Res.* **13**, 702–709 (2014).
133. Siepen, J. A., Keevil, E.-J., Knight, D. & Hubbard, S. J. Prediction of Missed Cleavage Sites in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics. *J. Proteome Res.* **6**, 399–408 (2007).
134. Frese, C. K. *et al.* Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J. Proteome Res.* **10**, 2377–2388 (2011).
135. Taylor, J. A. & Johnson, R. S. Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1067–1075 (1997).
136. Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N. & Mann, M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat. Methods* **11**, 319 (2014).
137. Johansson, S., Svineng, G., Wennerberg, K., Armulik, A. & Lohikangas, L. Fibronectin-integrin interactions. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2**, d126-146 (1997).
138. Hinderliter, A., Biltonen, R. L. & Almeida, P. F. F. Lipid Modulation of Protein-Induced Membrane Domains as a Mechanism for Controlling Signal Transduction. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 7102–7110 (2004).
139. Kalasin, S. & Santore, M. M. Non-specific adhesion on biomaterial surfaces driven by small amounts of protein adsorption. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **73**, 229–236 (2009).
140. Hlady, V. & Buijs, J. Protein adsorption on solid surfaces. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 72–77 (1996).
141. Rabe, M., Verdes, D., Zimmermann, J. & Seeger, S. Surface Organization and Cooperativity during Nonspecific Protein Adsorption Events. *J. Phys. Chem. B* **112**, 13971–13980 (2008).
142. Taborelli, M. *et al.* Bovine serum albumin conformation on methyl and amine functionalized surfaces compared by scanning force microscopy. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 707–714 (1995).
143. Lenk, T. J., Horbett, T. A., Ratner, B. D. & Chittur, K. K. Infrared spectroscopic studies of time-dependent changes in fibrinogen adsorbed to polyurethanes. *Langmuir* **7**, 1755–1764 (1991).

144. Ta, T. C. & McDermott, M. T. Mapping Interfacial Chemistry Induced Variations in Protein Adsorption with Scanning Force Microscopy. *Anal. Chem.* **72**, 2627–2634 (2000).
145. Kunz, W., Henle, J. & Ninham, B. W. ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9**, 19–37 (2004).
146. Elofsson, U. M., Paulsson, M. A. & Arnebrant, T. Adsorption of β -lactoglobulin A and B: Effects of ionic strength and phosphate ions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **8**, 163–169 (1997).
147. Janiak, C. Proteinentfernung von Kontaktlinsen: Damit der Durchblick erhalten bleibt. *Chem. Unserer Zeit* **35**, 348–354 (2001).
148. Su, T. J., Lu, J. R., Thomas, R. K. & Cui, Z. F. Effect of pH on the Adsorption of Bovine Serum Albumin at the Silica/Water Interface Studied by Neutron Reflection. *J. Phys. Chem. B* **103**, 3727–3736 (1999).
149. Morrissey, B. W. The Adsorption and Conformation of Plasma Proteins: A Physical Approach*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **283**, 50–64 (1977).
150. Su, T. J., Lu, J. R., Thomas, R. K., Cui, Z. F. & Penfold, J. The Conformational Structure of Bovine Serum Albumin Layers Adsorbed at the Silica–Water Interface. *J. Phys. Chem. B* **102**, 8100–8108 (1998).
151. Stutz, H. Protein attachment onto silica surfaces – a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE. *ELECTROPHORESIS* **30**, 2032–2061 (2009).
152. Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521–655 (1983).
153. Johnson, R. S. & Walsh, K. A. Mass spectrometric measurement of protein amide hydrogen exchange rates of apo- and holo-myoglobin. *Protein Sci.* **3**, 2411–2418 (1994).
154. Turowski, M. *et al.* Deuterium Isotope Effects on Hydrophobic Interactions: The Importance of Dispersion Interactions in the Hydrophobic Phase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13836–13849 (2003).
155. Valleix, A., Carrat, S., Caussignac, C., Léonce, E. & Tchaplal, A. Secondary isotope effects in liquid chromatography behaviour of ^2H and ^3H labelled solutes and solvents. *J. Chromatogr. A* **1116**, 109–126 (2006).

-
156. Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D. & Mallick, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* **24**, 2534–2536 (2008).

Wissenschaftliche Publikationen und Vorträge

Publikationen in Fachzeitschriften

Proteomic Sample Preparation through Extraction by Unspecific Adsorption on Silica Beads for ArgC-like Digestion

Yannik Lewin, Moritz Neupärtl, Vahid Golghalyani, and Michael Karas

Journal of Proteome Research **2019** 18 (3), 1289-1298

DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00882

Wissenschaftliche Vorträge

Adsorptionsbasierte Probenvorbereitung für ArgC-analogen Verdau

Yannik Lewin und Michael Karas

Pharmazeutisches Kolloquium 2018, Goethe Universität, Frankfurt

Postervorstellungen

ArgC-like digestion and quantification through chemical labelling of lysines with propionic anhydride

Yannik Lewin und Michael Karas

Jahreskonferenz 2018, American Society for Mass Spectrometry, San Diego, CA, USA

A robust protocol for detergent-free cell lysis, protein enrichment and modification with a high tolerance for harsh conditions

Yannik Lewin und Michael Karas

Jahreskonferenz 2017, American Society for Mass Spectrometry, Indianapolis, IN, USA

A versatile method to extract, modify, enrich and digest proteomic samples directly from cell lysates

Yannik Lewin, Vahid Golghalyani, Michael Karas

Jahreskonferenz 2017, Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Kiel, DE

Tagungsbesuche

ASMS

Jahreskonferenz 2018, American Society for Mass Spectrometry, San Diego, CA, USA

Jahreskonferenz 2017, American Society for Mass Spectrometry, Indianapolis, IN, USA

DGMS

Jahreskonferenz 2017, Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Kiel, DE

Jahreskonferenz 2015, Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Wuppertal, DE

Fortbildungen

European Summer School for Proteomics, Brixen, Italien, 2015

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Methodenentwicklung zur Extraktion, Modifikation und Analyse proteomischer Proben auf Silicaoberflächen“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind. Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den 26.11.2019

Yannik Lewin